

小鼠胚胎干细胞说明书

货号 Cat No.	PRI-MOU-00094
规格 specifications	5 x 10 ⁵ cells/vial
描述 Description	胚胎干细胞分离自胚胎组织；胚胎干细胞（Embryonic stem cell, ESCs, 简称 ES、EK 或 ESC 细胞）是早期胚胎（原肠胚期之前）或原始性腺中分离出来的一类细胞，它具有体外培养无限增殖、自我更新和多向分化的特性。无论在体外还是体内环境，ES 细胞都能被诱导分化为机体几乎所有的细胞类型。ES 细胞具有与早期胚胎细胞相似的形态结构，细胞核大，有一个或几个核仁，胞核中多为常染色质，胞质胞浆少，结构简单。体外培养时，细胞排列紧密，呈集落状生长。用碱性磷酸酶染色，ES 细胞呈棕红色，而周围的成纤维细胞呈淡黄色。
分离方法及质量控制 methods and quality control	胚胎干细胞采用酶消化法制备而来，细胞总量约为 5×10 ⁵ 个/瓶；细胞经 4-Oct 免疫荧光鉴定，细胞纯度可达 90%以上，且不含有 HIV-1、HBV、HCV、支原体、细菌、酵母和真菌等。
培养试剂及培养条件 Culture Medium and reagents	细胞专用培养基组分： 500ml 基础培养基；胎牛血清；细胞生长因子；青霉素/链霉素溶液 (备注：每种组分单独包装，使用前需要按比例分装，详细操作详见说明书，现用现配，效果更佳。) 推荐专用培养基 小鼠胚胎干细胞完全培养基 货号：PCM-M-94 0.05%消化液货号：CSP048 无血清细胞冻存液：CSP077 温度：37℃ 气相：95%空气，5%二氧化碳
培养特性 Culture Properties	贴壁
细胞复苏 Cell Thawing	注意：1.低温保存的细胞非常脆弱，请将冻存管放入 37℃的水浴中解冻，尽快复苏细胞。 2.提前室温预热培养基。 1.在无菌区准备好 15ml 离心管和 T-25 培养瓶并分别加入 5ml 完全培养基； 2.将冻存管放入 37℃水浴锅中，握住冻存管不停晃动，直到内容物完全融化。然后立即将冻存管从水浴中取出，擦干并喷洒 75%乙醇，移至无菌区； 3.小心地拆卸盖子，不要碰到里面的螺纹，用移液枪轻轻吸出细胞悬液，加入到准备好的 15ml 离心管中，1000rpm 离心 5min； 4.弃上清后，轻弹离心管底部分散细胞沉淀，加入适量完全培养基重悬细胞后转入准备好的 T25 培养瓶（建议加液量：5~7ml）； 5.轻轻摇动培养瓶使细胞均匀分布，如有必要（如使用不透气瓶），松开瓶盖，以便气体交换。 6.将培养瓶放入 CO ₂ 培养箱中培养。
细胞传代 Subculturing	收到细胞后，请对细胞培养瓶外表进行消毒，将细胞置于培养箱中进行 1-2 小时的缓冲，待细胞恢复基本生长状态后，进行后续细胞实验。 在倒置显微镜下观察整个细胞生长情况： (一) 细胞未长至 85%时，用 75%酒精喷洒整个瓶消毒后放到生物操作台内，严格无菌操作，打开细胞培养瓶，若培养瓶上无特殊标注，吸去剩余培养液，只留 6-8ml 培养液继续培养。 (二) 细胞已长满（达 85-95%）。即可进行传代，具体步骤如下：

	<ol style="list-style-type: none"> 1.弃去培养液，用 PBS 洗涤 1-2 次； 2. 加入 1.0ml 胰酶消化液，37°C消化(消化时间根据不同细胞及所用胰酶有所差异)，显微镜下观察细胞消化情况，若细胞回缩变圆、透亮、轻拍瓶壁呈流沙样脱落，则迅速拿回操作台，加入至少双倍的完全培养液，终止消化并轻轻吹打细胞 1-2 次，使其变成单细胞悬液； 3.将细胞收集于离心管中离心 1000rpm/5min，弃上清，轻弹管底，将细胞弹散； 4.加入新鲜培养基重悬细胞，进行传代； 5.如果没有特别说明，建议收到细胞后的第一次传代比例为 1:2。 <p>注：1.观察细胞密度最好用（4X 物镜）低倍镜观察，以便正确的判断细胞密度；观察细胞形态请用（10X 或 20X）高倍镜观察；</p> <p>2. 推荐使用 0.05%胰酶/EDTA 消化液（推荐货号：CSP048）；</p> <p>3. 瓶中运输的培养液不能重复使用，请换新鲜培养液培养；</p> <p>4.有些细胞贴壁不牢，如发现贴壁细胞有脱落，可离心重悬后接种到新瓶内。</p>
<p>细胞冻存 Cell cryopreservation</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 常规方法收集对数期的贴壁细胞或悬浮细胞于试管中。 2. 根据培养细胞的密度和冻存管的大小确定所需冻存细胞数。 3. 将所需数目的细胞悬浮液置于离心管中，1000rpm，5 分钟离心收集培养细胞沉淀，彻底弃去离心管中的上清液。 4. 加入适量的细胞冻存液于离心管中，使细胞浓度约为 $5 \times 10^5 - 1 \times 10^7$ /ml。轻柔地混匀细胞，制成细胞混合液。 5. 将离心管中的细胞混合液分装于已标记的冻存管中，建议每管 1ml 或 1.5ml。 6. 直接将分装好的细胞冻存管放入-80°C超低温冰箱中，可长期冷冻保存。 7. 如果想液氮中长期保存，需先放入-80°C冰箱至少一天时间，方可移至液氮罐中保存。 8. 以上冻存步骤是按照无血清冻存液（货号：CSP077）推荐。
<p>保存 Storage</p>	<p>保存条件：液氮长期存储</p>
<p>供应限制 Product Use</p>	<p>仅限科研，不可用于临床</p>
<p>安全性 Safety</p>	<p>所有肿瘤和病毒转染的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</p>
<p>常见问题及解决方案 Questions and solutions</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1.在收到细胞后先观察培养瓶是否破裂，漏液等，如遇到上述问题请及时拍照并与我们联系。 2.贴壁细胞：培养瓶不开封，显微镜下检查细胞状态，瓶口酒精擦拭后平躺放置在培养箱。1-2 小时后观察，如细胞大部分又贴回瓶底，表明细胞活力正常，剩余少量漂浮的细胞可以去掉，留 8-10ml 培养液培养观察，细胞生长至汇合度到达 85%左右，进行消化传代；如细胞仍不贴壁，将细胞离心收集转到新培养瓶，原培养瓶加部分培养液继续培养，注意观察。如细胞仍不能贴壁，请用台盼蓝染色鉴定细胞活力，并请及时拍照（多倍数多视野），包括染色照片，并联系我们。（以上仅为贴壁细胞处理方法） 3.悬浮细胞：培养瓶不开封，显微镜下检查细胞状态，瓶口酒精擦拭后平躺放置在培养箱。1-2 小时后观察，将整瓶细胞及培养液分批离心（1000rpm，5min），加入适量培养基，根据离心后的细胞量进行放回培养或分瓶培养。（以上仅为悬浮细胞处理方法） 4.半悬细胞：培养瓶不开封，显微镜下检查细胞状态，瓶口酒精擦拭后平躺放置在培养箱。1-2 小时后观察，将整瓶细胞培养液上层悬浮细胞离心（1000rpm，5min），重悬细胞后加入原培养瓶培养至传代。细胞数量较大，可将贴壁细胞消化下来，与上层悬浮细胞混匀传代。重悬上层悬浮细胞时必须保持下层贴壁细胞的营养条件，防止贴壁细胞缺乏营养。（以上仅为半悬细胞处理方法） <p>如遇到细胞培养问题请及时拍照并与我们联系，我们的技术人员会一直跟踪指导。</p>
<p>备注 additional information</p>	<p>由于实验所用试剂、操作环境及操作手法的不同，以上方法仅供各实验室参考。</p> <p>原代细胞体外培养周期非常有限，请尽快及时安排实验。</p> <p>建议中乔新舟配套的专用细胞培养基及正确的操作方法来培养，以此保证该细胞的最佳培养状态。</p>