

H9 人胚胎干细胞

细胞名称: H9

细胞描述: 人胚胎干细胞, 曾用名 WA09

形 态: 球形克隆, 贴壁生长

来源性别: 女性

组织: 内细胞团

冻存日期/代数: 详见 冻存管/培养瓶 标识

建议复苏培养体系: 1 个 T25 培养瓶或 6cm 培养皿

细胞状态: 良好

支原体检测结果: 阴性

细胞用途: 仅供科研使用。

STR 鉴定结果:

Amelogenin: X

D5S818: 11, 12

D13S317: 9

D7S820: 9, 11

D16S539: 12, 13

vWA: 17

TH01: 9

TPOX: 10, 11

CSF1PO: 11

H9 细胞完全培养基培养人胚胎干细胞

1. 试剂和材料

H9 细胞完全培养基试剂盒

成分	规格	数量	储存条件
H9 细胞基础培养基	500mL	1 瓶	2-8°C

网址: www.hfwanwu.com

电话: 400-1016-218

地址: 合肥市蜀山区长江西路 248 号 11 层



H9 细胞培养基添加剂 20mL 1 支 -20℃

所需的其它试剂和材料

产品	规格
Y27632	1mg
Matrigel	5mL
H9 细胞消化液	500mL
ES 细胞专用冻存液	100mL

另需细胞培养皿/瓶/板，15mL 离心管和移液管等细胞培养耗材

2. 培养流程

2.1 试剂的制备

2.1.1 完全培养基制备

2.1.1 在室温（15–25°C）或冰箱内（2–8°C）过夜解冻细胞培养基添加剂，可在无菌条件下将添加剂分装为适量的工作等份，并在-20°C下冻存。冷冻的分量须在3个月内用完。解冻后的分量应该一天内制备成完全培养基。请勿在解冻后再次冷冻。

2.1.2. 在无菌条件下将20mL的添加剂全部解冻后加入到500mL的基础培养基中，充分混匀。完全培养基在（2–8°C）下储存时刻维持稳定状态最多2–3周，或在-20°C下冷冻时刻维持稳定状态最多3个月。在室温（15–25°C）或冰箱内（2–8°C）过夜解冻冷冻的培养基，不要长时间放在37°C水浴内加热培养基。

如果在无菌条件下制备，细胞完全培养基可直接使用。

2.1.2 Matrigel 工作液的配制与包被

鉴于基质胶的操作环境要求比较严格，为保证您的实验顺利，特此对以下几个方面进行温馨提示：

1. 收货时，首先确认还有干冰，Matrigel 成固态，液面水平，如有异常请及时拍照取证并联系我们。
2. 整个 Matrigel 只能分装一次，在分装前，要先放4°C冰箱（最好先把 Matrigel 插在冰上，然后放入4°C冰箱）过夜，且分装用的枪头、EP管等都要提前-20°C预冷（基质胶在10°C以上会发成胶凝固导致基质胶报废），整个分装过程都需在冰上进行，且以后每次试验时拿出本次用量所需的基质胶。
3. 实验人员手心不要接触基质胶，如：要手持装有 Matrigel 的 EP 管的上方，防止体温使基质胶成胶凝固。
4. Matrigel 的稀释比例建议为100倍稀释。

本库建议的配制 Matrigel 工作液方法：

1. 稀释前将 Matrigel 放入4°C冰箱过夜融化。

网址：www.hfwanwu.com

电话：400-1016-218

地址：合肥市蜀山区长江西路248号11层



2. 将适量体积的稀释液 (DMEM/F12 或 PBS) 置 4℃冰箱预冷。
3. 将融化的 Matrigel 与稀释液从冰箱中取出并打开盖子, 用移液管吹吸稀释液几次以冷却移液管, 并吸取少量稀释液加入 Matrigel 管中混匀, 将 Matrigel 转移到稀释液中, 并吹打混匀。(因为 Matrigel 遇 15℃以上温度就会成凝胶粘在原装玻璃壁和移液管壁上, 故 Matrigel 从冰箱拿出来以后尽快打开盖子并转移到预冷的稀释液中, 吸取 Matrigel 的移液管一定要冷却)。
4. 立即用稀释后的 Matrigel 包被培养板或培养皿。对于 6 孔板, 每个孔使用 1mL 稀释后的 Matrigel, 对于 6cm 的培养皿, 每个孔使用 2mL 稀释后的 Matrigel, 晃动培养板使 Matrigel 溶液均匀的分布在表面上。
5. 使用前, 包被的培养板应放在培养箱 (37℃) 下至少 1h。请勿让培养板脱水。在培养板可供使用之前, 请勿移除 Matrigel 溶液。

如果不立即使用, 培养板必须密封, 以防止脱水。包被后的培养板可在 2-8℃下最多储存 7 天。

如果 Matrigel 溶液并未完全覆盖表面, 则无法实验最佳的细胞培养, 因此, 不建议使用含有溶液已蒸发区域的培养板。

如果已将培养板在 2-8℃下储存, 则在移除 Matrigel 溶液之前, 将培养板在培养箱 (37℃) 下放置 30min。

2.1.3 Y27632 的配制

Y27632 粉末溶解在 PBS 中, 配制成浓度未 10mM 的储存液, 0.22 μ m 滤膜过滤除菌。分装后冷冻于-20℃。

Y27632 提高复苏和传代后的克隆形成率, 所以只在复苏和传代步骤添加 (1:1000, 即终浓度为 10 μ M), 换液时不添加。

2.1. 复苏

在开始复苏前, 将所有试管、预热后的培养基和培养皿准备好, 已确保尽快完成复苏过程。

1. 将冻存管从液氮中取出, 快速在 37℃水浴槽中解冻, 轻柔持续地摇动冻存管, 直到只剩下一个小冷冻团。从水浴槽取出冻存管, 70%乙醇擦拭进行消毒。
2. 使用移液管将冻存管中含有 H9 细胞的冻存液轻轻转移至一个含有 5-6mL 已经预热的完全培养基的 15mL 离心管中, 过程必须轻柔防止吹散细胞团。
3. 室温 300g 离心 5min。
4. 吸出培养基, 确保细胞团完整。
5. 然后缓慢加入 1mL 完全培养基, 用手指轻弹离心管底部, 使细胞团脱离底部并分散。
6. 轻轻的将此 1mL 细胞悬液转移至已包被的培养皿/板/瓶, 根据最终培养细胞的液体体积, 加入 ROCK inhibitor Y27632, 终浓度为 10 μ M。



网址: www.hfwanwu.com

电话: 400-1016-218

地址: 合肥市蜀山区长江西路 248 号 11 层

7. 将培养皿/板/瓶置于 37℃ 培养箱中，每天更换培养基（换液不需要再添加 Y27632，但培养基需提前预热）。

2.2. 传代

当集落变得较大、中心变得密集、明亮（对比边缘），相邻的集落开始融合时，此时可进行传代。

1. 传代前，准备 37℃ 预热好的无钙镁 PBS 溶液及消化液，完全培养基。
2. 吸走上清，并加入 37℃ 预热好的 PBS 溶液清洗 1 次。
3. 加入适量（按 6 孔板每孔加 1mL, 6cm 皿加 2mL, 10cm 皿加 3mL 的量）的 37℃ 预热好的消化液。
4. 37℃ 放置 1-2min，用手指轻弹皿/板/瓶身，显微镜下观察到大部分克隆边缘开始脱离培养皿/板底，克隆内部大部分细胞成团脱落。
5. 加入适量的完全培养基终止消化。
6. 移入离心管，300g 离心 5min。
7. 离心后重悬（重悬步骤参照复苏 4-5 步）。
8. 传代比例为 1: 6—1: 8，根据最终培养细胞的液体体积，加入 ROCK inhibitor Y27632，终浓度为 10 μM。
9. 将培养皿/板/瓶置于 37℃ 培养箱中，每天更换培养基（换液不需要再添加 Y27632，但培养基需提前预热）。

2.3. 冻存

当集落变得较大、中心变得密集、明亮（对比边缘），相邻的集落开始融合时，此时可进行传代。

1. 传代前，准备 37℃ 预热好的无钙镁 PBS 溶液及消化液，完全培养基。
2. 吸走上清，并加入 37℃ 预热好的 PBS 溶液清洗 1 次。
3. 加入适量（按 6 孔板每孔加 1mL, 6cm 皿加 2mL, 10cm 皿加 3mL 的量）的 37℃ 预热好的消化液。
4. 37℃ 放置 1-2min，用手指轻弹皿/板/瓶身，显微镜下观察到大部分克隆边缘开始脱离培养皿/板底，克隆内部大部分细胞成团脱落。
5. 加入适量的完全培养基终止消化。
6. 移入离心管，300g 离心 5min。
7. 离心后重悬（重悬步骤参照复苏 4-5 步）。
8. 使用预冷的冻存液轻轻的重悬细胞团，然后将细胞悬液转移至冻存管，冻存按 6 孔板每孔冻 1 支，6cm 皿冻 2-4 支，10cm 皿冻 6-12 支。

