

鸭胚胎肝间质细胞永生化

细胞介绍

间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)是来源于早期中胚层的一类多能干细胞,在体内具有分布广泛,体外能够大量扩增和免疫原性低等特点,是一种细胞治疗的理想种子细胞。自20世纪60年代,Friedenstein等发现在人骨髓长期培养中,存在一种形态类似成纤维细胞的贴壁生长的细胞且移植到小鼠体内具有成骨能力和造血支持作用,将这种细胞命名为骨髓基质细胞(Bone marrow stromal cells, BMSCs)。到20世纪90年代末,人们才成功分离一种具有成骨、成软骨和成脂肪能力的细胞,称之为间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)。

随后研究者也从其他组织,如脂肪、脐带、胎盘、肝脏、骨实质和肌肉等中成功分离获得间充质干细胞。作为一类成体干细胞中的间充质干细胞,目前大部分的研究集中在人及大鼠、小鼠这两种模式动物上,其他动物的间充质干细胞报道相对较少。选取中国特有家禽品种鸭子为实验材料,以鸭胚胎肝脏中的间充质干细胞为研究对象,对其进行分离培养鉴定,进行增殖能力检测及分化能力鉴定,为家禽干细胞研究及畜禽遗传资源保存提供借鉴及参考。鸭胚胎肝间质细胞进行慢病毒转染8-12h,连续传13代,采用高浓度含嘌呤霉素培养基

(4yg/mL)培养,筛选阳性克隆;筛选出阳性永生化鸭胚胎肝间质细胞。

细胞特性

- 1)来源:上海中科院动物研究所
- 2)含量: >5x10⁵ 个/mL
- 3)污染: 支原体、细菌、酵母和真菌检测为阴性
- 4)规格: T25 瓶或者 1mL 冻存管包装 运输和保存: 可选择干冰运输及发送

复苏存活细胞方式:

- (1) 干冰运输,收到后立即转入液氮冻存或直接复苏;
- (2) 存活细胞,收到后应继续生长,传代达到细胞生长状态良好时,再进行冻存。具体操作见细胞培养步骤。



细胞用途： 仅供科研使用。

细胞培养步骤

一. 培养基及培养冻存条件准备：

1)准备鸭胚胎肝脏间充质干细胞完全培养基(dmem 高糖和 F12 培养基 1: 1

搭配, 10%血清, 1%双抗 以及 1%自己配置的间质细胞因子。)

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: 90%血清, 10%DMSO,现用现配, 液氮储存。

二. 细胞处理:

1)复苏细胞: 将含有 1mL 细胞悬液的冻存管在 37T 水浴中迅速摇晃解冻, 离 心管加入 4mL 培养基混合均匀。在 1000RPM 条件下离心 4-5 分钟, 弃去上 清液, 补加 1-2mL 培养基后吹匀。然后将所有细胞悬液 加入 T25 培养瓶中 培养, 补加培养基至 6ml。

2)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.力口 1ml 消化液(0.25%Trypsin-0.53mM EDTA)于培养瓶中, 置于 37T 培养箱中消化 1-2 分钟, 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 2ml 完全培 养 基终止消化。

3.轻轻打匀后吸出, 在 1000RPM 条件下离心 5 分钟, 弃去上清液, 加 1-2mL 培养液后吹匀。

4.将细胞悬液按 1: 2 到 1:5 比例分到新的含 6ml 培养基的新皿中或者瓶中。

3)细胞冻存: 待细胞生长状态良好时, 可进行细胞冻存。

下面 T25 瓶为例:

1 •细胞冻存时, 弃去培养基后, PBS 清洗瓶底 1-2 次后加入 1ml 胰酶, 细 胞变圆脱落后, 加入 2ml 完全 培养基终止消化, 可使用血球计数板计数。

2. 1000RPM 离心 5 分钟去掉上清。用血清重悬浮, 加 DMSO 至最终浓度 为 10%。加入 DMSO 后迅速混匀, 按每 1ml 的数量分配到冻存管中, 注 意冻存管做好标识。本公司按每个冻存管细胞数目大于 1X10⁶ 个细胞 冻存。

3•将冻存管置于程序降温盒中, 放入-80 度冰箱, 至少 2 个小时以后转入 液氮灌储存。记录冻存管位置以



便下次拿取。

注意事项:

1. 收到细胞后，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. 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。第一次处理细胞时，在超净工作台中打开瓶盖，用浸透 75% 的酒精棉球擦拭瓶口外侧，以防止溢出的培养基污染细胞。