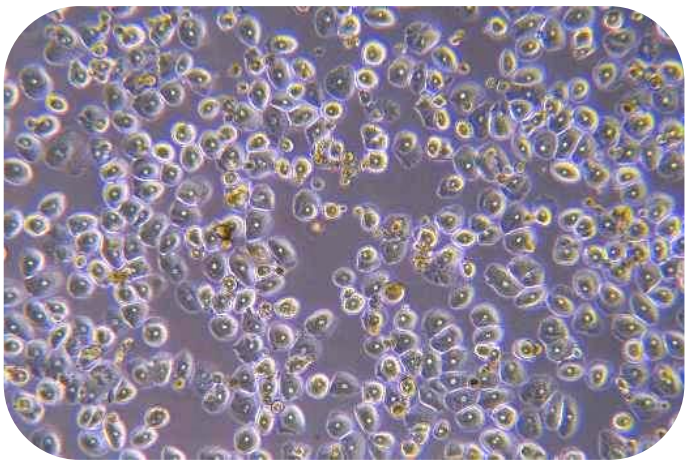
树鼩原代肝细胞

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°C/5%CO_2 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（**建议泡沫盒/保温杯转移，避免转移过程中 1-2℃/s 的复温，复温可能导致细胞活力降低**）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. 我司有两种冻存管，即 2mL 冻存管、1.4mL 冻存管（带底部二维码/侧面条形码）。解冻 2mL 冻存管约 90~120s，解冻 1.4mL 冻存管约 40-50s，至冻存管中只有小块碎冰漂浮即可。**过度解冻可能影响细胞活率与细胞得率。**
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 1×10^6 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℃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℃放置待用（如需要）；铺板培养基 37℃预热。
2. 将冻存的肝细胞从液氮中迅速转移**（建议泡沫盒/保温杯转移，避免转移过程中 1-2℃/s 的复温，复温可能导致细胞活力降低）**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. 我司有两种冻存管，即 2mL 冻存管、1.4mL 冻存管（带底部二维码/侧面条形码）。解冻 2mL 冻存管约 90 ~120s，解冻 1.4mL 冻存管约 40-50s，至冻存管中只有小块碎冰漂浮即可。**过度解冻可能影响细胞活率与细胞得率。**
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 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。
6. 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（$V_{细胞悬液}$：$V_{0.4\%台盼蓝}$=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。
7. 如细胞活力大于 70%，按照活细胞数 1.5-1.8×10^5cells/cm^2 铺板到胶原包被培养板，摇匀，置 37℃/5%CO_2 培养箱中培养。
8. 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℃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

1. 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**）。。
2. 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）。
3. 移除旧培养液，加入感染培养液，在 37℃ / 5% CO_2 培养箱中培养 16 小时或过夜。
4. 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℃/ 5% CO_2 培养箱中继续培养。
5. 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）