

仅供科研使用

版本号：A 版

## NHDF 细胞说明书

**【货号】** BC-C-HU-156**【规格】** 1\*10<sup>6</sup> 个/T25 培养瓶（或冻存管）**【保存】** 液氮保存，长期**【产品介绍】**

英文名称	NHDF（STR 鉴定正确）
中文名称	正常人皮肤成纤维细胞（STR 鉴定正确）
种属	人源
生长特性	贴壁生长
细胞形态	成纤维细胞样
传代比例	1:2-1:4
换液频率	2~3 次/周
培养体系	DMEM 高糖+10% FBS+1% P/S
培养条件	5% CO <sub>2</sub> ; 37℃
冻存条件	冻存液：90%FBS+10%DMSO；液氮中长期保存。
生物安全等级	1 级

**【操作步骤】****【细胞复苏】**

1、取出 1mL 冻存管后，迅速放入 37℃ 水浴锅中不断摇晃使其解冻，直至冻存管中无结晶（此过程尽量在 2min 内完成）；

2、准备 15mL 离心管，加入 2-6mL 完培，将冻存管中的细胞悬液移至离心管，1000 rpm 离心 3~5min；（比较难养的细胞可适量增加离心管中的完培）

3、吸弃上清，用新鲜培养基重悬细胞，接种至无菌的培养器皿中，轻晃动混匀后放入 37℃、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。

注：复苏第二天若细胞状态较好，但漂浮碎片较多可做换液处理；

复苏的细胞需要时间恢复状态，当复苏好后密度低于 80%时，2 天内暂时不要换液，细胞生长状态恢复后再进行后续传代等操作；

### 【细胞传代】

当细胞汇合度达到 80%-90%，即可传代培养。

收集细胞：贴壁细胞可以参考以下方法 1、吸去培养液，加入不含钙镁的PBS，轻轻润洗瓶底 1-2 次，吸弃PBS；2、加入 0.25%胰酶-EDTA消化液（T25 瓶 1-2mL，T75 瓶 2-3mL），铺匀瓶底放入培养箱中消化 1-2min；（部分细胞贴壁较牢，可采用分步消化：将消化下来的细胞转移至离心管终止，在培养瓶中加入胰酶继续消化，直至大部分细胞脱落）3、倒置显微镜下观察大部分细胞变圆脱落，迅速加入完全培养基终止消化，完培与胰酶比例为 2:1；4、轻轻吹打细胞后吸出转移至离心管中。**半贴壁半悬浮细胞需先收集悬液至离心管再参考贴壁细胞操作。**

离心：收集好的细胞在 1000rpm条件下离心 3~5min，离心好后弃除上清液。

接种：准备好新的培养瓶并添加适量完全培养基，在离心管加入 1-2mL完全培养基重悬吹打均匀，初次传代将细胞悬液按 1:2 比例接种到新的培养瓶中，后续可根据细胞实际情况按 1:2-1:4 的比例传代；接种完成后放入 37℃、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。

悬浮细胞建议采用半换液传代：将培养瓶站立静置 5-10min，肉眼可见细胞沉底，吸取 1/2~2/3 上清至离心管离心，将瓶内剩余悬液按 1:2 或 1:3 的比例转移至新的培养瓶，将离心管中的细胞重悬后放入培养瓶添加新鲜完全培养基即可。

### 【细胞冻存】

收集细胞参考细胞传代步骤。

冻存液重悬：细胞按照传代步骤收集细胞至离心管并计数，根据计数的密度决定细胞冻存数量，一般推荐细胞冻存密度为  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  个活细胞/管。离心后弃上清，加入配制好的冻存液重悬，分配到冻存管中，每管 1mL。

冻存：将冻存管放入程序降温盒中进行梯度降温，然后放入-80℃冰箱降温，24h后将冻存管转入液氮罐中。若没有冻存盒，可于冰箱 4℃放置 30min，随后转移至-20℃冷冻 2h，接下来将其放于-80℃超低温冰箱中过夜，最终放置于液氮中以长期保存。

### 【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柜内操作，并注意防护。所有废液及接触过此细胞的器皿需灭菌后方能丢弃。

（2）若细胞在操作过程中发生污染，需对污染的细胞进行灭活方可丢弃。

（3）本库的细胞系（株）仅用于科研工作，未经许可不得用于其他目的，使用者不得将本库细胞系（株）转让给第三者。

（4）细胞到货后建议在前 3 代时冻存一批细胞种子以备后续用。