

细胞描述:

小鼠胚胎干细胞。该细胞缺乏 HGPRT (HPRT)，并且对 0.06 mM 的 6-硫鸟嘌呤有抗性。当在饲养层（胚胎成纤维细胞或 STO 细胞）上培养时，细胞保持未分化状态。在没有饲养层的情况下，细胞自发分化并形成胚胎结构。当注入胚胎中时，细胞可以进入生殖系。在常规的分子基因修饰技术之后，它们可用于重构小鼠胚胎。**培养时需使用昆明白 MEF 作为饲养层细胞。**

细胞特性

- 1) 来源: 小鼠, 129/Ola 品系, 胚胎内细胞团
- 2) 形态: 球形克隆 贴壁生长
- 3) 含量: $>5 \times 10^5$ 细胞数
- 4) 规格: 1mL 冻存管包装
- 5) 用途: 仅供科研使用

运输和保存: 干冰运输: 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。

一. 培养基及培养冻存条件准备:

1) 准备 DMEM 基础培养基 81.5%, 特级胎牛血清 15%, GlutaMAX-1 谷氨酰胺 1%, NEAA 非必需氨基酸 1%, P/S 青霉素-链霉素 1%, β -巯基乙醇 1.25 mL, LIF 10ng/mL。

注意: 1、建议使用昆明鼠 MEF (小鼠胚胎成纤维细胞) 作为饲养层细胞。

2、在铺胚胎干细胞前, 需对 MEF 进行处理, 具体处理步骤见下文丝裂霉素灭活 MEF。

3、该细胞建议冻存干冰发货, 不适合长时间活细胞运输, 会影响细胞活力。

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

3) 冻存液: 完全培养液 60% , FBS 30% , DMSO 10% 现用现配。

我库冻存时, 体积为 500 μ l, 预期存活率 70%, 每支冻存管的细胞复苏, 3 至 4 天后, 会形成 30 至 40 个克隆, 建议复苏至 1 个 T25 培养瓶中。

二: 细胞处理:

丝裂霉素灭活 MEF:

待 MEF 细胞密度达到 80%以上, 加入含丝裂霉素 (15 μ g/mL) 的 MEF 完全培养液, 置于 37 培养箱中孵育 2.5h, 2.5h 后, 弃掉培养液, PBS 清洗 1-2 遍, 加入 MEF 培养基, 备用, 当天 2h 后或者第二天可以传入小鼠胚胎干细胞。

QuiCell 葵赛生物

复苏:

1. 将小鼠胚胎干细胞冻存管从液氮中取出，置于 37°C 水浴中使之迅速融解，取出后拿到超净台内用 75% 酒精擦拭冻存管旋口处及外壁，防止污染。
2. 将冻存管内细胞悬液转移至含 3-4 ml 小鼠胚胎干细胞完全培养液的 15ml 离心管内，以 1000 rpm，离心 5 min。
3. 离心后将上清液吸除，另加入新鲜的小鼠胚胎干细胞完全培养液 2 ml，吹打悬浮。
4. 重复吹打，制成单细胞悬液，尽量避免气泡。
5. 转移至 1 个已经铺好 MEF 细胞的 T25 培养瓶中培养。
6. 每天更换小鼠胚胎干细胞完全培养液。

传代:

1. 一般在复苏后第 2-3 天传代，视克隆大小和密度而定
2. 吸除废液。
3. 用 PBS（不含钙镁离子）轻轻冲洗一遍。
4. 加入 1.0 ml 的 0.25%胰酶（含 EDTA）至培养瓶，轻轻晃动，使胰酶覆盖底面，置于 37°C 培养箱内消化细胞。
5. 在显微镜下观察，直至细胞层全部脱落（一般需要 1-2 min）。
6. 加 2 ml 小鼠胚胎干细胞完全培养液终止消化。
7. 以 1000 rpm，离心 5 min，弃上清。
8. 加入约 1 ml 小鼠胚胎干细胞完全培养液，多次轻轻吹打细胞，制成单细胞悬液。
9. 加入足量的小鼠胚胎干细胞完全培养液，吹打混匀，细胞悬液分装到铺好 MEF 细胞的 T25 培养瓶中。一般地，一个 T25 培养瓶加入 5-6 ml 培养液。放入 37°C 培养箱内培养。每天换液。

传代比例：1:4-1:7

冻存:

1. 按传代的方法将细胞消化下来，制成细胞悬液。
2. 以 1000 rpm，离心 5 min，弃上清，逐滴加入已经预冷的冻存液，悬浮细胞。
3. 按每支存管内加入 500 μ l 细胞悬液分装到冻存管内，标记细胞名称、代数、冻存日期等基本信息。
4. 将冻存管置于程序降温盒内，-80°C 过夜，转入液氮。

冻存液配方:

小鼠胚胎干细胞完全培养液 60%，ES 级 FBS 30%，DMSO 10%

上海葵赛生物科技有限公司

中国（上海）自由贸易试验区巴圣路 160 号 8 号楼 3 单元 6005 电话：13636346891

QuiCell 葵赛生物

附：小鼠胚胎干细胞与MEF 细胞分离的简易方法（差速贴壁法）

1. 培养中的小鼠胚胎干细胞，按传代的操作方法将细胞用胰酶消化并吹打成单细胞悬液后，加入适量的提前温育好的小鼠胚胎干细胞完全培养液重悬细胞，吹打混匀，细胞悬液分装到无 MEF 细胞的培养皿或培养瓶（一般地，一个 T25 培养瓶中培养的小鼠胚胎干细胞，在一个 10 cm 培养皿中进行差速贴壁。不要事先铺明胶，如铺明胶则细胞贴壁速度过快无法有效分离小鼠胚胎干细胞与 MEF 细胞）中。

2. 培养皿或培养瓶置于 37°C 培养箱内静置 1 小时。

3. 1 小时后，绝大部分 MEF 细胞已贴在培养皿或培养瓶底面，而大部分小鼠胚胎干细胞仍然悬浮在培养液中。收取培养液，进行后续实验。

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。

上海葵赛生物科技有限公司

中国（上海）自由贸易试验区巴圣路 160 号 8 号楼 3 单元 6005 电话：13636346891