

ИНСТРУКЦИЯ ПО РАЗМОРОЗКЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЮ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ПЕРВИЧНЫХ КЛЕТОК HUVEC

Важно: все растворы и среды должны быть предварительно подогреты до 37°C (кроме трипсина и антибиотиков, если не используются сразу).

1. ПОШАГОВАЯ ИНСТРУКЦИЯ ПО РАЗМОРОЗКЕ И ПОСЕВУ

Этап 1. Подготовка

1. Включите водяную баню, установите температуру **37°C**.
2. В ламинарном боксе подготовьте флакон T25: подпишите (дата, тип клеток, номер пассажа).
3. В ламинарном боксе внесите в пластиковый флакон T25 достаточный объем 0,2% раствора желатина, чтобы он покрыл всю поверхность дна (обычно 2-3 мл). Инкубируйте несколько минут, после чего аспирируйте желатин.
4. Налейте во флакон **5 мл свежей среды EndoBOOST** (комнатной температуры или 37°C) и поставьте в инкубатор (37°C, 5% CO₂) для уравнивания pH и температуры.
5. В стерильную центрифужную пробирку на 15 мл налейте **8 мл тёплой среды EndoBoost**.

Этап 2. Разморозка клеток

1. Достаньте криопробирку из хранилища (жидкий азот или -80°C) и **немедленно** поместите её в водяную баню 37°C.
2. Аккуратно покачивайте пробирку в бане, пока не останется маленький кусочек льда (обычно 60–90 секунд). **Не допускайте полного оттаивания и перегрева!**
3. Протрите пробирку 70% спиртом и перенесите в ламинарный бокс.

Этап 3. Удаление криопротектора (DMSO)

1. К содержимому криопробирки добавьте 1 мл среды, пипетируя перенесите в подготовленную пробирку с 8 мл тёплой среды.
2. Осторожно перемешайте пипетированием.
3. Центрифугируйте при **200×g** в течение **5 минут** при комнатной температуре.

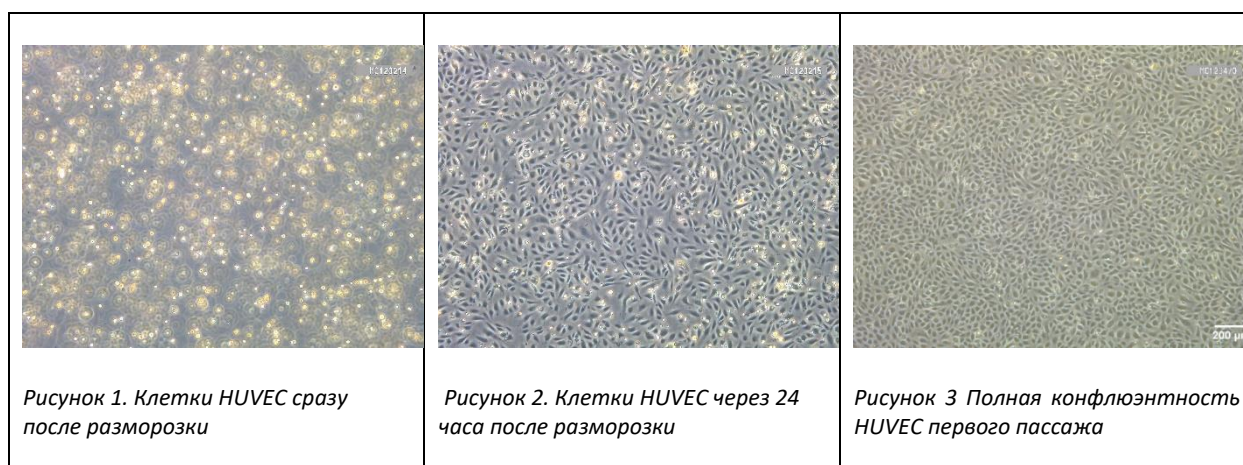
Этап 4. Посев

1. Убрать супернатант. Долейте среду до объёма, необходимого для посева в T25: обычно **3-5 мл**. Аккуратно ресуспендируйте.
2. Перенесите клеточную суспензию в подготовленный флакон T25.
3. Равномерно распределите клетки по поверхности, покачивая флакон крест-накрест.
4. Поместите флакон в инкубатор (37°C, 5% CO₂).
- 5.

2. ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И КОНТРОЛЬ

Срок после посева	Ожидаемая картина
24 часа	Прикрепилось не менее 60% клеток, начали распластываться, единичные округлые клетки
2–4 дня	70–90% конфлюэнтность (монослой), клетки имеют типичную «булыжничкообразную» морфологию
3–7 дней	Достижение 100% конфлюэнтности – пора пассировать (если требуется)

Примечание: не держите клетки при 100% конфлюэнтности дольше 1–2 дней, иначе они начнут дифференцироваться.



3. ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ИХ РЕШЕНИЯ

Проблема	Вероятная причина	Действие
Низкая прикрепляемость (<50%)	Криповреждение, слишком долгая разморозка, холодная среда	Проверить протокол разморозки; при повторном заказе сообщить нам
Медленный рост, вакуолизация	Неподходящая среда, низкое качество FBS, микоплазма	Проверить состав среды, исключить контаминацию
Массовая гибель клеток после разморозки	Неправильное центрифугирование (слишком быстро), DMSO не отмыт	Уменьшить скорость центрифугирования, строго соблюдать разведение 1:10
Клетки отслаиваются "хлопьями" при смене среды	Струя среды попала прямо в монослой; перепад температур.	Смену среды проводить очень аккуратно, пипеткой по стенке флакона. Среду обязательно греть.
Бактериальная/грибковая контаминация	Нарушение стерильности	Утилизировать, проверить работу бокса, ламинара