

## 小鼠骨髓间充质干细胞永生化

### 一、细胞简介

<b>货号</b>	YFX-CLM076
<b>背景描述</b>	骨髓间充质干细胞是骨髓基质干细胞, 对骨髓中的造血干细胞 (HSC) 不仅有机械支持作用, 还能分泌多种生长因子 (如 IL-6, IL-11, LIF, M-CSF 及 SCF 等) 来支持造血。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 具有多向分化潜能, 能促进间充质组织的再生, 如: 骨、软骨、肌肉、韧带、肌腱、脂肪及基质等组织。在骨髓中, BMSCs 占骨髓有核细胞总数的 0.001%~0.1%, 含量极低。而同时, 由于组织工程需要大量的种子细胞, 从啮齿类动物骨髓分离 BMSCs 的技术上的难度限制了许多实验的开展。体外分离培养纯度高、活力强、生物特性均一的 BMSCs 对组织工程及细胞的体内、体外实验显得至关重要。 <b>该细胞通过慢病毒转染的方式携带 SV40 基因。</b>
<b>细胞形态</b>	长梭形细胞样, 不规则细胞样, 贴壁生长。
<b>规格</b>	>1×10 <sup>6</sup> 细胞数量, T25 瓶或者 1mL 冻存管包装。
<b>细胞来源</b>	小鼠正常骨髓血组织。
<b>培养基</b>	小鼠骨髓间充质干细胞专用完全培养基。
<b>培养条件</b>	气相: 空气, 95%; 二氧化碳, 5%; 温度: 37℃; 培养箱湿度为 70%-80%。
<b>消化时间</b>	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) 。
<b>传代比例</b>	1:2-1:5; 第一次收到细胞建议 T25 培养瓶 1: 2 传代。
<b>细胞检测</b>	不含有 HIV-1、HBV、HCV、支原体、细菌、酵母和真菌等。
<b>换液频率</b>	2-3 天。
<b>细胞冻存液</b>	无血清冻存液。

### 二、细胞收到后处理方式

- 收到细胞后, 75%酒精消毒瓶壁将 T25 瓶置于 37℃ 培养箱放置约 2-3h, 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。
- 请在 4 或 5×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。
- 悬浮细胞: T25 瓶置于 37℃ 培养箱放置约 2-3h, 然后抽出瓶中的培养基和细胞 1000rpm 离心 5 分钟, 弃去上清重悬后接种到新的培养瓶中 (加入按照说明书细胞培养条件新配制的完全培养基) 。
- 贴壁细胞: 细胞在 37℃ 培养箱中放置 2-3h, 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。
- 备注: 运输用的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。**

### 三、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、在生物安全柜内，打开培养瓶瓶口，吸弃瓶内的培养基。
- 2、向培养瓶内加入 3mL 无菌的 1×PBS，水平放置培养瓶，使 PBS 能够浸润到培养瓶底面上所有的面积，吸弃 PBS。
- 3、向瓶内加入 1mL 0.25% 胰蛋白酶（含 EDTA），浸润底面后放入 37℃ CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 1~2min。
- 4、孵育完成后在倒置显微镜下观察细胞是否变圆飘起，若全部消化下来则直接向培养瓶内加入 2mL 完全培养基中，将悬液吸入 15mL 离心管。

**注：如细胞不能一次性完全消化，可采取如下方法：**

- A. 准备一个无菌的 15mL 离心管，加入 2mL 完全培养基。
- B. 将消化下来的细胞加入到上述离心管中。
- C. 向之前消化的培养瓶中加入 1mL 胰酶继续消化 2min 左右，轻拍培养瓶，95%左右细胞脱落后加入 2mL 含 10%FBS 的完全培养基中和，中和后的细胞悬液移入 A 中的离心管内。

### 四、细胞冻存

收到细胞后建议在培养前 3 代时冻存一批细胞种子以备后续实验使用。下面 T25 瓶为例：

- 1、选择指数生长期的细胞，吸去培养液，加 PBS 清洗 1-2 遍。去 PBS，加入 0.25% 胰酶 1.5mL 润洗 10 秒，去胰酶。将培养瓶放 37 度培养箱，靠残余胰酶继续消化细胞直至细胞变圆，拍打瓶侧使细胞脱落。细胞消化下来后，加 5mL 培养液全部吹打下来，再 1000RPM 离心 3 分钟。
- 2、加入 1-1.5mL 成品冻存液，分装至 2mL 冻存管里，将冻存管放入充满异丙醇的程序降温盒中，之后转入-80℃度冰箱过夜，第二天再转至液氮。

### 五、细胞复苏

- 1、将恒温水浴锅中的水预热到 37℃。
- 2、准备一支 15mL 离心管，加入 5mL 完全培养基，放入 37℃水浴锅中预热。
- 3、戴上护目镜，厚毛线手套后，从液氮罐中取出要复苏的细胞，尽快转入 37℃恒温水浴锅中复温晃动冻存管以提高复温速率。
- 4、将融化了的冻存管中的细胞吸入事先准备的离心管中，混匀后，1000rpm 离心 5min。
- 5、准备一个 T-25 培养瓶，写上细胞名称、日期，再加入 4mL 完全培养基。
- 6、离心完成后弃去上清，用 1mL 完全培养基重悬细胞后，转入 T-25 细胞培养中，混匀后转入 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养静置。

### 六、运输和保存

- 1、T25 瓶复苏的存活细胞常温发货，收到细胞后请镜下观察细胞生长状态，如铺瓶率超过 85%请立即进行传代操作，如悬浮的细胞较多，请将培养瓶至于培养箱中静置过夜以帮助未死亡的悬浮细胞能够再次贴壁。
- 2、1mL 冻存细胞悬液装于 1.8mL 的冻存管中，置于装满干冰的泡沫保温盒中进行运输；收到细胞后请尽快解冻复苏细胞进行培养，如无法立刻进行复苏操作，冻存细胞可在-80℃的条件下保存 1 个月。