

细胞说明书

一、细胞简介

细胞名称	hCMEC/D3 永生化人脑微血管内皮细胞		
生长特性	贴壁	形态特性	上皮细胞样
培养条件	ECM+5%FBS+1%双抗		
生长条件	气相: 5% CO ₂ ; 95% 空气 温度: 37℃		
传代方法	1:2-1:3 传代 , 2~3 天换液/传代		
冻存条件	90%FBS+10%DMSO 现配现用	支原体检测	阴性
备注			

二、细胞收到后操作流程

1. 收到细胞拿回实验室后, 先打开外包装, 用 75%酒精擦拭细胞培养瓶表面, 放到显微镜下观察细胞状态。因运输问题, 细胞会有不同程度影响, 先不要打开培养瓶盖, 放到培养箱静置 4 小时左右, 以便稳定细胞状态。
2. 静置完成后, 取出细胞培养瓶, 镜检、拍照, 记录细胞状态(所拍照片作为后期售后依据)。建议细胞传代培养后, 定期拍照、记录细胞生长状态。
3. 贴壁细胞: 若细胞生长密度超过 80%时, 根据情况传代, 若细胞未超过 80%汇合度时, 可将瓶装的完全培养液移入废液缸中, 原瓶 (T25 瓶) 保留 6-8ml 完全培养液继续培养, 直至细胞密度超过 80%以后再进行传代。
4. 悬浮细胞: 将细胞培养瓶内液体转移至离心管, 1000RPM 离心 5 分钟, 弃去上清液, 管底细胞沉淀加入 10ml 完全培养基吹打、重悬。放入新的细胞培养瓶/皿中培养过夜, 根据细胞密度及生长情况分瓶传代。

三、细胞常规培养步骤 (请严格遵守无菌操作)

- 1) 复苏细胞: 将含有 1mL 细胞悬液的冻存管在 37℃ 水浴中迅速摇晃解冻, 加入 5mL 培养基混合均匀。在 1000RPM 条件下离心 5 分钟, 弃去上清液, 补加 1-2mL 培养基后吹匀。然后将所有细胞悬液加入培养瓶中培养过夜 (或将细胞悬液加入 6cm 皿中, 加入约 6ml 培养基, 培养过夜), 第二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。

1、对于贴壁细胞，传代可参考以下方法：

1. 弃去培养瓶中上清液，用不含钙、镁离子的 PBS 润洗细胞 1-2 次。
2. 加 1-2ml 消化液 (0.25%Trypsin-0.53mM EDTA) 于培养瓶中，置于 37℃ 培养箱中消化 1-2 分钟，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 5-6ml 完全培养基，轻轻吹打细胞层，尽量把细胞层吹落、吹散。
3. 吹打匀后吸出，在 1000RPM 条件下离心 5 分钟，弃去上清液，补加 1-2ml 培养液后吹匀。
4. 将细胞悬液按合适的比例分到新的培养瓶或培养皿中，加入对应体积的培养基后放入培养箱培养。

2、对于悬浮细胞，传代可参考以下方法：

方法一：收集细胞，1000RPM 条件下离心 5 分钟，弃去上清液，补加 1-2ml 培养液后吹匀，将细胞悬液按合适的比例分到新的培养瓶或培养皿中，加入对应体积的培养基后放入培养箱培养。

方法二：可选择半数换液方式，弃去半数培养基后，将剩余细胞悬起，将细胞悬液按合适的比例分到新的培养瓶或培养皿中，加入对应体积的培养基后放入培养箱培养。

3) 细胞冻存：待细胞生长状态良好时，可进行细胞冻存。贴壁细胞冻存时，弃去培养基后加入少量胰酶，细胞变圆脱落后，进行离心收集，1000RPM 条件下离心 5 分钟，去除上清，按冻存数量加入血清及 DMSO，冻存比例为 90%FBS+10%DMSO。

特别注意：

1. 收到细胞后请尽快更换为含 **10% FBS** 的新鲜培养基，不建议使用原瓶中运输用培养基。
2. 如签收时出现培养瓶壁破裂，漏液等情况请及时拍照并联系实验室。
3. 细胞任何售后问题，均需拍照存档并及时联系客服。