上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co.， Ltd
电话：400-666-5481　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：3008007435@qq.com

内皮细胞培养基

货号：R43108

规格：500ml

储存条件：基础培养基 2-8℃，添加剂-20～-80℃；混合后 2-8℃

有效期：12个月

产品简介：

内皮细胞培养基是一款针对正常内皮细胞体外最佳生长而设计的完全培养基。它是一种无菌液体培养基，含有必需和非必需氨基酸、维生素、有机和无机化合物、激素、生长因子、微量矿物质。其适用于选择性地支持体外不同组织血管、角膜、淋巴管等来源内皮细胞的生长。

产品特性：

含外源动物蛋白成分，大大降低各类病毒、霉菌和支原体等的污染风险。

可用于原代分离，且培养过程无需包被培养板。

产品内容：

组分	规格	数量	储存
Endothelial cell Basal Medium内皮细胞基础培养基	450mL	1 瓶	2-8℃
Endothelial cell Supplement内皮细胞添加剂	50mL	1 瓶	-20～-80℃

实验准备：

1. 内皮细胞培养基配制

1.1. 37℃快速解冻内皮细胞培养基添加剂，快速溶解时不易破坏添加剂中营养物质，时间大致为10min。待添加剂融化后摇匀，分装或直接按比例添加到基础培养基中，分装后添加剂立即储存于-20℃至-80℃，避免反复冻融。

1.2. 将添加剂以10%比例加入到内皮细胞基础培养基中，混匀，即为内皮细胞培养基。

混合后培养基可在 2-8℃ 稳定储存 2-3 周，不建议使用已配制超过 3 周的培养基。

1.3. 内皮细胞培养基能够选择性的促进正常人类微血管内皮细胞体外培养中的增殖和生长，并为其达到最理想营养平衡状态。

操作方法(以下步骤皆应在无菌条件下操作)

1. 细胞复苏(10cm dish)

1.1. 从液氮或-80℃冰箱中取出冻存的细胞，迅速放入 37℃水浴快速融解。

1.2. 在生物安全柜或超净台中，将解冻后的细胞悬液缓慢加入 5 mL 预温的内皮细胞培养基。

1.3. 1500rpm 离心 5 min，吸掉上清，加入 10ml 内皮细胞培养基重悬细胞。

1.4. 将细胞均匀铺到培养皿中，水平十字振动培养皿使细胞均匀分布，5% CO_2的 37℃恒温细胞培养箱中培养 24 小时后观察细胞状态。

1.5. 24h 后更换新鲜内皮细胞培养基继续培养，每 2-3 天更换培养液。

2. 传代培养

2.1. 在显微镜下观察细胞，当细胞融合度达到 90%，即可传代。

2.2. 在超净台/安全柜中，吸掉原有培养基，加入 DPBS 缓冲液(不含钙.镁) 溶液清洗一次，加入细胞消化液使之完全覆盖皿/瓶底。

2.3. 室温孵育 4-5 分钟或 37℃孵育 2-4 分钟，显微镜下观察大部分细胞脱离皿底即停止消化。

2.4. 加入消化液 2 倍体积的内皮细胞培养基，用移液器轻轻吹打瓶壁上未完全脱离的细胞，并轻轻吹打混匀，使细胞完全分散。

2.5. 将细胞悬液转移到 15 mL 离心管中，1500 rpm 离心 3 min。

2.6. 弃上清，加入内皮细胞培养基，重悬细胞，计数。1：2-1：4 比例传代，或按 2-5×10^4 cells/cm^2 传代，均匀铺在培养皿/瓶中，置于 37℃，5%CO_2 培养箱中培养。

建议：所加液体体积根据培养容器不同，把控也有不同，见下表。

常见实验耗材	消化时所需消化液体积	培养时所需培养基体积	清洗时所需 PBS体积	消化所需时长
12 孔板	500ul	1ml	500ul	根据 37℃消化 3min 后镜检情况决定是否需要延长消化时间
6 孔板	1ml	2ml	1ml	
6mL 培养皿	2ml	3ml	2ml	
10mL 培养皿	4ml	8ml	3ml	
T175 方瓶	10ml	28ml	8ml	

3. 细胞冻存

3.1. 细胞达到 90%汇合度， 吸掉原有培养基，PBS 清洗一次。

3.2. 加入细胞消化液使之完全覆盖皿/瓶底，室温孵育 4-5min 或 37℃孵育 2-4min分钟，显微镜下观察大部分细胞脱离皿底即停止消化。

3.3. 加入消化液 2 倍体积的内皮细胞培养基，用移液枪轻轻吹打瓶壁上未完全脱离的细胞，并轻轻吹打混匀，使细胞完全分散。

3.4. 将细胞悬液转移到 15 mL 离心管中，1500 rpm 离心 3 min，吸掉上清。

3.5. 加入适量无血清细胞冻存液（治疗级），调整细胞冻存密度在 1×10^6 cells/mL左右，每支冻存管分装 1.5-2ml。

3.6. 直接放入-80℃，24h 后转入液氮中长期保存。

注意事项：

1、移液操作：使用内皮细胞培养基时应当采用无菌条件下的移液操作，并避免出现气泡和异物。

2、细胞接种：将内皮细胞接种到预先涂覆的细胞培养底物上，并根据需要进行细胞划分和培养状态监测。

3、细胞增殖：使用内皮细胞培养基可促进内皮细胞的增殖和生长，建议每 3-4 天更换新的培养基。

4、细胞检测：在细胞培养期间需监测细胞的培养状态、生长状态和增殖情况。常见检测方法包括显微镜观察、蛋白质分析、免疫细胞化学等。

5、保存：内皮细胞培养基应当在 4℃低温保存，避免阳光直射和冻结。保存期长达 6个月，但是在保质期内使用会更好。打开后，建议在一个月内使用完毕。