胰岛细胞

Islet Cells

（Cat# LV-Lslet001/2/3/4）

(仅用于科学研究)

该说明书方法适用于本公司提取的新鲜胰岛细胞，您使用时，请按随货的说明书操作，如有任何疑问可咨询公司技术人员。

I 简介

立沃生物科技是一家专注于原代细胞分离、冻存与再生的国家高新技术型企业。我们的原代胰岛细胞分离自正规医院获取的人胰腺组织或动物胰腺组织。我们的细胞产品经过多种测试，细胞活力高、胰岛细胞团完整且包膜相对光滑、形态明显，可广泛应用于基础生命科学研究以及药物研发包括胰岛移植、糖尿病药筛、糖尿病发病机制、胰岛信号通路探索等研究中使用。

II 试剂与材料

- 胰岛细胞（Cat# LV-Lslet001/2/3/4）
- 胰岛细胞维持培养基（RPMI 1640 (10% FBS，1% Antibiotic-Antimycotic））
- 体式显微镜
- 生物安全柜
- 无菌 15mL 离心管
- 恒温水浴锅
- 37℃/ 5% CO_2 培养箱
- 非 TC-treated 100mm 细胞培养皿
- 胶原包被培养皿
- 移液枪及宽口移液枪头
- AO/PI 染料
- 0.25% trypsin-EDTA
- GSIS 试剂盒

III 细胞转运

1. 通过胶原酶灌注法分离得到胰腺细胞悬液。
2. 通过体式显微镜进行人工挑选，获得高纯度的胰岛团细胞。
3. 双尿腙染色法确定胰岛细胞纯度。利用 AO/PI 活死细胞染色确定胰岛活力和形态是否达到发货要求。
4. 胰岛细胞装在 15mL 离心管中（低温运输），通过高铁或空运至研究者的实验室。
5. 本品为无菌包装，2-8℃低温保存和运输；从包装到重新培养的冷保存时间不超过 24 h。

IV 收到细胞后的处理

1. 收到细胞后用 75%酒精对外包装进行消毒，转移至生物安全柜中。
2. 离心（100g，4℃，5 分钟），去上清，加入适量胰岛细胞维持培养基重悬细胞。
3. 用移液枪将胰岛小心吸出，加至新的 35 mm 无菌培养皿，或者 6 孔板中（不超过 300 个胰岛/孔），每孔加 3 mL 胰岛培养液；或加至 12 孔板中（不超过 300 个胰岛/孔），每孔加 2mL 培养液；在 37℃5%CO_2 条件下进行无菌培养；培养时间建议不超过 7 日，每 3 天换液 1 次。
4. 加入新鲜的维持培养基，待用。

V 细胞培养

1. 将胰岛维持培养基于 37℃恒温水浴锅中预热 20min。
2. 生物安全柜中，在非 TC-treated 100mm 细胞培养皿中加入 10mL 胰岛细胞维持培养基，备用。
3. 取适量新鲜的胰岛细胞，用 AO/PI 染色观察胰岛细胞的死活情况。
4. 悬浮培养：按照客户铺板要求，将细胞铺板到非 TC-treated 100mm 细胞培养皿，胰岛细胞培养的密度建议为 10~20 个/mL 胰岛细胞维持培养基，3~4 天半量换液，7 天一次全量换液。请尽快完成实验。
5. 贴壁培养：按照客户铺板要求，将细胞铺板到胶原包被 100mm 细胞培养皿，每 2 天换液 1 次。可用胰酶进行传代，可传 2-3 代。

VI GSIS 葡萄糖刺激下的胰岛素分泌实验

1. 溶液准备

（1）Krebs 缓冲储备液

成分	用量(g/L)
HEPES 粉末	5.955
NaCl	6.721
NaHCO3	2.012
KCl	0.373
MgCl2.6H2O	0.203
CaCl2	0.276
BSA	1.000
去离子水	定容至 1L

测定缓冲液的 PH 值，如果 PH 值不在 7.4±0.05，可用 1N NaOH 或 1N HCl 调节溶液的 PH；配制完成后，在生物安全柜内用 0.22μm 过滤器过滤和灭菌。

（2）280mM 葡萄糖储备液

成分	用量
葡萄糖	2. 52g
Krebs 缓冲储备液	50mL

配制的容量可根据需要进行调整，配制完成后，在生物安全柜内用 0.22μm 过滤器过滤和灭菌；然后分装到灭菌的 1.5mL EP 管中，每管 1mL，放-20℃储存（避免反复冻融）。

（3）28mM 葡萄糖储备液（高糖）

成分	用量
280mM 葡萄糖	1mL
Krebs 缓冲储备液	9mL

（4）2.8mM 葡萄糖储备液（低糖）

成分	用量
28mM 葡萄糖	1mL
Krebs 缓冲储备液	9mL

2. 操作步骤

1. 用 75%酒精浸泡镊子后用无菌纱布擦拭干净，放在另一块无菌纱布上。
2. 取一个 12 孔板，设置第一列 3 个孔，分别为 A1，B1，C1，第二列 3 个孔，分别为 A2，B2，C2，第三列 3 个孔，分别为 A3，B3，C3，第四列 3 个孔，分别为 A4，B4，C4。
3. 在第一列孔板 A1，B1，C1 中放入直径 12mm，孔径 0.4μm 的筛网，A1，A2，A3，B1，B2，B3，C1，C2，C3 都加入 1mL 低糖葡萄糖储备液；A4，B4，C4 加入 1mL 高糖储备液（加储备液时，沿孔壁加入并往筛网中轻轻加少许储备液，起到平衡的作用，注意枪头不要戳到筛网底部，容易戳坏）。
4. 将需要刺激的胰岛吸到筛网中（尽量不要吸取培养基），适当摇晃一下清洗，用镊子提起筛网，放在无菌纱布上吸干液体，放到 A2，B2，C2 中，然后放入 37℃/5% CO_2 培养箱中浸泡 1h（目的是让胰岛适应该环境）。
5. 1h 后再用镊子提起筛网，放在无菌纱布上吸干液体，再放入 A3，B3，C3 中，然后放入 37℃/5% CO_2 培养箱中刺激 1h；
6. 在刺激的这 1h 中，准备好足够的无菌 1.5mL EP 管，做好标记；
7. 1h 后，从培养箱中取出 12 孔板，沿孔壁和筛网的缝隙中吸出刺激液，并放入标记好的 EP 管中，然后用镊子提起筛网，放在无菌纱布上吸干液体，再放入 A4，B4，C4 中，然后放入 37℃/5% CO_2 培养箱中刺激 1h。
8. 1h 后，从培养箱中取出 12 孔板，沿孔壁和筛网的缝隙中吸出刺激液，并放入标记好的 EP 管中，吸出刺激液后，往 A4，B4，C4 中加入 1mL RPMI1640（10%FBS+1%Anti-Anti），放入 37℃/5% CO_2 培养箱中培养，装了样并标记好的 EP 管放到-20℃指定地存放（一周内检测的可放在 4℃冰箱存放）。
9. Elisa 试剂盒检测上清中的胰岛素含量。

VII 胰岛细胞移植

根据不同受体和移植位点的需求或者具体实验要求，挑取指胰岛当量（IEQ）的胰岛细胞，移植到指定受体的具体移植位点中，每天监测受体的血糖变化和身体状况并作记录。

正常情况下 1 只 C57 糖尿病小鼠需要 400 个胰岛可明显看到降血糖效果。

VIII 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：

污染问题：收到货 48 小时以内；提供相差显微镜照片。

纯度问题：一个月内；双尿腙染色法可确定胰岛细胞纯度。

IX 联系方式

公司电话：0755-28284050
技术支持：19902901483（周博士）