QuiCell葵赛生物

小鼠原代肺微血管内皮细胞（一般可以传 2-3 代）

细胞详述：

肺微血管内皮细胞构成半选择性屏障，该屏障对于肺气体交换，调节液体和可溶物在血液与肺间质之间的流动具有重要意义。它还具有代谢功能，可以执行一定的非呼吸功能。在肺损伤中，肺微血管内皮细胞是活性氧类的重要靶细胞之一。在肺炎的发生过程中，神经体液介质和氧化剂作用于内皮细胞，使得细胞间隙渗透性增加，蛋白质由血液进入间质。细胞间隙渗透性的增加导致低氧血症，出现成人呼吸窘迫综合征和非心源性肺水肿。

细胞特性:

1) 细胞来源于实验动物的正常肺组织。
2) 细胞鉴定：CD31 免疫荧光染色为阳性。
3) 经鉴定细胞纯度高于 90%。
4) 细胞生长方式：上皮样，多角形细胞，贴壁培养。

运输和保存：干冰运输及复苏好存活细胞：（1）1mL 冻存管包装干冰运输，收到后-80 度冰箱保存过夜后转入液氮或直接复苏，若发现干冰已挥发干净、冻存管瓶盖脱落、破损及细胞有污染，请立即与我们联系。（2）T25 瓶复苏的存活细胞常温发货，收到后按照细胞接收后的处理方法操作。

细胞接收后的处理：

1）收到细胞后，75%酒精消毒瓶壁将 T25 瓶置于室温放置约 1h，若发现培养瓶破损、有液溢出及细胞有污染，请拍照后及时联系我们。

2）请在 4 或 5X 显微镜下确认细胞状态，同时给刚收到的细胞拍照（10×，20×）各 2-3 张以及培养瓶外观照片一张留存，作为售后时收到时细胞状态的依据。

3）贴壁细胞：**细胞在室温中放置 1h，显微镜下观察细胞的生长和贴壁情况，有些贴壁细胞在快递运送过程中会因振动脱落和脱落后成团的情况。**若镜下观察细胞的生长密度若在 60%以下，可去除培养瓶中灌液培养基（若有未贴壁的细胞需要离心回收，重悬打入到原培养瓶中）,加入新配制的完全培养基 6-8mL，放到细胞培养箱中继续培养。若细胞生长密度达 70%-80%以上，可以对细胞进行传代处理。传代过程中，若因运输振动脱落的细胞需要离心回收。

4）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 T25 培养瓶 1：2 传代 。

一．培养基及培养冻存条件准备：

1） 小鼠原代肺微血管内皮细胞配套专用完全培养基（货号： QuiCell-Pri-8324-M500）。

2）培养条件： 气相：空气，95%；二氧化碳，5%。 温度：37 摄氏度，培养箱湿度为 70%-80%。

3）冻存液：无血清细胞冻存液。

4）注意：【胰酶终止消化需用含 10%血清的完全培养基（DMEM+10%FBS）小鼠原代肺微血管内皮细胞配套专用完全培养基的血清含量不到 10%，不

能用来终止消化。即 1ml 胰酶加入 5ml10%血清的完全培养基来（DMEM+10%FBS）终止】。

二. 细胞处理：

1） 冻存细胞的复苏：：

将含有 1mL 细胞悬液的冻存管在 37℃水浴中迅速摇晃解冻，加入到含 4-6mL 完全培养基的离心管中混合均匀。在 1000RPM 条件下离心 3-5min，弃去上清液，完全培养基重悬细胞。然后将细胞悬液加入含 6-8ml 完全培养基的培养瓶（或皿）中 37℃培养过夜。第二天显微镜下观察细胞生长情况和细胞密度。

2） 细胞传代：如果细胞密度达 80%-90%，即可进行传代培养。

对于贴壁细胞传代可以参考以下方法：

1. 弃去培养上清，用不含钙、镁离子的 PBS 润洗细胞 1-2 次。
2. 加入 0.25%（w / v）胰蛋白酶-0.53 mM EDTA 于培养瓶中（T25 瓶 1mL），置于 37℃培养箱中**消化 1-2 分钟（难消化的细胞可以适当延长消化时间），**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**加入 5ml 含 10%FBS 的培养基来终止消化。**
3. 轻轻打匀后吸出，在 1000RPM 条件下离心 3-5min，弃去上清液，补加 1-2mL 培养液后吹匀。将细胞悬液按 1：2 的比例分到新 T25 瓶中，添加 6-8ml 按照说明书要求配置的新的完全培养基以保持细胞的生长活力，后续传代根据实际情况按 1:2~1:5 的比例进行。

3）细胞冻存:

原代细胞传代次数有限，收到后尽快安排实验！

下面 T25 瓶为例；

1. 细胞冻存时按照细胞传代的过程收集消化好的细胞到离心管中，可使用血球计数板计数，来决定细胞的冻存密度。一般细胞的推荐冻存密度为 1×10^6~1×10^7 个活细胞/ml.
2. 1000rpm 离心 3-5min，去掉上清。用无血清细胞冻存液重悬细胞 ，按每 1ml 冻存液含 1×10^6~1×10^7 个活细胞/ml 分配到一个冻存管中将细胞分配到冻存管中，标注好名称、代数、日期等信息。
3. 将要冻存的细胞置于程序降温盒中，-80 度冰箱中过夜，之后转入液氮容器中储存。同时记录好冻存管在液氮容器中的位置以便后续查阅和使用。

注意事项：

1. 所有动物细胞均视为有潜在的生物危害性，必须在二级生物安全台内操作，并请注意防护，所有废液及接触过此细胞的器皿需要灭菌后方能丢弃。
2. 建议在复苏冻存细胞时始终使用防护手套、衣服和戴上防护面罩。注意：冻存管浸没在液氮中会泄漏，并会慢慢充满液氮。解冻时，液氮转化成气相可能导致容器爆炸或用危险力吹掉其盖子，从而产生飞扬的碎屑造成人员伤害。