

## B6-BLU 小鼠胚胎干细胞

### 细胞描述

该细胞系被报道具有生殖能力，源自一个携带 LacZ 报告基因的 C57BL/6 转基因小鼠。这段转基因在 pUC19 中组装，包含 1.9 kb 人 54 HS-2 片段（两侧 KpnI/PvuII 酶切位点），位于标记的β-珠蛋白转基因上游。培养时需使用昆明白 MEF（SCSP-101R）作为饲养层细胞。

### 细胞特性

- 1) 来源：小鼠，57BL/6Tac 品系 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 81.5%**  
**优质胎牛血清 15 %**  
**GlutaMAX-1 谷氨酰胺 1 %**  
**MEM 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 KM- MEF 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℃，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

##### 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  $\mu$ 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。



**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 μl 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):**

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℃ 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。

