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，并请注意防护**
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** **CSP193 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(≥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℃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℃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 度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）。回温不充分会容易导致死细胞增多，细胞出现分化！

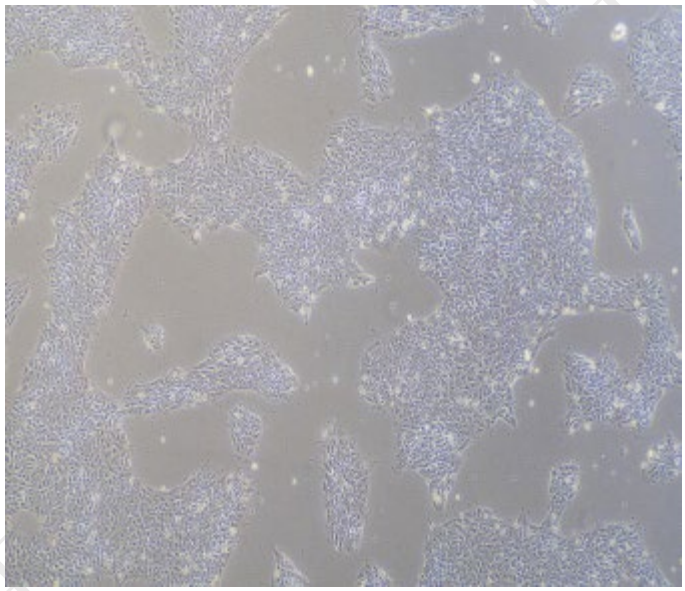
Note 6：一定要每天换液！换液的时间间隔在 24 小时，误差不能太大，过久换液，死细胞增多且会出现分化！！

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！

不同倍数下的细胞形态： (40×图)



100×图

