

人胚胎干细胞 H9 无饲养层 SOP

细胞名称 Cell name	人胚胎干细胞 H9 无饲养层
货号 NO.	ZQ0692
描述 Description	人胚胎干细胞 H9，曾用名 WA09。每支细胞可复苏至六孔板的一个孔内，2 天后会形成紧密的克隆，培养时无需饲养层细胞。 此细胞经测试不含有 HIV-1、HBV、HCV、支原体、细菌、酵母和真菌。
种属 Species	人
性别 Gender	未知
组织来源 Tissue	人胚胎内细胞团
形态 Morphology	克隆状
培养特性 Culture Properties	贴壁
安全性 Safety	必须在二级生物安全柜内操作，并注意防护
推荐培养试剂 Recommended culture reagent	J10001-3 人胚胎干细胞培养基 500ml CSP210 即用型基质胶 (iPS) 100ml CSP215 人多能干细胞消化液 (iPS) 100ml CPS193 ES/iPS 细胞专用无血清冻存液 100ml 温度: 37℃ 气相: 95%空气, 5%二氧化碳
细胞复苏 Cell Thawing	1. 包被: 提前一天将即用型基质胶 (CSP210) 放入 2-8℃冰箱解冻, 使用时向 6 孔板中加入 1-1.5ml/孔, 轻轻晃动 6 孔板使基质胶完全覆盖孔底, 室温孵育 1-2h, 吸弃上清, 加入完全培养基备用。如果暂时不用, 可用 Parafilm 封口后 2-8℃储存, 并于 1 周内使用, 用之前室温固化 0.5h 以上 (基质胶全程置于冰上操作, 所用耗材也请提前预冷)。 2. 配制完全培养基: 按 1: 4 比例将添加物与基础培养基混匀。 3. 复苏: ① 准备至少 4 倍量的完全培养基, 逐滴加入细胞冻存液, 200 g, 5min 离心。 ② 离心后去上清, 加入完全培养基 2ml/孔, 加入抑制剂 Y27632 (只在复苏和传代当天加), 抑制剂终浓度为 10-20uM, 十字轻摇混匀细胞。第二天换成不加抑制剂 Y27632 的完全培养基。 ③ 每天换液: 完全吸走旧的培养基, 加入新的完全培养基, 每次换液间隔时间不能超过 24h。

	④ 如有较多分化的细胞时 ($\geq 10\%$ 或成小片状), 则在显微镜下用一次性枪头刮掉 (一边观察一边刮), 并通过换液方法立即将刮掉的细胞去掉, 从而达到纯化的目的。
传代 Subculturing	当细胞克隆变得较大而与相邻的克隆开始融合时, 这时可进行传代。 1. 提前准备基质胶包被好的孔板, 复温好的完全培养基、PBS、人多能干细胞消化液 (iPS) (CSP215)。 2. 消化: 吸掉旧的完全培养基, 用 PBS 洗一次, 加入 1-2ml/孔的人多能干细胞消化液 (iPS) (CSP215), 37°C消化 3-5 分钟, 大部分克隆边缘以及克隆内部出现间隙, 即刻吸掉消化液停止消化。 3. 终止消化: 吸掉消化液后, 加入 2ml 完全培养基终止消化, 用移液枪呈扇形吹打 6 孔板底 3-5 次, 将悬液转移到离心管内, 加入新鲜完培, 重复吹打, 五次以内, 合并转入离心管内, 重复操作直到细胞团完全转入离心管内。(吹打要轻柔, 避免形成单细胞) 4. 200 g, 5min 离心, 去上清。 5. 用完全培养基重悬计数, 根据适当密度传代。 6. 传代比例: 根据细胞汇合度 1:4-1:20 或者 6 孔板 5-8 万/孔。 注意: 细胞悬液不要吹打过度, 最好是保持接种前的大部分细胞均成 3-10 个/团。
冻存	1. 200 g, 5min 离心, 去上清。 2. 用 ES/iPS 细胞专用无血清冻存液 (CSP193) 重悬计数, 调整细胞密度, 转入提前标记好的无菌冻存管内。 3. 将冻存管放入程序降温盒内, 将程序降温盒放入 -80°C冰箱过夜, 第二天转入液氮罐长期保存。
保存 Storage	液氮存储
供应限制 Product Use	仅供研究之用

常见问题及注意事项请参考以下附录内容。

附录:

Note1: 包被好的六孔板严格要求回温时间在 30 分钟以上, 但不要太久。如果回温时间不充分会导致过多细胞飘起来不贴壁!

Note 2: 除非每次用量大, 培养基用前请用 50ml 的离心管小量配置。整瓶配制导致每次回温慢, 另外也会因为回温次数的增多损耗培养基的有效成分, 导致后面细胞状态变差。

Note 4: 复苏细胞: 在 37°C 水浴中轻缓地晃动冻存管, 当冰晶只有米粒大的时候即可取出。

Note 5: 换液前严格回温完全培养基 30 分钟以上 (但不要太久)。回温不充分容易导致死细胞增多, 细胞出现分化!

Note 6: 一定要每天换液! 换液的时间间隔在 24 小时, 误差不能太大, 过久换液, 死细胞增多且会出现分化! !

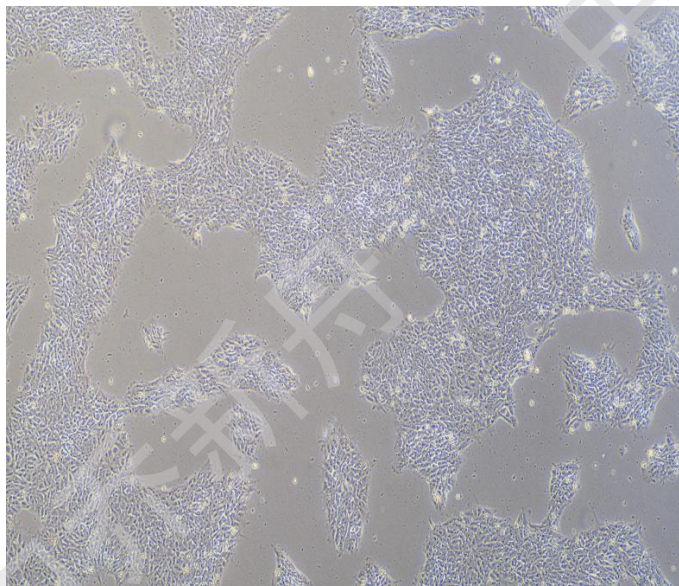
Note 7: 如有较多已分化的细胞 (不规则, 松散), 尽快刮出去掉, 注意不要刮到正常细胞克隆!

Note 8: 传代周期: 3-5 天, 不要长的太满, 单个克隆不要长的过大, 否则细胞易分化!

操作注意无菌, 不要长时间将细胞暴露在培养箱外面, 尤其是刮已分化的细胞时, 尽可能控制在 10 分钟内!

以下仅供参考

不同倍数下的细胞形态：(40×图)



100×图

