

人胚胎干细胞H1无饲养层

使用说明书

细胞名称 Cell name	人胚胎干细胞H1无饲养层		
货号 NO.	ZQ0690		
描述 Description	提供 STR 鉴定证书		
种属 Species	人		
组织来源 Tissue	人胚胎内细胞团		
形态 Morphology	球形克隆		
培养特性 Culture Properties	贴壁		
安全性 Safety	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		
培养基 Culture Medium	培养条件： mTeSR 完全培养基 (stemcell, 货号 85850)		
	成分	规格	存放条件
	mTeSRTM1 基础培养基 (#85851)	400 mL	2-8 °C
	mTeSRTM1 5X 添加物 (#85852)	100 mL	-20 °C
	所需的其他试剂和材料		
	产品	品牌/货号	
	温和分离液	STEM CELL/07174	
	DPBS (不含钙镁离子)	GIBCO/14190	
	DMEM/F12	GIBCO/11330	
	Y27632	STEM CELL/ 72302	
BD Matrigel hESC-qualified Matrix	CORNING/354277 (BD 该系列产品已被 CORNING 收购)		
Cryostor CS10	STEM CELL/07930		
细胞刮			
另需细胞培养板/瓶/皿， 15ml 离心管和移液管等细胞培养耗材。			
温度： 37°C			
气相： 95%空气， 5%二氧化碳			

使用 STEM CELL 公司 mTeSR1 配套培养体系进行培养

一. 试剂的制备

1. mTeSR1 的制备

1.1 在室温 (15 - 25° C) 下或冰箱内 (2 - 8° C) 过夜解冻 mTeSRTM 5X 添加物(成分编号 #05852)。如需要, 可在无菌条件下将 5X 添加物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。解冻后的分量应在 1 天内制备成完全的 mTeSRTM 培养基。请勿在解冻后再次冷冻。

1.2 在无菌条件下将 100 mL 的 5X 添加物全部解冻后加入到 400 mL 的基础培养基中, 形成总共 500 mL 的容量。充分混匀。完全的 mTeSRTM 培养基在 (2 - 8° C) 下储存时可维持稳定状态最多 2 周, 或在 -20° C 下冷冻时可维持稳定状态最多 6 个月。在室温 (15 - 25° C) 下或冰箱内 (2 - 8° C) 过夜解冻冷冻的培养基, 不要长时间放在 37° C 水浴内加热培养液。如果在无菌条件下制备, 完全的 mTeSRTM 培养基可直接使用, 但如需要, 也可使用 0.2 μm 的低蛋白结合过滤器过滤培养基。

2. Matrigel 工作液配制和包被 应分装和冷冻保存 BD MatrigelTM hESC-qualified matrix (BD 产品号#354277)。有关分装的完整说明和建议, 请查阅与 BD MatrigelTM 同时提供的产品说明书。分装后的小包装可在 -70° C 下最多储存 6 个月。将一份 BD MatrigelTM 加入到 25 mL 的 DMEM/F12 中, 这足以包被四个 6 孔培养板 (1 mL / 孔) 或三个 100 mm 培养皿 (8 mL / 培养皿)。

3. 将 25 mL 的稀释培养基 (DMEM/F12) 分装入离心管放在冰上。

4. 将一份分装后的 BD MatrigelTM 自 -70° C 取出, 在冰上解冻, 直到成为液体, 然后将解冻后的 BD MatrigelTM 加入到冷稀释培养基 (在 50 mL 的试管中) 中, 充分混匀。如需要, 可用冷培养基冲洗 EP 管。

5. 立即用稀释后的 BD MatrigelTM 溶液包被组织培养板。对于 6 孔培养板, 每个孔使用 1 mL 稀释后的 BD MatrigelTM; 对于 100 mm 培养板, 每个培养板使用 8 mL 稀释后的 BD MatrigelTM。旋动培养板, 以使 BD MatrigelTM 溶液均匀地分布在表面上。要包被其他尺寸的组织培养皿, 则按照需要包被的培养皿的表面积决定稀释后的 BD MatrigelTM 用量。

6. 使用前, 包被的培养板应放在培养箱 (37° C) 下至少 1 个小时。请勿让培养板脱水。在培养板可供使用之前, 请勿移除 BD MatrigelTM 溶液。如果不立即使用, 培养板必须密封, 以防止脱水 (如利用 Parafilm[®])。包被后的培养板可在 2 - 8° C 下最多储存 7 天。如果 BD MatrigelTM 溶液并未完全覆盖表面, 则无法实现最佳的培养; 因此, 不建议使用含有溶液已蒸发区域的培养板。

7. 轻轻地将培养板向一个角落倾斜, 使过剩的 BD MatrigelTM 溶液汇聚在那个角落。用一次性移液管或通过抽取移除溶液。确保移液枪头不刮到已包被的表面。立即加入 mTeSRTM 培养基和细胞。如果已将培养板在 2 - 8° C 下储存, 则在移除 BD MatrigelTM 溶液之前, 将培养板在培养箱 (37° C) 下放置 30 分钟。

8. 配制 Y27632 溶液 Y27632 粉末溶解在 DPBS 中, 配成浓度为 10mM 的储存液, 0.22μm 滤膜过滤除菌。分装后冷冻于 -20° C, 6 个月内使用。Y27632 提高复苏和传代后的克隆形成率, 所以只在复苏步骤和传代步骤添加, 换液时不添加。

注意: 1. 低温保存的细胞非常脆弱, 请将冻存管放入 37°C 的水浴中解冻, 尽快复苏细胞。

1. 提前室温预热培养基。

2. 在开始操作程序之前, 将所有准备工作完成好以确保尽快完成解冻程序。

1. 在无菌区准备好已经包被好的 T-25 培养瓶从已包被的组织培养板中移除 BD MatrigelTM。使用一次性移液管或通过抽取移除溶液。确保移液枪头不刮到已包被的表面。加入约 5-7ml 培养基。

细胞复苏
Cell Thawing

	<p>2.将冻存管放入 37°C 水浴中，握住冻存管晃动，直到内容物完全融化。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。</p> <p>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，加入到准备好的培养瓶中。</p> <p>4.轻轻摇动培养瓶使细胞均匀分布。如有必要，松开阀盖，以便气体交换。</p> <p>5.将培养瓶放入CO₂ 培养箱中培养。</p> <p>6.过夜后，观察细胞形态并更换培养基。</p> <p>备注：该细胞复苏后必须每天换液</p>
<p>传代 Subculturing</p>	<p>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。</p> <p>mTeSR™1 中生长的细胞当集落变得较大、中心变得密集和明亮（对比其边缘）而相邻的集落开始融合时，这时可进行传代。根据接种的细胞团的大小和密度。如果太早对集落进行传代或传代太过频繁，则细胞可能吸附不好、产量将会减少且细胞可能分化。如果太晚对集落进行传代，培养物将开始显示分化迹象(特点是细胞类型 出现不同的形态)。</p> <p>(1) 分装足够的 mTeSR™1 以传代细胞。将分装的 mTeSR™1、温和分离液（产品号 #07174）和 DMEM/F-12 加热至室温（25° C 左右）。</p> <p>(2) 使用显微镜观察确定分化的区域。用毡制粗头笔或透镜标志器在培养板底部标记这些区域。如果培养物品质优异，分化的区域不会超过培养孔的 20%。</p> <p>(3) 用移液枪头刮除或抽取，去除分化区域。</p> <p>(4) 吸出培养基，然后用 DPBS（不含钙镁离子）洗。</p> <p>(5) 向培养瓶内加入温和分离液(每个 T25 加 3ml)，覆盖底面，在室温下静置 1 分钟。</p> <p>(6) 吸掉温和分离液，然后用 6ml DMEM/F-12 轻轻的洗涤培养皿一次。</p> <p>(7) 向培养瓶内加适量 mTeSR™1，并用细胞刮（如 Corning 产品号#3010）将细胞集落刮离培养瓶底。</p> <p>(8) 将分离的细胞聚集体转移至一个 15 mL 锥形试管中，并加入适量 mTeSR™1 冲洗培养瓶，以收集残留的细胞聚集体。将冲洗液一并收集到 15 mL 离心管内。轻轻吹打细胞聚集体 2-3 次，调整培养基的体积，以实现适当的分配。根据最终培养细胞的液体体积，加入 ROCK inhibitor Y27632，终浓度为 10uM。</p> <p>(9) 将细胞聚集体与 mTeSR™1 接种至新的 BD Matrigel™ 包被的培养板上。一般传代周期为 5 天左右，传代比例为 1: 3-1: 6。如果集落过于密集或过于稀疏，则下一次传代时相应地调整传代比例。</p> <p>(10) 快速前后和左右多次移动培养板，以使细胞分散在各个孔的表面。将培养瓶 37° C 培养箱中。确保新接种的集落均匀地分布在 BD Matrigel™包被的培养板的整个表面。细胞团分布不均匀有可能导致细胞分化。</p> <p>(11) 每天换液。</p> <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； 2.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>冻存 Cryopreservation</p>	<p>用显微镜观察需要冻存的培养物，确定已分化的区域。用毡制粗头笔或透镜标志器在培养板底部标记这些区域。如果培养物品质优异，分化的区域不会超过培养孔的 20%。用移液枪头刮除或抽取，去除分化区域。</p> <p>1.从培养孔中吸出残留的培养基，然后用 DPBS（不含钙镁离子）冲洗。</p> <p>2.向每个培养瓶内加入温和分离液(每个 T25 加 3ml)，覆盖底面，在室温下静置 1 分钟。</p> <p>3.吸掉温和分离液，然后用 6ml DMEM/F-12 轻轻的洗涤培养皿一次。</p>

	<p>4. 向培养. 瓶内每个孔内加适量 mTeSR™1, 并用细胞刮将 细胞集落刮离培养瓶底。</p> <p>5. 将分离的细胞聚集体转移至一个 15 mL 离心管中, 并加入适量 mTeSR™1 冲洗培 养瓶, 以收集残留的细胞聚集体。将冲洗液一并收集到 15 mL 离心管内。小心地尽量 将细胞团保持到最大。</p> <p>6. 在室温(15- 25° C) 下, 以 1000 转 5 分钟离心。离心细胞时, 准备和标记冻存管。</p> <p>7. 轻轻地吸出上清液, 小心保持细胞团完整。</p> <p>8. 使用预冷的(2 -8° C) CryoStor™CS10 轻轻地重新悬浮细胞团, 然后将细胞悬液 转移至冷冻管中。</p> <p>9. 将冷冻管置于程序降温盒内 (大约-1° C /min) -80° C 冷冻细胞过夜, 然后转 移至液氮长期储存</p>
<p>供应限制 Product Use</p>	<p>仅供研究之用</p>
<p>常见问题及解决方案 Questions and solutions</p>	<p>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。</p> <p>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)</p> <p>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)</p> <p>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> <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>