

## 永生化人脑微血管内皮细胞 (hCMEC /D3)

### 产品基本信息

细胞名称：永生化人脑微血管内皮细胞 (hCMEC /D3)

种属来源：人

组织来源：脑

细胞形态：呈梭形，细长型

生长特性：贴壁生长

培养基：ECM 完全培养基

生长条件：气相：95%空气+5%二氧化碳；温度：37℃

传代方法：1:2 至 1:3，每周 3 次

冻存条件：无血清冻存液，液氮储存

支原体检测：无

### 细胞培养操作

1) **复苏细胞**：将含有 1 mL 细胞悬液的冻存管在 37℃ 水浴中迅速摇晃解冻，加 4 mL 培养基混合均匀。在 1000 rpm 条件下离心 3 min，弃去上清液，加 1-2 mL 培养基后吹匀。然后将所有细胞悬液加入含适量培养基的培养瓶中培养过夜（或将细胞悬液加入 6 cm 皿中，加入约 4 mL 完全培养基，培养过夜）。第三天换液并检查细胞密度。

2) **细胞传代**：如果细胞密度达 80%-90%，即可进行传代培养。

a、弃去培养上清，用不含钙、镁离子的 PBS 润洗细胞 1-2 次。

b、加 1 mL 消化液 (0.25% Trypsin-0.02% EDTA) 于培养瓶中，使消化液浸润所有细胞，将培养瓶置于 37℃ 培养箱中消化 1-3 min (视细胞消化情况而定)，然后在显微镜下观察细胞消化情况，若细胞大部分变圆并脱落，迅速拿回操作台，轻敲几下培养瓶后加 2-3 mL 完全培养基终止消化。轻轻打匀后装入无菌离心管中，1000 rpm 离心 5 min，弃去上清液，补加 1-2 mL 培养液后吹匀。

c、将细胞悬液按 1:2 比例分到新的含 8 mL 培养基的新皿中或者瓶中，置于培养箱中培养。

3) **细胞冻存**：待细胞生长状态良好时，可进行细胞冻存。下面 T25 瓶为例：

a、收集细胞及细胞培养液，装入无菌离心管中，1000 rpm 条件下离心 4 min，弃去上清液，用 PBS 清洗一遍，弃尽 PBS，进行细胞计数。

b、根据细胞数量加入无血清细胞冻存液，使细胞密度  $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  /mL，轻轻混匀，每支冻存管冻存 1 mL 细胞悬液，注意冻存管做好标识。

c、将冻存管放入 -80℃ 冰箱，24 h 后转入液氮灌储存。记录冻存管位置以便下次拿取。

## 培养注意事项

1. 收到细胞后首先观察细胞瓶是否完好，培养液是否有漏液、浑浊等现象，干冰运输的细胞检查干冰是否完全挥发，细胞是否解冻，若有上述现象发生请及时和我们联系。
2. 仔细阅读细胞说明书，了解细胞相关信息，如细胞形态、所用培养基、血清比例、所需细胞因子等，确保细胞培养条件一致，若由于培养条件不一致而导致细胞出现问题，责任由客户自行承担。
3. 用 75%酒精擦拭细胞瓶表面，显微镜下观察细胞状态。因运输问题，部分细胞由于温度变化及剧烈碰撞死亡破碎形成碎片，是正常现象。观察好细胞状态后，75%酒精消毒瓶壁将 T25 瓶置于 37℃ 培养箱放置 2-4h。
4. 贴壁细胞可以消化，悬浮细胞直接混匀收集细胞，900 rpm-1000 rpm 离心 3 min，弃上清。加 5 mL PBS 重悬细胞，再 900 rpm-1000 rpm 离心 3 min，用新鲜的完全培养基重悬细胞，并接种到新的培养瓶或培养皿中，置于培养箱中进行培养。
5. 请客户用相同条件的培养基用于细胞培养。
6. 建议客户收到细胞后前 3 天各拍几张细胞照片，记录细胞状态，便于和我司技术部沟通交流。由于运输的原因，个别敏感细胞会出现不稳定的情况，请及时和我们联系，告知细胞的具体情况，以便我们的技术人员跟踪回访直至问题解决。
7. 该细胞仅供科研使用。
8. 备注：运输用的培养基（灌液培养基）不能再用来培养细胞，请换用按照说明书细胞培养条件新配制的完全培养基来培养细胞。收到细胞后第一次传代建议 1: 2 传代。
9. 注意：1:2 传代就是 1 个 T25 瓶传 2 个 T25 瓶或者 2 个 6cm 皿。不是 1 个 T25 瓶传 2 个 10cm 皿。