

## E14 小鼠胚胎干细胞

## Mouse Embryonic Stem Cells ,ES-E14TG2a

## 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。当注入胚泡中时，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： $>1 \times 10^6$  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%                 |
| 优质胎牛血清               | 15 %                |
| GlutaMAX-1 谷氨酰胺      | 1 %                 |
| MEM NEAA 非必需氨基酸      | 1%                  |
| Sodium Pyruvate 丙酮酸钠 | 1%                  |
| P/S 青霉素-链霉素          | 1%                  |
| $\beta$ -巯基乙醇        | 0.5 mL (1000X)      |
| LIF                  | 5 $\mu$ g (10ng/mL) |

使用昆明白 MEF 作为饲养层细胞。

2) 培养条件：气相：空气，95%；二氧化碳，5%。温度：37℃，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  $\mu$ 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：

## MEF 细胞铺制：

- 1、在 T25 培养瓶中加入 0.2%明胶，摇匀后覆盖底面即可，于 37℃细胞培养箱至少放置 15 min 以上。
- 2、吸除 0.2%明胶，加入事先水浴加热至 37℃的 MEF 完全培养液。一般地，一个 T25 培养瓶中加入 5 ml MEF 完全培养液。
- 3、按实验需要：小鼠胚胎干细胞使用 KM-r P3 MEF 或 CF-1 P3 MEF；复苏 MEF 细胞若干支。将冻存管从液氮中取出，置于 37℃水浴中使之迅速融解，取出后拿到超净台内用 75%酒精擦拭

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



冻存管旋口处及外壁，防止污染。

4、将冻存管内细胞悬液转移至含 2 ml MEF 完全培养液的 15 ml 离心管内，以 1000 rpm，离心 5 min，离心后将上清液吸除，另加入新鲜的 MEF 完全培养液 1 ml，重悬后按照一个 T25 培养瓶铺  $1 \times 10^6$  的 MEF 细胞，平均加入到 T25 培养瓶中，轻轻摇匀后置于 37℃ 细胞培养箱。24 h 以后可以传入小鼠胚胎干细胞。

5、复苏或传代小鼠胚胎干细胞前，将 T25 培养瓶中的 MEF 完全培养液吸除，加入 2 ml 小鼠胚胎干细胞完全培养液轻轻冲洗一遍后吸除，加入新鲜的小鼠胚胎干细胞完全培养液待用。

#### 复苏：

1、将小鼠胚胎干细胞冻存管从液氮中取出，置于 37℃ 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℃ 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℃ 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  $\mu$ 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℃ 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%

附：小鼠胚胎干细胞与 MEF 细胞分离的简易方法（差速贴壁法）：

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



- 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、一小时后，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。

#### 使用范围

本产品仅限于科学研究，绝不可作为动物或人类疾病的治疗产品使用。

