

原代人直肠成纤维细胞

一、细胞基本属性	
细胞货号	SNP-H354
细胞概述	人直肠成纤维细胞 (Human Rectal Fibroblasts, HReF) 分离自人直肠, 采用胰蛋白酶-胶原酶混合消化法结合差速贴壁法制备而来, 经 vimentin 免疫荧光鉴定, 细胞纯度大于 90%。细胞量大于 5×10^5 cells/株, 细胞活性良好, 不含细菌、真菌、支原体、传染性病毒等污染。
生长情况	贴壁 (成纤维细胞样)
可传代数	2-3 代 (不同代次细胞形态可能有差异)
消化液类型	0.25%胰蛋白酶-EDTA
包被条件	/
培养条件	成纤维细胞体系 (建议使用尚恩生物 SNPM-H354 培养细胞)
培养环境	37°C; 5%二氧化碳; 饱和湿度
二、细胞培养操作	
换液周期	2-3 天
传代比例	<u>(具体情况视细胞可传代数、生长速度及密度决定。不可传代细胞忽略消化传代步骤及传代比例, 可以消化后计数按实验需求接种到其他培养容器)</u>
传代方法	<ol style="list-style-type: none"> 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 左右消化液, 轻轻晃动培养瓶以使消化液铺匀瓶底细胞层; 4. 吸走多余消化液后, 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 完全培养基终止消化液消化; 6. 混匀细胞, 900rpm (或 150g 左右) 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 (T25 瓶建议加 10-12ml), 将培养瓶放回培养箱静置培养;
注意事项	不同品牌消化液消化时间差别较大, 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。

Tips: 1. 原代细胞尽量避免传代, 传代过多可能影响细胞形态、功能及实验效果, 建议收货后尽早安排实验; 2. 原代细胞需使用专用培养体系培养, 请提前准备相应培养体系; 3. 原装培养瓶内培养基为运输培养基, 不适用于普通培养细胞, 建议收货后及时更换为专用完全培养基; 4. 原代细胞传代数有限且冻存要求较高, 不建议自行冻存细胞;

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 37 度培养箱平衡复温 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, 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%可以加 10-12 ml 新鲜专用完全培养基继续培养至细胞密度 80%以上	水浴(水浴温度参考培养温度)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, 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 (不可传代细胞忽略消化传代步骤及传代比例, 可以消化后计数按实验需求接种到其他培养容器)	可以计数后按实际需要接种到相应培养容器内或一管细胞建议直接接种到 T25 瓶或 6cm 皿, 接种 24h 后观察细胞情况并拍照
5	注意事项	若细胞出现漂浮, T25 瓶不开封, 放至 37 度培养箱过夜, 若细胞贴壁即说明活性正常, 按正常操作消化传代即可; 若未贴壁, 收集细胞培养基离心后, 收集细胞沉淀用 PBS 重悬润洗后采用消化液消化分散, 原瓶内贴壁的细胞按正常消化分散, 然后将所有细胞合并后再接种新瓶	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。

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 37 度培养箱静置过夜, 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. 不同品牌消化液溶液成分不一样，消化活性差别比较大，更换消化液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. 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。

售后规定

1. 细胞运输途中遭遇的各种问题，细胞丢失、瓶身破损、培养液严重漏液等，重发。细胞污染问题，请在收到产品 3 天内，给我们提出真实的实验结果，核实后重发。细胞收到当天以及第 2,3 天请拍照，3 天内未告知的，视为产品合格。4-7 天内出现问题提供收到细胞前 3 天照片和细胞出现问题时照片以及细胞相关操作的详细步骤的，并跟技术人员沟通的，由技术人员判定为我方责任的，重发。技术人员判定为双方承担责任的由双方进行协商处理或者按合同价的 50%收费重发。
2. 客户操作造成细胞污染，不重发；客户严重操作失误致细胞状态不好，不重发；非我司推荐细胞培养体系致的细胞状态不好，不重发；细胞状态不好，未提供真实清晰的培养前 3 天的细胞状态照片，不重发；细胞培养时经其它处理导致细胞出现问题的，不重发；收到细胞并发现问题与客服人员沟通的时间证明大于 7 天的，不重发；细胞出现问题后，未能及时反馈并提交细胞质量问题反馈表的，不能免费重发，如需重发，客户需与公司销售人员协商经双方定价后给予重发。原代细胞的重发没有库存的，须经技术人员同意后，定下货期再通知客户。
3. 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，不予过度解释或售后。
4. 原代细胞不建议客户自行冻存，收货后及时传代并安排实验，超出代数的细胞可能出现突变、状态变差等现象导致细胞无法进一步传代或者进行实验，对于自行冻存的细胞一律不予售后。