

小鼠胚胎干细胞培养基

名 称	小鼠胚胎干细胞培养基
货 号	J10001-1
规 格	基础培养基 450mL，添加剂 50ml
使用范围	小鼠胚胎干细胞扩增、传代
保 存	1 年
用 途	仅供科研使用

【产品描述】

本产品适用于小胚胎干细胞的无饲养层的培养基。该产品可应用于干细胞传代，内含干细胞维持因子，维持细胞干性，防止细胞的凋亡、分化。

【产品特性】

1. 无需滋养层细胞，操作简便；
2. 优化配方，降低细胞分化风险；

【相关产品】

小鼠胚胎干细胞包被液（货号：CSP244）

小鼠胚胎干细胞消化液（货号：CSP142）

干细胞专用无血清细胞冻存液（货号：CSP083）

【操作步骤】（仅供参考）

小鼠胚胎干细胞培养基配制

- 1) 2-8℃解冻 Mouse ES Cell Supplement，融化后上下晃动混匀，按实际用量进行分装，立即使用或储存于-20~-80℃，避免反复冻融；

2)按 1:9 的比例将 Mouse ES Cell Supplement (50mL) 加入到 Mouse ES Cell Basal Medium(450mL)中, 混合均匀即成为小鼠胚胎干细胞培养基。混匀后的小鼠胚胎干细胞培养基可在2-8°C 稳定储存 2-3 周, 不建议使用配制已超过 3 周的小鼠胚胎干细胞培养基

3) 实验试剂平衡:小鼠胚胎干细胞培养基实验前放置室温避光平衡, PBS, 消化液等 37°C加热,

注意: 培养基中含有蛋白因子, 不要 37°C水浴加热。

小鼠胚胎干细胞的细胞复苏

1. 实验操作步骤:

1.1 小鼠胚胎干细胞包被液包被培养板: 取出 6 孔板/12 孔板, 每孔内加入 1 mL/0.5 mL 细胞包被液 (CSP244); 轻轻晃动 6 孔板/12 孔板使包被液完全覆盖皿底, 置于 37°C培养箱中孵育 1h, 实验前拿出并置于超净工作台/生物安全柜中室温下平衡 20min。

注意:

② 一支冻存的干细胞的数量在 1×10^5 cells/mL 左右, 对应 6 孔板 1 孔;

②包被液对温度敏感, 即用即拿, 用完后立即放回 4°C冰箱保存。

1.2 先将 3mL 的小鼠胚胎干细胞培养基加入 15mL 离心管中备用。

1.3 解冻: 将从液氮中取出的冻存管快速浸入 37°C温水中, 快速摇动, 使其在 1~2min 内快速解冻;

注意: 细胞从液氮中拿出的速度要快, 尽量减少其暴露在室温中的时间。

1.4 离心: 冻存管中的冻存液解冻后, 将其逐滴加入含有干细胞培养基的 15mL 离心管中, 将 15mL 离心管置于低速离心机中配比平衡后, 1500rpm 离心 5min;

1.5 重悬: 离心后, 弃上清, 加 1mL 小鼠胚胎干细胞培养基对干细胞沉淀进行吹吸混匀, 吹吸 3~5 次左右。

1.6 接种: 吹吸均匀后, 将已经平衡好的包被液弃掉, 将吹打均匀的干细胞悬液加入到已经包被好的 6 孔板中, 并补全每孔 2mL 培养体系。

1.7 培养: 接种后的 6 孔板可以置于倒置相差显微镜下观察接种的干细胞密度, 水平十字轻轻晃动 6 孔板使细胞均匀分布。并置于 37°C, 5% CO₂ 的恒温培养箱培养, 第 2 天观察细胞贴壁情况;

1.8 换液: 从复苏的时间开始每 48h 换液一次。

注意: 因培养基中活性成分只足够维持一天, 所以每 24h 应及时更换新鲜培养基。

小鼠胚胎干细胞的细胞传代

2. 实验具体操作步骤:

2.1 清洗: 吸掉原有培养基, 贴壁缓慢加入 1 mL PBS 缓冲液并轻轻晃动, 然后沿培养皿边缘吸去 PBS 缓冲液;

2.2 消化: 在 6 孔板中加入 2mL/孔小鼠干细胞消化液 (CSP142) 使之覆盖皿底, 并置于 37°C培养箱中 2~5 min;

注意: 消化时间依据干细胞生长密度, 消化时间略有不同, 根据经验一般建议时间 2-5min。消化过程中可以拿到倒置显微镜下观察细胞消化情况,

2.3 吹打: 加入 2mL 小鼠胚胎干细胞培养基, 终止消化, 用移液枪扇形吹打培养皿底, 轻柔吹打 3~5

次，使皿底干细胞集落脱落，并将其并转移到 15mL 离心管中；

注意：吹吸皿底细胞的力度要轻柔，吹打脱落和吹吸混匀的次数在 3~5 次为宜。如有少量细胞无法从皿底脱落，属于正常现象。如有大量细胞无法从皿底脱落，需延长消化时间。

2.4 离心：1500rpm 离心 5min；

2.5 接种：弃上清，用干细胞培养基吹打细胞 5-10 次，吸掉包被培养板中的包被液，并将细胞悬液加入到培养板中，且补全每孔 2mL 的培养体系。

注意：吹打细胞要温柔，并且吹打次数不要超过 10 次

2.6 换液：从传代的时间开始每 48h 换液一次。

小鼠胚胎干细胞的细胞冻存

3. 实验具体操作步骤：

3.1 清洗：同 2.1；

3.2 消化：同 2.2；

3.3 吹打：同 2.3；

3.4 离心：同 2.4；

3.5 重悬：离心后弃上清，加入 2 mL 干细胞专用无血清细胞冻存液（csp083）对干细胞沉淀进行吹吸混匀，吹吸 3~5 次后，将其加入到冻存管中；

注意：冻存液即用即拿，及时放回 4℃冰箱。

3.6 记录：在冻存管上标记冻存细胞种类、时间、操作者及细胞批次。

3.7 -80℃冰箱冻存：冻存管置于-80℃冰箱过夜。

注意：冻存管放置于-80℃冰箱时，要将冻存管

【质控检测】

检验项目	参考数据
外观	橙红色液体
澄清度	澄清
pH值	6.9~7.4
内毒素	< 3 EU/mL
渗透压	270-340 (mosm/KgH2O)
无菌实验	通过测试
支原体实验	通过测试

【注意事项】

- 1、注意无菌操作, 避免微生物污染。
- 2、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

警告:如果处理不当, 本产品的某些成分可能会对健康造成危害。处理本产品时应采取适当的预防措施, 包括穿戴防护服和眼镜。妥善处置。