

## 小鼠胚胎干细胞E14

Cat No.:JY813



### Description

种属	小鼠
别称	E14
组织来源	129/Ola品系, 胚胎内细胞团
传代比例/细胞消化	1:2传代,消化1-2分钟
完全培养基配置	DMEM培养基; 15%胎牛血清; 1%谷氨酰胺; 1%非必需氨基酸; 1%丙酮酸钠; 0.5 mL β-巯基乙醇; 5g LIF; 1%双抗
简介	小鼠胚胎干细胞。该细胞缺乏 HGPRT (HPRT), 并且对 0.06 mM 的 6-硫鸟嘌呤有抗性。当在饲养层 (胚胎成纤维细胞或 STO 细胞) 上培养时, 细胞保持未分化状态。在没有饲养层的情况下, 细胞自发分化并形成胚胎结构。当注入胚泡中时, 细胞可以进入生殖系。在常规分子基因修饰技术之后, 它们可用于重构小鼠胚胎。培养时需使用昆明MEF作为饲养层细胞。
形态	球形克隆
生长特征	贴壁生长
倍增时间	每周2至3次
培养条件	气相: 空气, 95%; 二氧化碳, 5%。温度: 37摄氏度, 培养箱湿度为70%-80%。
冻存条件	冻存液: 90%FBS, DMSO 10%, 或使用非程序冻存液: 官网货号JY-H040
产品使用	仅限于科学研究, 不可作为动物或人类疾病的治疗产品使用。

#### 细胞接收处理流程:

- 1: 观察有无破损漏液情况, 如有请拍照及时联系客服。
- 2: 酒精消毒培养瓶表面后显微镜下观察细胞状态, 观察拍照后不用打开培养瓶盖 放入培养箱静止2-3小时稳定 细胞状态。
- 3: 请按照细胞操作指南进行第一次传代冻存处理。
- 4: 产品随货会附带细胞说明书、细胞培养操作指南、细胞鉴定、支原体检测报告。
- 5: 若产品有异常或其他疑问, 可随时联系客服; 转至技术支持。

## 注意：

1、建议使用 KM- MEF 作为饲养层细胞。

2、在铺胚胎干细胞前，需对 MEF 进行处理，具体处理步骤见下文丝裂霉素灭活 MEF。

3、该细胞建议冻存干冰发货，不适合长时间活细胞运输，会影响细胞活力。

2) 培养条件：气相：空气，95%；二氧化碳，5%。温度：37°C，培养箱湿度为 70%-80%。

3) 冻存液：完全培养液 60%%，FBS 30%%，DMSO 10%%现用现配。

我库冻存时，体积为 500  $\mu$ l，预期存活率 70%，每支冻存管的细胞复苏，3 至 4 天后，会形成 30 至 40 个克隆，建议复苏至 1 个 T25 培养瓶中。

## 二：细胞处理

### 丝裂霉素灭活 MEF

待 MEF 细胞密度达到 80%以上，加入含丝裂霉素（15 $\mu$ g/mL）的 MEF 完全培养液，置于 37 培养箱中孵育 2.5h，2.5h 后，弃掉培养液，PBS 清洗 1-2 遍，加入 MEF 培养基，备用，当天 2h 后或者第二天可以传入小鼠胚胎干细胞。

### 复苏：

- 1.将小鼠胚胎干细胞冻存管从液氮中取出，置于 37°C水浴中使之迅速融解，取出后拿到超净台内用 75%酒精擦拭冻存管旋口处及外壁，防止污染。
2. 将冻存管内细胞悬液转移至含 3-4 ml 小鼠胚胎干细胞完全培养液的 15ml 离心管内，以 1000 rpm，离心 5 min。
3. 离心后将上清液吸除，另加入新鲜的小鼠胚胎干细胞完全培养液 2 ml，吹打悬浮。

4. 重复吹打，制成单细胞悬液，尽量避免气泡。
5. 转移至 1 个已经铺好 MEF 细胞的 T25 培养瓶中培养。
6. 每天更换小鼠胚胎干细胞完全培养液。

### **传代：**

1. 一般在复苏后第 2-3 天传代，视克隆大小和密度而定
2. 吸除废液。
3. 用 PBS（不含钙镁离子）轻轻冲洗一遍。
4. 加入 1.0 ml 的 0.25%胰酶(含 EDTA)至培养瓶, 轻轻晃动, 使胰酶覆盖底面, 置于 37°C 培养箱内消化细胞。
5. 在显微镜下观察，直至细胞层全部脱落（一般需要 1-2 min）。
6. 加 2 ml 小鼠胚胎干细胞完全培养液终止消化。
7. 以 1000 rpm，离心 5 min，弃上清。
8. 加入约 1 ml 小鼠胚胎干细胞完全培养液，多次轻轻吹打细胞，制成单细胞悬液。
9. 加入足量的小鼠胚胎干细胞完全培养液，吹打混匀，细胞悬液分装到铺好 MEF 细胞的 T25 培养瓶中。一般地，一个 T25 培养瓶加入 5-6 ml 培养液。放入 37°C培养箱内培养。每天换液。

传代比例：1:4-1:7

### **冻存：**

- 1.按传代的方法将细胞消化下来，制成细胞悬液。
2. 以 1000 rpm，离心 5 min，弃上清，逐滴加入已经预冷的冻存液，悬浮细胞。
3. 按每支存管内加入 500 ml 细胞悬液分装到冻存管内，标记细胞名称、代数、冻存日期等基本信息。
4. 将冻存管置于程序降温盒内，-80°C过夜，转入液氮。

#### **冻存液配方：**

小鼠胚胎干细胞完全培养液 60%，ES 级 FBS 30%，DMSO 10%

#### **附：小鼠胚胎干细胞与 MEF 细胞分离的简易方法（差速贴壁法）：**

- 1.培养中的小鼠胚胎干细胞，按传代的操作方法将细胞用胰酶消化并吹打成单细胞悬液后，加入适量的提前温育好的小鼠胚胎干细胞完全培养液重悬细胞，吹打混匀，细胞悬液分装到无 MEF 细胞的培养皿或培养瓶（一般地，一个 T25 培养瓶中培养的小鼠胚胎干细胞，在一个 10 cm 培养皿中进行差速贴壁。不要事先铺明胶，如铺明胶则细胞贴壁速度过快无法有效分离小鼠胚胎干细胞与 MEF 细胞）中。
2. 培养皿或培养瓶置于 37°C 培养箱内静置 1 小时。
3. 1 小时后，绝大部分 MEF 细胞已贴在培养皿或培养瓶底面，而大部分小鼠胚胎干细胞仍然悬浮在培养液中。收取培养液，进行后续实验。