ChangLiver 人张氏肝细胞

一、细胞基本属性	
细胞货号	SNL-149
细胞种属	人
生长情况	贴壁
培养条件	1640+10%FBS+1% P/S
培养环境	air, 95%; carbon dioxide (CO2), 5%
二、细胞培养操作	
换液周期	2-3 天
培养基体积	T25 瓶 10-12ml；10cm 皿 12-15ml
传代比例	1:2-1:4（具体情况视细胞生长速度及密度决定）
传代方法	1. 尽量吸干净 T25 瓶原培养基； 2. 加 3-4ml 常温 PBS 轻轻润洗细胞 10-20s，吸走润洗的 PBS； 3. T25 瓶加 1ml 左右胰酶，轻轻晃动培养瓶以使胰酶铺匀瓶底细胞层； 4. 将培养瓶放入 37 度培养箱消化； 5. 消化到细胞间隙变大，但未完全脱落时加 2-3ml 完全培养基终止胰酶消化； 6. 混匀细胞，900rpm 离心 3-5min，弃上清； 7. 加新的完全培养基轻轻重悬细胞，均匀分到新的培养瓶里； 8. 补足完全培养基，将培养瓶放回培养箱静置培养；
注意事项	不同品牌胰酶消化时间差别较大，注意严格控制消化时间 消化传代细胞时吹打细胞注意尽量轻柔，不要产生过多气泡以免影响细胞状态。
三、细胞冻存操作	
冻存液配方	92%FBS+8%DMSO(新手推荐)或 92%完全培养基+8%DMSO(高手推荐)；
冻存规格	200-300 万/ml，1ml 每管
冻存方法	1. 消化并离心获得细胞沉淀后，加配置好的冻存液轻轻重悬细胞； 2. 将细胞悬液尽快移入已经做好标记的冻存管； 3. 将冻存管转入程序冻存盒，放入-80 度冰箱过夜，第二天转入液氮保存；没有程序冻存盒的实验室，加入细胞后可以将冻存管放在泡沫盒中 4 度静置 5-10min，再-20 度静置 2h 后转入-80 度过夜，第二天转入液氮保存
注意事项	冻存细胞转入液氮后及时复苏一管检查冻存活性，若有异常，及时调整实验方案

Tips：1.细胞培养时黑点可能会比较多，具体原因参见培养操作说明 2、3 条；

收货处理方式

	发货形式	T25 瓶	冻存管
1	快递保存温度	室温	液氮长期保存或-80 度 3 天以内
2	初步平衡	T25 瓶表面消毒后，放培养箱平衡复温 2h 以上	无须平衡，直接放入-80 冰箱或者液氮罐保存
3	处理方式	吸走大部分培养基离心备用，留 10-12ml 培养基，拍照并观察细胞。密度 80%以上即可吸走培养基消化传代，若密度低于 80%可以留 10-12 ml 继续培养至细胞密度 80%以上再进行传代培养	37 度水浴摇晃尽快融化细胞，直接在冻存管内将细胞离心。离心转速以离心力 150g(约 900rpm)左右，1min 为宜，弃上清，沉淀用新鲜培养基重悬后接种到 10cm 培养皿，显微镜下观察细胞并拍照，24h 后换液一次
4	接种方式	T25 传代首次建议 1:2 传代，即瓶 T25 传成两瓶	一管细胞建议接种到 10cm 培养皿或者 T25 瓶
5	注意事项	若细胞出现漂浮，可以先收集瓶内细胞悬液，离心收集细胞，用胰酶消化后重新接种到新的培养瓶内，由于发货会出现漂浮的细胞贴壁本身较弱，建议使用高贴附培养瓶或提前包被过的培养瓶培养细胞 发货 T25 瓶装满大约有 75ml 培养基，静置后上部不含细胞的培养基可以收集起来，1500rpm 离心 5min 后，取上清 4 度保存，用于培养细胞，以平稳过渡到客户自己的培养基	收货时若发现干冰化完，检查冻存管是否融化，若已融化需直接离心细胞接种观察，若未融化可以将细胞按正常步骤保存，以上情况及时反馈 干冰发货的细胞只能在-80 保存 3 天左右，长时间保存会出现活性下降。干冰发货均为两支，客户先复苏一支，若复苏失败及时联系我方并在我方指导下复苏第二支。若客户同时复苏两支均状态不佳，我方将不提供免费售后服务

特殊情况：

1. 若培养瓶或者冻存管出现破碎或漏液情况，及时拍照联系销售反馈，按指导进行进一步处理。若只是外包装破损一般不影响培养瓶和冻存管，请放心使用。
2. 若无法观察到细胞，建议收集细胞培养基，1200rpm 离心 5min，观察细胞沉淀量，并用少量培养基重悬沉淀后，取部分悬液放到计数板或者载玻片上观察细胞。
3. 部分细胞增殖较快，发货细胞量较多时，培养基可能出现颜色变黄现象。继续培养使用此类培养基时，需要及时观察培养基颜色变化，缩短培养基换液周期，并每瓶多加 2-3ml 培养基。
4. 收货当天不处理细胞时，T25 瓶可以消毒拆封口膜后不拧开瓶盖放培养箱静置过夜，但不建议超过 24h；冻存管可以直接放液氮长期保存或-80 度 3 天以内，必须一周内复苏一只培养检查，否则将超过一周售后期。

培养操作说明

1. 细胞培养需要充足经验，新手或者没有类似细胞培养经验的人建议在专业人士指导下进行操作，尤其注意无菌操作、贴壁细胞消化时间及细胞培养密度。

2. 部分细胞在传代后时，会有以下现象：细胞内会有黑色小点、细胞间隙有些颗粒物、培养基漂浮一些死细胞。以上都是细胞培养常见现象，不影响细胞增殖和实验。

3. 细胞内的黑色颗粒是细胞外分泌泡、细胞器折光或者细胞膜表面物质，这个属于细胞自身特性，无法清除也无法改变，具体情况可以参考 ATCC、DSMZ 等大型细胞库细胞照片。细胞外的黑色颗粒大部分是细胞碎片，可以吸走培养基后用 PBS 润洗；润洗不能清除的可以消化细胞重新接种，消化完成后加完全培养基终止消化，混匀细胞，收集细胞悬液 900-1000rpm(约 150g)离心 3min，弃上清。再加 5ml PBS 重悬细胞，再离心后，用完全培养基重悬接种到新的培养皿。第二次 PBS 重悬是为了去除碎片，如果平时碎片比较少，传代时可以省略 PBS 重悬的步骤；如果碎片很多，建议 PBS 多洗几次。

4. 不同品牌胰酶溶液成分不一样，消化活性差别比较大，更换胰酶品牌时需重新摸索消化时间，以消化到细胞间隙变大但未漂浮为准，此时结束消化最佳，避免消化过度导致细胞死亡。细胞消化后比较脆弱，吹打力度不要过大，不要产生过多气泡，否则会严重影响细胞状态。

5. 不同细胞生长速度差异较大，所有细胞收货后首次传代建议按 1:2 传代。正常培养时生长较慢、密度较低的细胞需要传代时按 1:2 传代，生长较快、密度较高的细胞可以按 1:4 传代。

6. 细胞生长偏慢时，可以提高 5-10%血清浓度（血清总浓度不超过 20%）培养一段时间，待细胞状态和生长速度恢复正常后换回正常血清浓度。

7. 推荐使用尚恩生物 SNLM-149 培养细胞，其他培养体系培养细胞效果无法保证。

售后规定

1. 所有细胞免费售后期为一周，一周内细胞培养出现异常及时拍照反馈。超出一周没有任何反馈视为细胞培养正常，后期若出现培养问题不再免费重发。

2. 申请售后时请提供细胞收货时及反馈售后当天细胞清晰照片及培养信息，若无清晰照片及相应信息，不予免费售后；若文件较多不方便在线联系或传送，可以向销售索要细胞情况表，填写后反馈给销售。

3. 售后仅针对由于细胞自身状态问题导致不可传代的情况，若客户收货一周内已经传代或转移细胞多次，出现死亡或者污染时不予免费售后；若客户在我方未允许的情况下，擅自遗弃细胞，视为客户自身问题导致细胞异常，不予免费售后。

4. 细胞在不同实验室培养由于所使用培养基及血清品牌、个人操作习惯、培养瓶品牌等诸多培养条件不尽相同，导致细胞培养形态、生长速度、贴壁情况均可能有所差异，对于此类细胞适应环境生长的行为，不予过度解释或免费售后。

5. 冻存细胞发货 2 管，客户先复苏一支，若复苏失败及时联系我方并在我方指导下复苏第二支。若客户未反馈并复苏 2 管失败，我方将不提供免费售后服务。冻存细胞售后均发复苏培养的，若要重发冻存细胞，需补加干冰运输费用。

6. 客户自行冻存细胞一定要注意冻存后复苏一管检查冻存活性，避免冻存死亡导致绝种。我方不对客户冻存细胞死亡负责，客户冻存细胞死亡时不予免费售后。

7. 细胞收货后，请收集发货培养基培养至少一瓶细胞，用于确定细胞培养条件及实验操作是否合适。