

树鼩原代肝细胞

Primary Tupaia Hepatocytes

(Cat# LV-PTH001/2)

(仅用于科学研究)

为确保实验人员安全及生物安全，请在接触本产品及其废弃物时佩戴防护口罩、乳胶手套以及防护眼罩（复苏时）等必要的防护用品，严格按照本说明书操作，实验结束后所产生的废弃物按照国家、省、市级相关法律法规，进行无害化处理，确保生物安全。

I 简介

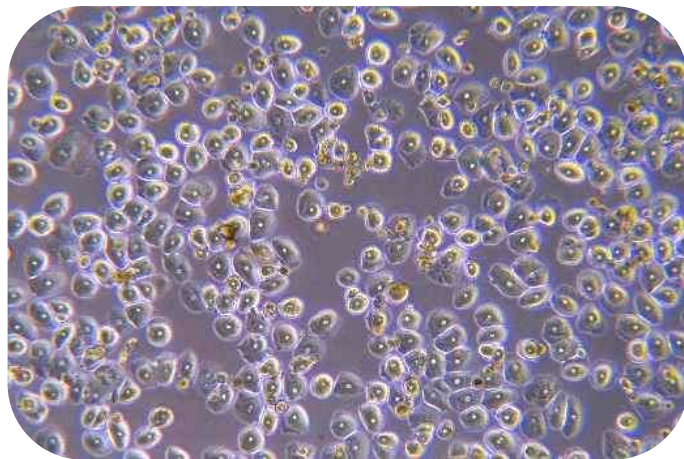
立沃生物科技是一家专注于原代肝细胞分离、冻存与再生的技术型企业。树鼩原代肝细胞分离自人工饲养条件下的树鼩（Tree Shrew/ *Tupaia belangeri*），利用我司自主知识产权的高效冻存技术，标准化、规模化分离与冻存的原代肝细胞，细胞复苏后可贴壁生长，可用于肝炎病毒（HBV/HCV）、新药研发等领域。冻存树鼩原代肝细胞可维持培养约两周。为保证细胞的原始特性，建议肝炎病毒（HBV/HCV）感染及药代研究应尽可能在铺板后 3 天内完成。

II 试剂与材料

- 树鼩原代肝细胞（Cat# LV-PTH001）
- 复苏培养基（贴壁肝细胞需要，Cat#LV-Rec001）
- 纯化培养基（如需要，随细胞赠送）
- 铺板培养基（贴壁肝细胞需要，Cat#LV-WEP003）
- 维持培养基（贴壁肝细胞需要，Cat#LV-WEM003）
- 胶原包被培养板（贴壁肝细胞需要，Cat#LV-Coated）
- William's Medium E（WE）培养基（悬浮肝细胞需要，客户自备）
- 非 TC 处理板（悬浮肝细胞需要，客户自备）
- 无菌 15mL 离心管
- 宽口移液枪头（普通移液枪头剪去尖头，再灭菌使用）
- 移液枪
- 恒温水浴锅（37℃ 预热，请用温度计校准）
- 冷冻水平离心机（带水平转子，可离心 15mL 离心管）
- 生物安全柜
- 37℃/5%CO₂ 培养箱
- **重要提示：解冻时，冻存细胞转移必须使用液氮转移；在整个复苏实验过程中必须全程使用宽口枪头。**

III 悬浮细胞的复苏

1. 生物安全柜中，将 10mLWE 培养基加入到 15mL 离心管中，37℃ 恒温水浴锅预热 20 分钟，然后转移



到生物安全柜中待用；纯化培养基冰浴或 4℃ 放置待用（如需要）；WE 培养基 37℃ 预热。

2. 将冻存的肝细胞从液氮中迅速转移至 37℃ 恒温水浴锅中。将冻存管尽可能多的浸入水中（冻存管管盖保持在液面以上），于水中顺时针大范围划圈。
3. 解冻冻存管约 90~120s，至冻存管中只有小块碎冰漂浮即可。
4. 用 75% 酒精消毒冻存管，并将其转移到生物安全柜。
5. 用宽口枪头将细胞吸出，并以滴加方式转移至 10mLWE 培养基（**注意：冻存管与枪头上残留细胞，可吸取 1mL WE 培养基润洗冻存管与枪头并将其混入离心管的培养基中**），轻微上下颠倒离心管 2-3 次混匀。
6. 50g，常温离心 5 分钟。去上清，用 WE 培养基重悬，用台盼蓝排除法（V_{细胞悬液}: V_{0.4% 台盼蓝}=9: 1，**细胞活率使用血球计数板手工计数，勿用细胞计数仪；细胞总数使用细胞计数仪计数**）测定肝细胞的活力、细胞总数，建议细胞总数检测 3 次，求取平均值；为节约时间，细胞活率检测 1 次。根据客户实验要求确定铺板密度和药物浓度，如做悬浮细胞代谢功能测试，推荐铺 12 孔板或 24 孔板，铺板密度为 1 × 10⁶ cells/ml，1ml/孔（参考团体标准 T/CSCB 0008-2021）。
7. 如果细胞活力低于 70%，可利用纯化培养基去除死细胞：将细胞悬液离心，100g 常温离心 5 分钟，去上清，用 2mL 纯化培养基（免费提供）重悬细胞，然后沿管壁向离心管小心加入 1mLWE 培养基（**切勿扰动下层，加入后可见明显分层**）；800g，4℃ 离心 10 分钟（升速为 9，降速为 1），离心后，吸取纯化培养基和 WE 培养基之间的浑浊带（活细胞层），转移到新的 15mL 离心管中，加入 2 倍体积的 WE 培养基；混匀后，50g，常温离心 5 分钟；去上清，用 2mLWE 培养基重悬细胞，后续计数及铺板同第 6 步骤。

IV 贴壁细胞的复苏与铺板

1. 在生物安全柜中，将 10mL 复苏培养基（Cat#LV-

- Rec001) 加入到 15mL 离心管中, 37°C 恒温水浴锅预热 20 分钟, 然后转移到生物安全柜中; 纯化培养基冰浴或 4°C 放置待用 (如需要); 铺板培养基 37°C 预热。
- 将冻存的肝细胞从液氮中迅速转移至 37°C 恒温水浴锅中。将冻存管尽可能多的浸入水中 (冻存管管盖保持在液面以上), 于水中顺时针大范围划圈。
 - 解冻冻存管约 90-120s, 至冻存管中只有小块碎冰漂浮即可。
 - 用 75% 酒精消毒冻存管, 并将其转移到生物安全柜。
 - 用宽口枪头将细胞吸出, 并以滴加方式转移至 10mL 预热的复苏培养基中 (注意: 冻存管与枪头上残留细胞, 可吸取 1mL 复苏培养基润洗冻存管与枪头并将其混入离心管的培养基中), 轻微上下颠倒 2-3 次混匀。
 - 得到的细胞悬液使用 50g, 常温离心 5 分钟。去上清, 用铺板培养基重悬, 用台盼蓝排除法 ($V_{\text{细胞悬液}}: V_{\text{0.4\% 台盼蓝}} = 9: 1$, 细胞活率使用血球计数板手工计数, 勿用细胞计数仪; 细胞总数使用细胞计数仪计数) 测定肝细胞的活力、细胞总数, 建议细胞总数检测 3 次, 求取平均值; 为节约时间, 细胞活率检测 1 次。
 - 如细胞活力大于 70%, 按照活细胞数 $1.5-1.8 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ 铺板到胶原包被培养板, 摇匀, 置 37°C/5%CO₂ 培养箱中培养 16 小时。
 - 如细胞活力小于 70%, 进行细胞纯化: 将细胞悬液离心, 100g, 常温离心 5 分钟, 去上清, 用 2mL 纯化培养基 (免费提供) 重悬细胞, 然后沿管壁向离心管小心加入 1mL 铺板培养基 (切勿扰动下层, 加入后可见明显分层); 800g, 4°C 离心 10 分钟 (升速为 9, 降速为 1) 离心后, 吸取纯化培养基和铺板培养基之间的浑浊带 (活细胞层), 转移到新的 15mL 离心管中; 加入 2 倍体积的铺板培养基, 混匀后, 50g, 常温离心 5 分钟; 去上清, 用 4mL 铺板培养基重悬细胞。后续细胞计数及铺板同第 6, 7 步骤。
- ❖ **重要提示:** 为了达到理想的铺板效果, 在细胞铺板时必须确保均匀, 不能出现细胞聚集情况 (肉眼可判断是否不均匀), 否则细胞在聚集区密度过高导致不易贴壁; 建议 1: 将细胞悬液混匀后, 再加入到培养孔中, 无需摇匀, 在安全柜中静置 10 分钟, 确保细胞沉降并黏附在板底 (肉眼观察是否有堆积情况), 然后再小心转移至培养箱中; 建议 2: 在铺板 96 孔和 48 孔板时, 由于孔板的边缘表面张力, 导致 “U” 型液面, 可将培养体系的培养基体积增加到 1.5-2 倍, 无需摇匀, 在安全柜中静置 10 分钟, 确保细胞沉降并黏附在板底, 然后再小心转移至培养箱中, 防止细胞在边缘堆积, 造成细胞贴壁出现边缘多中间少的情况。

V 肝细胞维持及乙型肝炎病毒感染

- 铺板培养 16 小时后, 细胞已经完全贴壁, 移除铺板培养基 (含部分死细胞), 加入维持培养基, 每 2 天换液 1 次 (注意: 如想培养体系更干净, 可用 WE 培养基清洗, 切勿使用 PBS 清洗细胞)。
- 制备感染培养液: 维持培养基中预先加入 HBV 病毒 (HepAD38 MOI=500~1000, 纯化病人血清 MOI=100~500, 更高的 MOI 可能进一步提高感染效率)。
- 移除旧培养液, 加入感染培养液, 在 37°C/5% CO₂ 培养箱中培养 16 小时或过夜。
- 移除感染培养液, 用维持培养基清洗 3 次, 再加入维持培养基, 在 37°C/5% CO₂ 培养箱中继续培养。
- HBV 感染后每 2 天收上清 1 次, 用于病毒抗原及 HBV DNA 检测, 收集 3dpi、5dpi、7dpi、9dpi 上清, 9dpi 可结束细胞培养, 更长的培养时间取决于细胞状态 (dpi: 感染后培养天数)。

VI 关于售后

如您发现产品有任何质量问题, 请您收集原始数据, 并第一时间联系公司销售或者技术支持, 公司安排人员保证售后。每个实验室条件不同, 操作人员习惯不同, 熟练程度不一样, 实验失败存在客观因素。如未严格按照说明书操作、超过售后时限, 公司不做售后, 请老师理解与支持。

售后有效期与提供的原始数据:

复苏问题: 立刻报告异常; 提供台盼蓝染色或者 AO/PI 染色。

污染问题: 复苏 96 小时以内; 提供相差显微镜照片。

纯度问题: 一个月内; 提供免疫荧光或者流式结果。

VII 联系电话

公司电话: 0755-28284050

技术支持: 19902901483 (周博士)