**人髓核细胞永生化**

**细胞详述：**

髓核，是乳白色半透明胶状体，富于弹性，为椎间盘结构的一部分，位于两软骨板与纤维环之间。由纵横交错的纤维网状结构即软骨细胞和蛋白多糖黏液样基质构成的弹性胶冻物质。

发育成熟的髓核是一个由软骨样细胞分散在细胞间质内，周围围绕着一个比较致密的胶原纤维网的含水球，位于椎间盘偏后位置，占推间盘横断面积的50%～60%；由于它的含水量很高，并和软骨终板紧密接触，是椎间盘接受经软骨终板主要营养途径渗透交换营养的主要部分。

**该细胞通过慢病毒转染的方式携带SV40基因。**

**细胞特性:**

1. 细胞来源于人的椎骨组织。
2. 细胞鉴定：Ⅱ型胶原荧光染色为阳性。
3. 经鉴定细胞纯度高于90%。
4. 细胞生长方式：长梭形细胞，不规则细胞，贴壁培养。

**运输和保存：**干冰运输及复苏好存活细胞：（1）1mL冻存管包装干冰运输，收到后-80度冰箱保存过夜后转入液氮或直接复苏，若发现干冰已挥发干净、冻存管瓶盖脱落、破损及细胞有污染，请立即与我们联系。（2）T25瓶复苏的存活细胞常温发货，收到后按照细胞接收后的处理方法操作。

**细胞接收后的处理：**

1）收到细胞后，75%酒精消毒瓶壁将T25瓶置于室温放置约1h，若发现培养瓶破损、有液溢出及细胞有污染，请拍照后及时联系我们。

2）请在4或5X显微镜下确认细胞状态，同时给刚收到的细胞拍照（10×，20×）各2-3张以及培养瓶外观照片一张留存，作为售后时收到时细胞状态的依据。

3）贴壁细胞：**细胞在室温放置约1h，显微镜下观察细胞的生长和贴壁情况，有些贴壁细胞在快递运送过程中会因振动脱落和脱落后成团的情况。**若镜下观察细胞的生长密度若在60%以下，可去除培养瓶中灌液培养基（若有未贴壁的细胞需要离心回收，重悬打入到原培养瓶中）,加入新配制的完全培养基6-8mL，放到细胞培养箱中继续培养。若细胞生长密度达70%-80%以上，可以对细胞进行传代处理。传代过程中，若因运输振动脱落的细胞需要离心回收。

4）备注：运输用的培养基（灌液培养基）不能再用来培养细胞，请换用按照说明书细胞培养条件新配制的完全培养基来培养细胞。  收到细胞后第一次传代建议T25培养瓶1：2传代 。

**一．培养基及培养冻存条件准备：**

1）培养条件：DMEM/F12基础培养基+10%特级胎牛血清FBS+1%双抗P/S

2）培养条件： 气相：空气，95%；二氧化碳，5%。 温度：37摄氏度，培养箱湿度为70%-80%。

3) 冻存液：无血清细胞冻存液。

**二．细胞处理：**

1. **冻存细胞的复苏**：

将含有1mL细胞悬液的冻存管在37℃水浴中迅速摇晃解冻，加入到含4-6mL完全培养基的离心管中混合均匀。在1000RPM条件下离心3-5min，弃去上清液，完全培养基重悬细胞。然后将细胞悬液加入含6-8ml完全培养基的培养瓶（或皿）中37℃培养过夜。第二天显微镜下观察细胞生长情况和细胞密度。

1. **细胞传代：**如果细胞密度达80%-90%，即可进行传代培养。

对于贴壁细胞传代可以参考以下方法：

1. 弃去培养上清，用不含钙、镁离子的PBS润洗细胞1-2次。
2. 加入0.25％（w / v）胰蛋白酶-0.53 mM EDTA于培养瓶中（T25瓶1-2mL，T75瓶2-3mL），置于37℃培养箱中消化1-2分钟（难消化的细胞可以适当延长消化时间），然后在显微镜下观察细胞消化情况，若细胞大部分变圆并脱落，迅速拿回操作台，轻敲几下培养瓶后加入3-4ml含10%FBS的培养基来终止消化。

3.轻轻打匀后吸出，在1000RPM条件下离心3-5min，弃去上清液，补加1-2mL培养液后吹匀。将细胞悬液按1：2的比例分到新T25瓶中，添加6-8ml按照说明书要求配置的新的完全培养基以保持细胞的生长活力，后续传代根据实际情况按1:2~1:5的比例进行。

**3）细胞冻存:**

下面T25瓶为例；

1. 细胞冻存时按照细胞传代的过程收集消化好的细胞到离心管中，可使用血球计数板计数，来决定细胞的冻存密度。一般细胞的推荐冻存密度为1×106~1×107个活细胞/ml.

2. 1000rpm离心3-5min，去掉上清。用无血清细胞冻存液重悬细胞 ，按每1ml冻存液含1×106~1×107个活细胞/ml分配到一个冻存管中将细胞分配到冻存管中，标注好名称、代数、日期等信息。

3. 将要冻存的细胞置于程序降温盒中，-80度冰箱中过夜，之后转入液氮容器中储存。同时记录好冻存管在液氮容器中的位置以便后续查阅和使用。

**注意事项：**

1. 所有动物细胞均视为有潜在的生物危害性，必须在二级生物安全台内操作，并请注意防护，所有废液及接触过此细胞的器皿需要灭菌后方能丢弃。

2. 建议在复苏冻存细胞时始终使用防护手套、衣服和戴上防护面罩。注意：冻存管浸没在液氮中会泄漏，并会慢慢充满液氮。解冻时，液氮转化成气相可能导致容器爆炸或用危险力吹掉其盖子，从而产生飞扬的碎屑造成人员伤害。