

## AB2.2 小鼠胚胎干细胞

### AB2.2 Mouse embryonic stem cells

#### 细胞描述

该细胞系已广泛用于创建基因敲除小鼠。HPRT 负突变使该品系可用于染色体工程。已经表明该小鼠 ES 细胞系具有生殖能力。

#### 细胞特性

- 1) 来源：小鼠，129S5/SvEvBrd（原 129/SvEvBrd）品系，小鼠胚胎内细胞团
- 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

成分	比例
DMEM	81.5%
优质胎牛血清	15%
GlutaMAX-1 谷氨酰胺	1%
NEAA	1%
双抗	1%
$\beta$ -巯基乙醇	1.25ml
LIF	10ng/ml

#### 注意：

- 1、建议使用 CF-1 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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  $\mu$ 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 $^{\circ}$ 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%

### 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。

#### 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。

