

## 鹅原代肝细胞

### Primary Goose Hepatocytes

(Cat# LV-PGH001/2)

(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

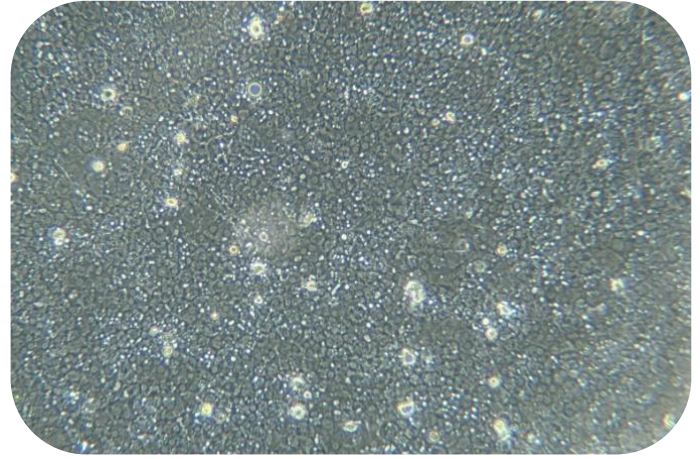
立沃生物科技是一家专注于原代肝细胞分离、冻存与再生的国家高新技术企业。鹅原代肝细胞分离自清洁级鹅，细胞纯度高（>95%），经过多种测试，复苏后细胞活力高、贴壁能力强、极化（分化）形态明显，可广泛应用于基础生命科学研究以及药物研发中。

#### II 试剂与材料

- 鹅原代肝细胞 (Cat# LV-PGH001/2)
  - 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-WEP015)
  - 维持培养基 (贴壁肝细胞需要, Cat#LV-WEM015)
  - 胶原包被板 (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
  - 一次性移液管
  - 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°C 预热, 请用温度计校准温度)
  - 冷冻水平离心机 (带水平转子, 可离 15mL 离心管)
  - 生物安全柜
  - 37°C/5%CO<sub>2</sub> 培养箱
  - 75% 酒精
- ❖ **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 10mL WE 培养基加入到 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待用; 纯化培养基冰浴或 4°C 放置待用 (如需要); WE 培养基 37°C 预热。
2. 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。
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 10mL WE 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 ( $V_{\text{细胞悬液}} : V_{0.4\% \text{台盼蓝}} = 9 : 1$ , 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  $1 \times 10^6$  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 1mL WE 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 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 2mL WE 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（ $V_{\text{细胞悬液}}:V_{0.4\% \text{台盼蓝}}=9:1$ ，**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 $1.8 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ 铺板到胶原包被培养板，摇匀，置37°C/5%CO<sub>2</sub>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 肝细胞维持培养

- 铺板培养16小时后，细胞已经贴壁，移除铺板培养基（含部分死细胞），加入维持培养基，且每2天换液1次。
- 鹅原代肝细胞具有有限的增殖能力，具有明显的接

触抑制特性，且肝细胞的分化特性以及培养时间依赖于高密度的细胞培养。

- 鹅原代肝细胞体外维持时间相对较短，建议实验在铺板后3天内完成，最长不超过5天，不建议对鹅肝细胞进行传代培养。

## 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）