人主动脉内皮细胞永生化

货号： ZQY001

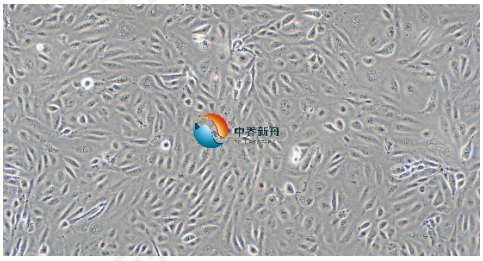
Ⅰ 产品说明

细胞名称	人主动脉内皮细胞永生化
英文名称	HAEC-Immortalized
永生化方式	通过慢病毒转染的方式携带 SV40T 及 hTERT 基因 抗性：Hygromycin 25ug/mL，Geneticin 150ug/mL
细胞形态	上皮样
生长特性	贴壁生长
传代特性	在我司推荐条件下，可以稳定传代 10 代以上，具体的传代次数根据客户使用的血清品质，培养基品牌和细胞培养环境以及个人操作手法来决定。
培养方案	基础培养基；添加物等 推荐完全培养基，中乔新舟货号： ZMY001 培养环境：95%空气+5%二氧化碳，温度：37℃
消化时间	胰蛋白酶-EDTA 消化液（0.25%）37℃环境中消化 1min 。 注：不同品牌胰酶不同细胞密度消化时间略有区别，实际操作中可从 30 秒或更短时间起始，逐步延长消化时间，以大部分细胞变圆脱落为准。
终止操作	推荐消化终止液(中乔新舟货号：CSP138)/或自配含 10%FBS 其它培养基 注：若培养基为无血清或低血清配方，不可用于终止消化。
冻存密度	贴壁细胞：每毫升 0.5-1x10^6 冻存一管（1mL/管）；
冻存条件	推荐冻存液（中乔新舟货号：CSP169 通用含血清型程序冻存液）
质量检测	经 CD31 免疫荧光鉴定，纯度可达 90%以上； 不含有 HIV-1、HBV、HCV、支原体、细菌、酵母和真菌等。
传代比例	1：2-1：3
换液频率	2-3 次/周
产品规格	干冰运输，5x10^5cells/冻存管*2； 常温运输，5x10^5cells/T25 培养瓶*1
储存温度	活细胞：37℃； 冻存管：-196℃

参考资料

细胞背景描述

内皮细胞构成了血管和其下组织的交界面。内皮细胞功能的变化是动脉粥样硬化的发病机理中的关键因素。内皮细胞能合成分泌凝血系统和纤溶系统中的活化因子和抑制因子，同时也能合成和分泌影响着血小板粘附和聚集的某些介质。内皮细胞还可以释放具有调控细胞增殖和血管壁张力功能的分子。人主动脉内皮细胞能生成诸如 t-PA 和 PAI-1 等抗凝和血栓形成因子；在 TNF-alpha 的调节下，人主动脉内皮细胞能改变其生长特性，产生 GM-CSF 等细胞因子，在细胞表面表达 ICAM-1，并产生大量的 NO 和内皮素。许多内皮水平的过程多可以通过内皮细胞的体外培养进行研究，因此，HAEC 非常适用于研究和认识血管病变和衰老的分子机理。



物种	人
组织来源	主动脉组织
生物安全等级	BSL-2
供应限制	仅供科研使用

文献奖励

科研论文引用中乔新舟产品并成功见刊，可享文献奖励。

- 发表[中文论文]请标注：人主动脉内皮细胞永生化(ZQY001)由**上海中乔新舟生物科技有限公司**提供；
- 发表[英文论文]请标注：HAEC-Immortalized (ZQY001)were kindly provided by **Shanghai Zhong Qiao Xin Zhou Biotechnology Co.,Ltd.”或“ZQXZbio”**

获取详情方式

- 关注【中乔新舟】公众号，在菜单栏点击**快速查询**，选择**文献奖励**，即可查看文献奖励详细规则；
- 咨询官方客服，获取文献奖励详细规则。

****活动最终解释权归中乔新舟生物所有****

细胞培养操作方法

培养须知	**细胞在复苏时或者消化后转移至新容器需要对新的培养器皿进行包被，以增强细胞贴壁性， 包被条件常选用重组人纤连蛋白（终浓度 2μg/cm²），鼠尾胶原 I（2-5μg /cm²），多聚赖氨酸 PLL（0.1 mg/mL），明胶（0.1%），具体根据细胞种类来选择，悬浮/半悬浮细胞无需包被。** **【风险提示】永生化内皮细胞表型漂移说明** **原代内皮细胞严格遵循 Hayflick 极限，因端粒缩短在 P5 前后整体衰老停滞，有效窗口仅 P1-3，且批次差异显著。永生化内皮细胞通过导入 SV40 大 T 抗原或 hTERT 等基因，突破此极限以实现长期增殖，但代价是不可避免的表型漂移，主要机制如下：** **1. 内皮细胞进入活跃分裂周期时，维持分化表型的转录因子网络（ERG、KLF2、FOXO1）被主动下调，导致铺路石形态丧失，CD31、vWF、VE-cadherin、eNOS 等标志物表达减弱。** **2. SV40 大 T 抗原结合 p53 和 pRb，不仅解禁增殖，还解除对 EndoMT 的抑制，导致细胞骨架重排为成纤维样。** **3. 增殖快的去分化克隆在传代中获得优势。P1-3 时典型内皮形态占多数；P4-5 起间质样克隆混入，标志物下滑；至 P8-9，梭形/成纤维样克隆比例高，发生 EndoMT。** **4. 塑料培养瓶硬度（GPa 级）远高于体内基底膜（1-3 kPa），且无血流剪切力激活 KLF2/FOXO1。硬表面通过 YAP/TAZ 通路激活 Snail、CTGF，促进 EndoMT。** **永生化内皮细胞以牺牲部分生理真实度换取实验便利性。建议用户根据实验需求，定期检测内皮标志物（CD31、vWF、VE-cadherin）及形态，高代次数据须验证后使用。**
传代步骤	1. 吸出原培养液； 2. 加入 5 mL 左右 PBS，轻轻晃动培养瓶润洗细胞，吸出 PBS 丢弃； 3. 加入 1 mL 左右 0.25%胰蛋白酶溶液（含 EDTA），轻轻晃动培养瓶使之浸润所有细胞； 4. 放入培养箱消化，显微镜下看到细胞块中间的细胞明显变圆有间隙时可终止； 5. 加入 3 mL 含血清的培养基终止消化，吹打细胞使之脱壁并在液体里反复吹打使细胞尽量呈单颗细胞的悬浮液； 6. 收集细胞悬液离心，1000 rpm/min 3-5 分钟，离心完吸出上清丢弃； 7. 加入新鲜培养基，吹打几下混匀细胞即可，按比例接种到新培养瓶，补足培养基，拧松瓶盖或使用透气瓶盖进行培养。
复苏步骤	1. 液氮取出的细胞放入干冰中转移到细胞房，提前准备好完全培养基，离心管； 2. 冻管细胞在 37°C 水浴中迅速解冻（大约 1-2 分钟）。为了减少污染的可能性，保持冻管瓶盖在水浴液面之上。一旦大部分内容物解冻，立即将冻管移出水浴，75%的乙醇消毒冻管外壁； 3. 将内容物转移到含 3-6mL 完全培养基的离心管中，轻轻混匀，离心（125 g，3～5 分钟）1000-1200rmp 去除培养基，细胞沉淀用手指弹松，添加 3mL 完全培养基混匀细胞并进行计数，用适量完全培养基将细胞密度调整至 0.6-2.0X10^5，转移至培养瓶中，于培养箱中静置培养。建议 T25 培养瓶添加 5-7mL 完全培养基。当密度达到 80%以上时传代。
冻存步骤	1. 细胞密度 80%以上，活细胞百分率达 95%以上时，将细胞按照以上步骤进行消化收集细胞沉淀进行冻存； 2. 细胞沉淀用适量 4°C 冻存液（货号：CSP169 通用含血清型程序冻存液）重悬， 建议一瓶 T25 细胞冻存一管（1mL/管），直接将分装好的细胞冻存管放于程序性降温盒置于-80℃超低温冰箱中过夜，若需液氮长期保存，需先置于-80℃至少一天后方可转至液氮罐中。 注：若不是我司冻存液请按照冻存液说明书操作，若是自配冻存液需梯度降温冻存(2-8℃，放置 40min；-20℃，放置 30min-60min；-80℃放置一天后转移至液氮保存)或使用程序降温盒降温后，再转移至液氮中保存。

到货操作指南

活细胞	1. 收到细胞，请拍 40X、100X、200X 各 2-3 张照片； 2. 用 75%酒精擦拭瓶身，封口膜可以不用撕去，满瓶培养基状态置于培养箱中静置培养 2~4h 后进行操作；悬浮细胞请将培养瓶竖立在培养箱静置，贴壁细胞/半贴壁半悬浮细胞平放静置，在此期间，请查看说明书以确定细胞属性； 3. **贴壁细胞：**观察细胞密度约 80%则可正常传代处理（有的原代细胞不可传代，请仔细查阅细胞说明书并根据实际情况决定）；观察细胞密度若细胞密度不到 80% ，建议更换新鲜完全培养基再培养 1 天后根据密度进行处理； 4. **悬浮细胞**：观察细胞密度，分瓶(5-7mL/瓶完全培养基（一般出库时可以保证 1:2）； 5. **半悬半贴细胞**：先收集上清悬浮细胞再消化贴壁细胞(部分细胞不能胰酶进行消化，请仔细查阅细胞说明书并根据实际情况决定)。 注： ● 原代/永生化细胞请提前准备好完培；细胞系产品若您没有备合适的培养基：可取出原瓶多余培养基(小部分细胞可能需要额外补足血清)，离心去除细胞碎片后 4℃冰箱保存，可作为应急使用； ● 建议在首次传代成功、细胞状态稳定后，立即冻存备份 2-3 支冻存管，以备后续实验使用，防止因意外丢失。首次传代按照等比例 1:2 进行； ● 到货发现有任何异常现象，污染，漏液，请及时拍照并反馈。
冻存管	1. 收到冻管，查看干冰量，冻管外观是否正常； 2. 若计划 7 天内复苏：可暂将细胞管存放于-80°C 冰箱；计划超过 7 天复苏或长期保存：务必将细胞管转移至液氮罐中长期存储； 注：若出现冻管外观异常，请拍照并反馈。
贴壁细胞漂浮的处理方法	**部分细胞由于贴壁松散，会出现运输后漂浮，冬天气温低时也会出现细胞收缩漂浮，属于不可避免因素，正确处理后均可以正常生长** 1. 将培养瓶内所有培养基转入无菌离心管，离心收集细胞（1200rpm，3-5min）去除旧培养基； 2. 用 PBS 重悬细胞，将所有细胞收集到一个离心管中，再次离心（1200rpm，3-5min）去除 PBS； 3. 加入 1mL 左右含有 EDTA 的 0.25%胰酶重悬细胞，混匀即可，建议震动离心管混匀，避免吹打细胞，放入培养箱消化细胞，根据细胞特性决定消化时间（TM3、TM4、293 系列约 1~2 分钟）；注：部分细胞不能使用胰酶消化，请注意查看细胞说明书；单颗漂浮的细胞不需要胰酶处理。 4. 消化好后，用移液枪轻轻吹打细胞悬液，使细胞团分散，迅速加入 3-5mL 含血清的培养基混匀以终止消化，离心（1200rpm，3min）去除胰酶； 5. 加入 5mL 左右的细胞相应的完全培养基混匀，按比例接入无菌培养瓶/皿中； 6. 显微镜下观察细胞是否成均匀分散的单颗细胞，若有 3-5 个成团的小细胞团可不用重新消化，使之贴壁后待细胞生长稳定后再次传代消散细胞。