人脐静脉血管内皮细胞永生化-绿色标记 （HUVEC-GFP）

资源编号：BTCC-6044

生长特性	贴壁
培养环境	37℃，5%CO2
传代比例	1:2-1:4，首次 1：2
培养条件	ECM 完全培养基
冻存条件	使用无血清细胞冻存液，置于液氮长期保存 *无血清细胞冻存液（货号：S002）

培养所用仪器及试剂耗材

仪器	试剂	耗材
CO2 培养箱	配套完全培养基	离心管（15ml、50ml）
生物安全柜（或超净台）	PBS	T25 细胞培养瓶
倒置显微镜	0.25%胰酶（含 EDTA）	无菌移液管（2ml、5ml、10ml）
恒温水浴锅	无血清细胞冻存液	冻存管
离心机	75%酒精	手套
电动移液器		
液氮罐		
超低温冰箱		

***发表【中文论文】请标注：由北京博沃尔斯典型培养物保藏中心提供；**

***发表【英文论文】请标注：From Beijing Bowers Type Culture Collection（BTCC）；**

细胞收货处理方式

处理步骤		T25 培养瓶	15ml 离心管	冻存管
1	快递保存温度	室温	室温	转液氮保存
2	初步平衡	T25 培养瓶表面消毒后，放 37 度培养箱平衡复温 3h 以上	无需平衡	无需平衡
3	处理方式	拍照并观察细胞，密度 80%以上即可消化传代，若密度低于 80%更换新鲜培养基放入培养箱继续培养	75%酒精棉球擦拭 15ml 离心管外部去封口膜，将 15ml 细胞悬液均匀接种到 2 个 T25 规格培养瓶（不离心）	37℃水浴中晃动快速解冻，细胞移至含 6ml 完全培养基的离心管 1000rpm 离心 5min，重悬沉淀接种到 T25 培养瓶
4	接种方式	首次建议 1:2 传代，即传成 2 个 T25 瓶	均匀接种到 2 个 T25 培养瓶（不离心）	接种到 1 个 T25 培养瓶
5	注意事项	部分细胞贴壁不紧，运输可能会脱落成团，收到后培养箱静置 3-4 小时后，收集培养基中的悬浮细胞和消化底部的贴壁细胞一起离心按 1：2 传代重铺。**瓶内运输培养基不能继续使用，请使用新鲜完全培养基培养**	15ml 离心管仅限于悬浮细胞发货，细胞悬浮在培养基中肉眼观察液体浑浊为正常情况，非污染。如成团生长特性的细胞，切勿过多吹打成单细胞。	收到先复苏一管如有活性状态问题及时与我们联系，会有技术人员与您沟通指导后再复苏第二管。**特别说明：未与我方联系擅自复苏第二管出现问题不予售后。**

贴壁细胞培养操作说明

复苏：

1、从液氮中取出细胞冻存管快速将其置入 37℃水浴中晃动快速解冻，直至冻存管中无结晶，用 75%酒精擦拭冻存管外壁放入超净台；

2、将冻存管中的细胞移至含 6ml 完全培养基的 15ml 离心管中， 1000rpm 离心 5min；

3、弃上清，沉淀用 6ml 完全培养基重悬，接种 25cm2 培养瓶，于 37℃，5%CO2 细胞培养箱中培养，24h 后换液一次。

传代：

1、细胞生长至覆盖培养瓶的 80%面积以上时，弃培养瓶中的培养液，PBS 润洗 1-2 次，去除残留培养基；

2、添加 0.25%胰蛋白酶消化液 1ml 至培养瓶中放培养箱等待，适时取出倒置显微镜下观察，细胞回缩变圆并轻敲培养瓶细胞大量滑落加入 5ml 完全培养液终止消化，将悬液转移至 15ml 离心管中，1000rpm 离心 5min；

*此处以 T25 瓶为例，其它底面积瓶皿试剂以等比例添加；

*不同胰酶、细胞密度等对消化时间长短有直接影响，终止判断依据是细胞回缩变圆并轻敲培养瓶细胞大量滑落即可终止，已变圆但无法脱落应继续放入培养箱延长消化时间切勿强行吹打；

3、弃上清，重悬细胞沉淀按 1:2 - 1:4 比例分瓶，置于 37℃，5%CO_2 细胞培养箱中培养，建议传代 24 小时后再观察，中途请勿频繁拿出否则影响贴壁；

冻存：

1、离心收集细胞，去上清；

2、取无血清细胞冻存液重悬细胞转入冻存管中，冻存密度 1x10^6 - 1x10^7/ml；

3、放入-80℃冰箱过夜，24H 后转入液氮罐长期保存；

*传统冻存方式冻存液需现配现用，需梯度降温不可直接放入-80℃冰箱；

售后须知

1.收到细胞细胞有污染现象，请于收货当天及时拍照反馈，确认为污染，重发。

2.收到细胞有漏液现象，请于收货当天及时拍照记录，培养 3 天内出现细胞污染现象，重发。

3.收到复苏形式发货的细胞状态不佳、存活率低等情况，请拍照记录，及时反馈，根据情况不能调整培养或调整培养一周后，状态没有好转，重发。

4.冻存形式发货的细胞，若收到干冰完全挥发，请于收货当天及时拍照反馈，根据指导操作未存活，重发。

5.冻存形式发货的细胞，经联系按指导操作，两管都未养活，复苏重发。

6. 细胞在不同实验室培养由于所使用培养基及血清品牌、个人操作习惯、培养瓶品牌等诸多培养条件不尽相同，导致细胞培养形态、生长速度、贴壁情况均可能有所差异，对于此类细胞适应环境生长的行为，不予过度解释或免费售后，推荐购买我司配套完全培养基。

7. 若经其它非本细胞培养体系试剂处理导致细胞出现状态问题或者污染不予免费售后，包括但不仅限于更换培养基、实验加药等。

8.若在我方未知的情况下擅自遗弃细胞，视为客户自身问题导致细胞异常，不予免费售后。

9.反馈售后问题请提供收到当天起连续 3 天照片及反馈当天的照片，照片清晰程度将最大程度影响分析原因及售后受理结果，售后期内（复苏细胞 7 天，冻存细胞 15 天）未收到任何反馈默认合格，超出售后期视为客户自身问题导致细胞异常，不予免费售后。

10.冻存形式发货的细胞，复苏第一管如有活性状态问题及时与我方联系，经技术人员沟通指导后再复苏第二管，未与我方联系擅自复苏第二管出现问题不予免费售后。

11. 建议分批冻存并抽检复苏活力，保留一部分继续培养，切勿一次全部冻存。我方不对冻存再复苏细胞活力负责，不予免费售后。