

人永生化角质细胞 HaCaT 说明书

目录号: SCSP-5091

细胞名称: HaCaT

细胞描述: 该细胞来源于正常成年人的皮肤组织, 经体外培养后自发转化为永生化的角质细胞。

物种: 人, 62 岁男性

组织: 皮肤

完全培养液配方: 见下方备注。

批次/冻存日期: 详见 冻存管/培养瓶 标识

参考传代周期: 3-4 天

参考传代比例: 1:3-1:5

参考换液频率: 3-4 天

冻存液配方: 完全培养液 75%, FBS 20%, DMSO 5%

细胞形态: 上皮样细胞, 贴壁生长

支原体检测结果: 阴性

细菌/真菌检测结果: 阴性

STR 鉴定结果:

Amelogenin: X

CSF1PO: 9

D13S317: 10

D16S539: 9

D5S818: 12

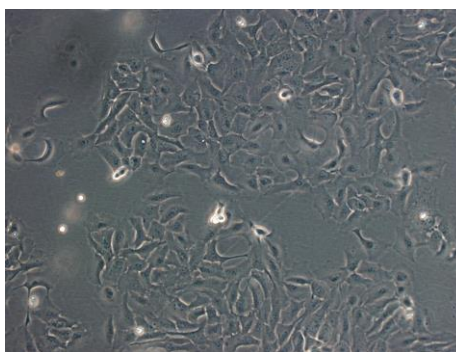
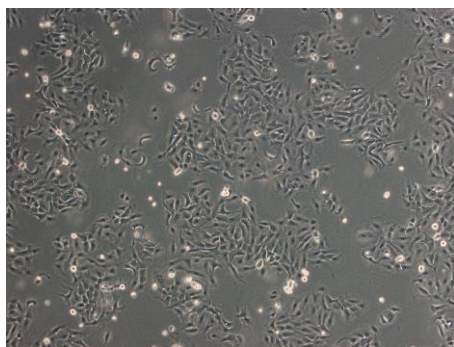
D7S820: 9

THO1: 9,3

TPOX: 11

vWA: 16

HaCaT 细胞照片:



参考文献:

Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. J. Cell Biol. 106:761-771(1988)

Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes. Exp. Dermatol. 2:179-185(1993)

p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. Carcinogenesis 14:833-839(1993)

Screening the p53 status of human cell lines using a yeast functional assay. Mol. Carcinog. 19:243-253(1997)

Role of p53 in UVB-induced apoptosis in human HaCaT keratinocytes. J. Invest. Dermatol. 109:722-727(1997)

The human keratinocyte cell line HaCaT: an in vitro cell culture model for keratinocyte testosterone metabolism. Pharm. Res. 16:766-771(1999)

Tumorigenic conversion of immortal human skin keratinocytes (HaCaT) by elevated temperature. Oncogene 18:5638-5645(1999)

备注:

1. 人永生化角质细胞 HaCaT 完全培养液 (目录号: SCSP-650) 配方:

DMEM 培养基 (Gibco, 货号 11995065): 90%

胎牛血清 FBS (Gibco): 10%

2. 我库冻存时, 每支冻存管约含 1×10^6 细胞量, 体积为 $500 \mu\text{l}$, 预期存活率 70%, 建议复苏至 1 个 T25 培养瓶中。

中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库/干细胞



附件 1：细胞收到后的注意事项

1. 用户收到细胞时，请先核对细胞培养瓶或冻存管上标注的细胞名称是否与所订购的细胞名称一致，并请检查培养瓶是否有破损或漏液、冷链物流包装盒内干冰是否完全挥发等异常现象。如发现问题，请拍照后及时与我们联系和反馈。

2. 用户收到电子发票时，请仔细核对发票信息（包括发票抬头、纳税人识别号或统一社会信用代码等），并尽快核销或报销。**请勿用该发票再次办理重复汇款！**

3. 用户收到细胞后，请再次阅读《细胞说明书》（用户登录后可在网页下载查看），并按照细胞培养的基本操作流程进行操作，切勿擅自更换培养液体系。

（1）如订购冻存状态的细胞，请将收到的细胞冻存管转移至-80 度低温冰箱或液氮罐中保存，并尽快安排复苏。

（2）如订购复苏状态的细胞，请将收到的细胞培养瓶放置在 37°C 培养箱内静置 2 小时，并镜下观察细胞状态。细胞因沿途运输或温度较低而出现皱缩等现象，属正常情况。如没有发现污染等异常情况，请按照常规方法进行操作。除非特别说明，我们通常不会在细胞及培养液中添加抗生素，并建议**用户可根据自身需要和实验室具体情况自行添加**（通常 100U/ml 青霉素和 100U/ml 链霉素），以预防细菌污染的发生。

① 对于复苏状态的贴壁细胞而言，细胞培养瓶中灌满的培养液已包含血清或其他添加物，**请收集后加入抗生素，并继续用于该细胞的换液或传代。**

② 对于复苏状态的悬浮细胞而言，请根据细胞的合理密度，使用**半换法**进行换液或传代。半换法传代时，可直接向培养瓶中添加等体积的新鲜培养液，然后将悬浮细胞吹打均匀后移入两个新的 T25 培养瓶中培养。

③ 某些细胞贴壁能力较弱，在邮寄过程中可能发生部分细胞脱落、漂浮等情况。请将培养瓶内的培养液（包括漂浮、脱落的细胞）收集至离心管，1000rpm 离心 5 分钟后，将上清培养液转移至新的离心管备用。向离心后的细胞沉淀中加入少量胰酶，轻轻吹打并作用 1-2 分钟，之后用适量完全培养液中止反应，再次吹打后将细胞悬液转移至新的 T25 培养瓶，常规培养。另外，用户可根据细胞融合度对原培养瓶内的贴壁细胞进行换液或传代操作。

附件 2：普通细胞的传代

一. 实验前准备：

1. 将水浴锅预热至 37-37.5 度。
2. 用 75%酒精擦拭经紫外线照射 30min 的生物安全柜台面。
3. 生物安全柜中按次序摆放好无菌的离心管、吸管、培养瓶等。

二. 细胞传代：

1. 悬浮细胞传代

请根据细胞（如 THP-1、K-562、293F 等）的合理密度，使用半换法进行换液或传代。半换法传代时，可直接向培养瓶中添加等体积的新鲜培养液，然后将悬浮细胞吹打均匀后移入两个新的 T25 培养瓶中培养。最后，请在瓶身写好细胞名称、培养代数、日期、姓名等信息。

2. 贴壁细胞传代

① 在显微镜下观察细胞密度和生长状态，当细胞生长至覆盖培养瓶的 80-90%面积时，吸去培养液并用 PBS 清洗 1-2 次，轻轻晃动瓶身使 PBS 充分接触细胞。细胞清洗后将 PBS 吸干净。

② 添加适量的 0.25%胰蛋白酶消化液，放入 37 度培养箱消化。消化时间因细胞种类、胰酶浓度和孵育温度不同而有所差别，通常为 1-3 分钟，具体时间以显微镜下观察到细胞变圆并开始脱落为准。消化时可将培养瓶放在倒置显微镜下观察，当细胞回缩、离散、变圆后及时加入 5 ml 完全培养基终止消化，再轻轻吹打细胞使之脱落。

③ 将上述细胞悬液转移至 15 ml 离心管中，1000 rpm 离心 5 min。弃上清，将细胞沉淀用 5 ml 完全培养基重悬，混匀后按一定比例进行分瓶传代。可补充新的完全培养基至细胞培养瓶（如 T25 培养瓶内培养液为 5-7 ml）。

④ 如有需要，可在第③步对细胞进行计数和存活率测定。吸取细胞悬液 20 μ l，加入 20 μ l 台盼蓝染液，混合均匀后吸取 20 μ l 混合液加入到细胞计数板计数，根据接种密度计算所需细胞液体积。

⑤ 在瓶身写好细胞名称、培养代数、日期、姓名等信息。最后将细胞放入合适条件的细胞培养箱中培养，常见的培养条件是 37℃，5% CO₂。

附件 3：普通细胞的冻存

一. 实验前准备：

1. 将水浴锅预热至 37-37.5 度。
2. 用 75%酒精擦拭经紫外线照射 30min 的生物安全柜台面。
3. 生物安全柜中按次序摆放好无菌的离心管、吸管、培养瓶等。

二. 细胞冻存：

1. 预先配制冻存液

按照冻存液配方配制冻存液，放在 4℃冰箱预冷。常用的冻存液配方是 95%完全培养液+5% DMSO，特殊配方请参见细胞说明书。

2. 收集细胞

当细胞生长至 80%-90%融合度时，吸去培养液并加入 PBS 清洗，之后用胰酶消化并用适量完全培养液终止消化，1000 rpm 离心 5 min 收集细胞。悬浮细胞可直接转入离心管通过离心收集。

3. 加入冻存液

弃上清，在细胞沉淀中加入适量冻存液，重悬后细胞计数，并按照一定的细胞密度分装到冻存管中（通常每支冻存管的细胞数量为 50-100 万，冻存体积为 0.5-1 ml）。请在冻存管上标明细胞名称、培养代数、冻存日期、批次号等信息。

4. 低温保存

将冻存管放入程序冻存盒后（每分钟 1℃降温）直接放入-80℃冰箱过夜，次日可转入液氮罐长期保存。

附件 4：冻存细胞的复苏

一. 实验前准备：

1. 将水浴锅预热至 37-37.5 度。
2. 用 75%酒精擦拭经紫外线照射 30min 的生物安全柜台面。
3. 生物安全柜中按次序摆放好无菌的离心管、吸管、培养瓶等。

二. 取出冻存管：

1. 根据细胞冻存记录表，按标签位置找到所需细胞的编号。
2. 从液氮罐中取出细胞盒，取出所需的细胞，同时核对管外的编号。

三. 迅速解冻：

1. 应遵守慢冻快融的原则。取出的冻存管细胞迅速放入已经预热的水浴锅中解冻，并将细胞面浸至水面以下不断摇动至融化。
2. 约 1-2 min 后冻存管内液体完全溶解，取出用酒精棉球擦拭冻存管的外壁，再拿入生物安全柜内。

四. 离心：

1. 将冻存管内融化的细胞用无菌吸管转移至 15 ml 离心管，并加入 5 ml 完全培养基稀释。
2. 平衡后，放入离心机中 1000-1200 rpm 离心 5 min。

五. 制备细胞悬液：

1. 吸弃上清液，留下细胞沉淀。
2. 向离心管内加入 5 ml 完全培养液，吹打制成细胞悬液。

六. 细胞计数：

一般地，细胞浓度以 2×10^5 /ml 为宜，具体浓度由细胞不同类型而定。

七. 培养细胞：

将细胞悬液转移入 T25 培养瓶内，轻轻摇晃混匀后，将 T25 培养瓶放入 37°C 和 5%CO₂ 的培养箱 24-48 小时后观察并换液，换液的时间由细胞情况而定。