

## 小鼠骨髓间充质干细胞永生化+GFP

### 细胞详述

骨髓间充质干细胞是骨髓基质干细胞，对骨髓中的造血干细胞（HSC）不仅有机械支持作用，还能分泌多种生长因子（如 IL-6, IL-11, LIF, M-CSF 及 SCF 等）来支持造血。骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 具有多向分化潜能，能促进间充质组织的再生，如：骨、软骨、肌肉、韧带、肌腱、脂肪及基质等组织。

在骨髓中，BMSCs 占骨髓有核细胞总数的 0.001%~0.1%，含量极低。而同时，由于组织工程需要大量的种子细胞，从啮齿类动物骨髓分离 BMSCs 的技术上的难度限制了许多实验的开展。体外分离培养纯度高、活力强、生物特性均一的 BMSCs 对组织工程及细胞的体内、体外实验显得至关重要。

该细胞通过慢病毒转染的方式携带 SV40+GFP 基因。

### 细胞筛选

该细胞为稳定转染 GFP 的细胞，随细胞传代次数的增加，其 GFP 荧光强度会逐渐减弱。若实验要求需要维持荧光强度，可以加入嘌呤霉素进行再次筛选。建议收到细胞后至少传 3 代，冻存留种后再进行筛选。

初次进行细胞筛选时，建议加入终浓度为 1ug/ml 嘌呤霉素的完全培养基维持培养，若无细胞漂浮或者漂浮较少，即可更换为含 2ug/ml 嘌呤霉素的完全培养基继续筛选，以此类推，至最高药物浓度为 5ug/ml。若筛选过程中，漂浮细胞大于 60%，则停止筛选，换成正常培养基培养，至细胞密度约 80%，可继续加入同浓度嘌呤霉素进行筛选。当加入 5ug/ml 嘌呤霉素时细胞正常增殖，可停止筛选，用不含药完全培养基正常培养。

### 细胞特性

- 1) 组织来源于实验动物的正常骨髓血组织。
- 2) 细胞鉴定：CD44 免疫荧光染色为阳性。
- 3) 经鉴定细胞纯度高于 90%。
- 4) 不含有 HIV-1、HBV、HCV、支原体、细菌、酵母和真菌。
- 5) 细胞生长方式：长梭形细胞，不规则细胞，贴壁培养。

### 培养基

我们推荐使用 delf 原代间充质干细胞培养体系作为体外培养原代骨髓间充质干细胞的培养基。

| 名称                | 体积    | 浓度      | 保存条件    |
|-------------------|-------|---------|---------|
| 原代间充质干细胞细胞基础培养基   | 500ml | 1×      | 4℃、避光   |
| 原代间充质干细胞培养添加剂     | 5ml   | 100×    | -20℃、避光 |
| 胎牛血清 (FBS)        | 50ml  | 终浓度 10% | -20℃、避光 |
| 双抗 (青霉素/链霉素, P/S) | 5ml   | 100×    | -20℃、避光 |

产品的运输和保存：视天气状况和运输距离远近，公司与客户协商后选择下述方式中的一种进行。

1) 1mL 冻存细胞悬液装于 1.8ml 的冻存管中，置于装满干冰的泡沫保温盒中进行运输；收到细

网址：www.hfwanwu.com

电话：400-1016-218

地址：合肥市蜀山区长江西路 248 号 11 层



胞后请尽快解冻复苏细胞进行培养，如无法立刻进行复苏操作，冻存细胞可在-80℃的条件下保存1个月。

2) T-25 培养瓶充满完全培养基后进行常温运输；收到细胞后请镜下观察细胞生长状态，如铺瓶率超过 85% 请立即进行传代操作，如悬浮的细胞较多，请将培养瓶至于培养箱中静置过夜以帮助未死亡的悬浮细胞能够再次贴壁。

## 操作流程

### 复苏

- 1、将恒温水浴锅中的水预热到 37℃；
- 2、准备一支 15ml 离心管，加入 5ml 含 10%FBS 的完全培养基，放入 37℃水浴锅中预热；
- 3、戴上护目镜，厚毛线手套后，从液氮罐中取出要复苏的细胞，尽快转入 37℃恒温水浴锅中复温晃动冻存管以提高复温速率；
- 4、将融化了的冻存管中的细胞吸入事先准备的离心管中，混匀后，1000rpm 离心 5min；
- 5、准备一个 T-25 培养瓶，写上细胞名称、日期，再加入 4ml 完全培养基；
- 6、离心完成后弃去上清，用 1ml 完全培养基重悬细胞后，转入 T-25 细胞培养中，混匀后转入 CO2 培养箱中培养静置。

**注意：**从液氮中取出细胞冻存管时，若冻存管内有液氮进入，需拧松冻存管，排出内部残留的液氮，之后拧紧冻存管，置于干冰上，然后放入 37℃水浴中，避免温差太大造成液氮快速气化而爆炸。

### 传代（细胞传代建议一传二）

- 1、当细胞汇合度达到 85% 以上时，可进行传代。
- 2、在生物安全柜内，打开培养瓶瓶口，收集瓶内的培养基；
- 3、向培养瓶内加入 3ml 无菌的 1×PBS 后，水平放置培养瓶，使 PBS 能够浸润到培养瓶底面上所有的面积，吸弃 PBS；
- 4、向瓶内加入消化液 1ml，浸润底面后放入 37℃ CO2 培养箱中孵育 1~2min；
- 5、孵育完成后在倒置显微镜下观察细胞是否变圆飘起，若全部消化下来则直接向培养瓶内加入 2ml 含 10%FBS 的完全培养基中，将悬液吸入 15ml 离心管；

#### 注：如还有部分细胞未消化下来，可采用分步消化：

- ① 准备一个无菌的 15ml 离心管，加入 2ml 含 10%FBS 的完全培养基；
- ② 将消化下来的细胞吸入①中的离心管内中和（避免吹打）；
- ③ 向之前消化的培养瓶中加入 1ml 胰酶继续消化 2min 左右，轻拍培养瓶，95% 左右细胞脱落加入 2ml 含 10%FBS 的完全培养基中和，中和后的细胞悬液移入①中的离心管内。
- 6、1000rpm 离心 5min；
- 7、准备两个新的 T-25 培养瓶，各加入 4ml 完全培养基。
- 8、离心完成后，弃上清，用 2ml 完全培养基重悬离心细胞，将重悬后的细胞转入 2 个 T-25 培养瓶，每个培养瓶各 1ml；
- 9、水平放置培养瓶，震荡混匀后，将培养瓶置于 37℃，5%CO2 培养箱中静置培养。

### 冻存（细胞冻存建议每瓶 T25 冻一支）

网址：www.hfwanwu.com

电话：400-1016-218

地址：合肥市蜀山区长江西路 248 号 11 层



- 1、(1~6) 参照传代步骤
- 7、离心完成后，弃上清，用 1mL 冻存液重悬细胞沉淀，然后转入 1.8mL 冻存管中；
- 8、将冻存管转入填充满异丙醇的程序降温盒中，之后转入-80℃冰箱中过夜降温；
- 9、第二天，取出降温完成的序降温盒中的冻存管，尽快转入液氮罐中保存。

**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台内操作，并请注意防护，所有废液及接触过此细胞的器皿需要灭菌后方能丢弃。
- 2、建议在复苏冻存细胞时始终使用防护手套、衣服和戴上防护面罩。注意：冻存管浸没在液氮中会泄漏，并会慢慢充满液氮。解冻时，液氮转化成气相可能导致容器爆炸或用危险力吹掉其盖子，从而产生飞扬的碎屑造成人员伤害。

**使用范围**

本产品仅限于科学研究，绝不可作为动物或人类疾病的治疗产品使用。

