**SiDoTek™ 人脐静脉内皮细胞**

**产品货号：**HUVECs1001

**产品介绍**

血管内皮细胞是覆盖在血管内膜表面纵向排列的单层扁平细胞。其直接接触血液系统，是血液系统和组织间的屏障，具有多种生理功能。在维持血管张力、调节血压、抗血栓形成、新生血管形成等方面有重要作用。目前，人脐静脉内皮细胞被广泛应用于医学和药学研究，尤其在高血压、心脑血管疾病及肿瘤浸润、转移等的发病机制研究领域。SiDoTek™ 人脐静脉内皮细胞取自足月、自然分娩、健康的新生儿脐带组织，具有强大增殖能力及良好的性状表现。可作为细胞模型被应用于增殖、药理和病理研究。

**注意：本产品仅提供给进一步科研使用，不可用于临床治疗等其他用途。**

**产品信息**

|  |  |
| --- | --- |
| 产品名称 | SiDoTek™ 人脐静脉内皮细胞 |
| 货号 | HUVECs1001 |
| 规格 | 1×106个/管 或 1×106个/瓶 |
| 冻存代次 | P2 |
| 保存条件 | 液氮（-196℃) |

**质量控制**

1. 通过细菌、真菌、支原体、内毒素检测。
2. 通过细胞复苏活力检测，复苏存活率>80%。
3. 通过细胞周期检测，倍增周期<72 h。
4. 通过流式检测，CD31、CD105（>70%），CD34、CD45阴性（<5%）。
5. 免疫荧光法检测破壁细胞vWF阳性（>70%）。
6. 可经诱导形成血管结构。

**处理原则**

1. 严格的无菌环境。务必保证实验室整体、超净台和培养箱的清洁。
2. 规范的操作方式。请按照产品说明书描述的方式操作，严格控制变量，做好对照实验。
3. 需要合适的、质量可靠的实验耗材和试剂。本产品需使用适合贴壁细胞生长的培养容器，且不建议重复使用。使用的试剂必须经验证可靠，适宜细胞生长且批间差异小。
4. 人脐静脉内皮细胞在体外增殖能力有限，且不能长期保持分化潜能。基于丰富的细胞培养经验和性能优异的培养体系，SiDoTek™ 人脐静脉内皮细胞可在体外传代3次以上依然保持各项指标合格。但我们始终建议尽可能使用较低代次细胞进行科研工作。
5. 通常人脐静脉内皮细胞接种密度为（2.5~4）×104个活细胞/cm2。该细胞的生长与供体自身特性和后续培养体系的关系极大。我们建议根据各批次、各代次实际生长情况按比例传代培养。

**注意：本产品冻存液中含有DMSO，其具有潜在风险，请谨慎处理。**

**细胞的复苏和培养**

**一．所需材料**

1. SiDoTek™ 人脐静脉内皮细胞

2. SiDoTek™ 人脐静脉内皮细胞完全培养基（货号：SD-HUVEC-90011，以下简称完全培养基）

**二．操作步骤**

**注意：收到的细胞如24 h内复苏，可存放于-80℃冰箱；超过24 h请存放于液氮中，复苏前10 min取出，放于-80℃ , 让管中液氮挥发。**

1. 水浴锅37℃预热。
2. 完全培养基温浴到37℃。
3. 在15 mL离心管中加入5 mL以上完全培养基备用。
4. 从-80℃冰箱中取出细胞，放入37℃水浴锅中，快速晃动，使冻存液迅速融化。

**注意: 融化过程必须晃动冻存管，保证冻存液融化迅速、均匀；晃动时应避免水没过管盖造成污染；管内冻存液融化至只剩一个约2 mm直径的冰晶时，即停止水浴。继续晃动冻存管，至冰晶融化。**

1. 用75%医用酒精擦拭冻存管外表面。
2. 在超净台中打开冻存管，用巴氏吸管或移液枪吸取细胞冻存悬液，转移至先前准备的离心管中。
3. 用1 mL完全培养基洗涤冻存管1次，收集残留细胞，减少损失。
4. 细胞悬液以250×g离心4 min。

**注意：请以公式a=ω2 r（a:向心加速度；ω:旋转角速度，ω=πn/30；r:转子半径）计算相应转速。**

1. 离心后去除上清。加入2 mL完全培养基，轻柔吹打细胞沉淀，充分吹散、混匀。
2. 将细胞平均接种到1个T25培养瓶或底面积相当的培养容器中。 加入足量完全培养基， 1个T25培养瓶中培养基总量不少于5 mL。
3. 摇匀细胞，放入37℃、5% CO2饱和湿度的CO2培养箱中。

**注意：接种2 h内不可移动、观察细胞。这会严重影响细胞贴壁，造成状态不佳、细胞聚团、贴壁不均匀等情况。**

1. 复苏次日，观察细胞状态，并更换新鲜的完全培养基或传代。

**注意：若发现较多漂浮细胞或其他异常情况，应及时排查原因，并与我们联系。**

1. 之后每2天更换一次完全培养基，直到细胞生长至90%汇合，即需传代。

**细胞的传代**

**一．所需材料**

1. SiDoTek™ 0.25% Trypsin-0.04% EDTA（货号：SD-TEDTA-10001，以下简称胰酶）

2. SiDoTek™ Phosphate-Buffered Saline (1×PBS) （货号：SD-PBS-10001，以下简称PBS）

3. SiDoTek™ 人脐静脉内皮细胞完全培养基（货号：SD-HUVEC-90011）

**二．操作步骤**

1. 将完全培养基、PBS、胰酶预热至37℃。

2. 吸去培养容器中的培养基。

3. 用PBS（T25培养瓶加入约3 mL，T75培养瓶加入约6 mL）洗涤细胞2次，注意动作轻柔，清洗全面。吸去PBS。

4. 加入胰酶（T25培养瓶加入约1.5 mL，T75培养瓶加入约3 mL），迅速铺匀，保证充分接触细胞表面。

5. 显微镜下观察消化情况，约70%~80%细胞收缩变圆后，轻拍培养容器外壁，使细胞脱离培养表面。

6. 立即加入完全培养基（T25培养瓶加入约3 mL，T75培养瓶加入约6 mL），随即轻摇培养容器，使培养基和胰酶迅速混匀，终止消化。

7. 使用吸管或移液管吸取细胞悬液，吹打培养容器底面数次，尽可能将细胞都吹打下来。

**注意：吹打动作不可剧烈，避免产生大量气泡，否则可能损伤和损失细胞。**

1. 将细胞悬液转移至离心管中。用PBS（T25培养瓶加入约3 mL，T75培养瓶加入约6 mL） 洗涤容器1次，收集残留细胞。
2. 收集的所有细胞悬液以250×g离心4 min。
3. 离心后去除上清。加入2 mL完全培养基，轻柔吹打细胞沉淀，充分吹散、混匀。
4. 将细胞按（2.5~4）×104个活细胞/cm2接种至适宜的培养容器内。

**注意：培养人脐静脉内皮细胞对于细胞密度有较高的要求，我们建议有条件且计数效率较高的情况下，进行手工计数，以期获得精准的细胞浓度指导接种；在没有精确计数条件的情况下，按照适宜比例传代是更好的方法。通常SiDoTek™ 人脐静脉内皮细胞传代比例为1:3，72 h内生长至可传代汇合度。请根据细胞实际生长情况调整传代比例。**

1. 摇匀细胞，放入37℃、5% CO2饱和湿度的CO2培养箱中。
2. 传代次日，观察细胞状态。若发现较多漂浮细胞，应予以换液。

14. 待细胞生长至90%汇合，即需传代或冻存。

**注意：正常情况下SiDoTek™ 人脐静脉内皮细胞每代生长时间不超过72 h，中途不需要换液。频繁换液会破坏构建起的细胞微环境。**

**细胞的冻存**

**一．所需材料**

1. SiDoTek™ 通用无蛋白非程序冻存液（货号：SD-NCPF-10001）

2. SiDoTek™ 通用血清型程序冻存液（货号：SD-CYRO-10001）

**二．操作步骤**

1. 若选用SiDoTek™ 通用血清型程序冻存液，请在操作前将程序降温盒放入4℃冰箱内预冷。

2. 待细胞生长至可传代的密度，即可准备冻存。

3. 细胞消化请参考SiDoTek™ 人脐静脉内皮细胞的传代操作步骤1~9。

4. 离心后去除上清，用适量冻存液均匀重悬细胞。

5. 将细胞按比例或数量分装至冻存管中。

**注意：在没有成熟的计数条件下，我们建议将细胞按比例分装冻存即可，长时间在非培养条件下放置会严重影响细胞的状态。在计数时，我们建议将细胞放置于4℃冰箱内，以减弱细胞代谢，较好地保持细胞状态。**

6. 若选用SiDoTek™ 通用血清型程序冻存液，将冻存管放入预冷的程序降温盒中，再将程序降温盒放入-80℃冰箱中。若选用SiDoTek™ 通用无蛋白非程序冻存液，请将冻存管直接分散放入-80℃冰箱中。

**注意：细胞冻存期间，特别是开始冻存的4 h内，不可打开冰箱门，这将严重影响细胞冷冻存活率。**

7. 8 h后即可将细胞转移入液氮长期保存。

**注意：细胞不可长期保存在-80℃冰箱中。我们建议在-80℃冰箱中的保存时间不要超过48 h。**