

### E14 小鼠胚胎干细胞 (种属鉴定)

#### Mouse Embryonic Stem Cells ,ES-E14TG2a

#### 【产品介绍】

小鼠胚胎干细胞。该细胞缺乏 HGPRT (HPRT) , 并且对 0.06mM 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。

在常规的分子基因修饰技术之后, 它们可用于重构小鼠胚胎。培养时需使用昆明白 MEF 作为饲养层细胞。

#### 【包装】

产品编号	产品名称	发货状态	规格
TS-514	E14 小鼠胚胎干细胞	复苏	T25 瓶
		冻存	1mL 冻存管*2

#### 【细胞特性】

动物种别 Organism	小鼠
性别 Gender	***
形态 Morphology	球形克隆, 贴壁生长

组织来源 Tissue and Cell Type	129/Ola品系，胚胎内细胞团
标识符 Identifier	
供应限制 Permits and Restrictions	仅限于研究使用

**【培养基及培养冻存条件准备】**

培养体系	准备DMEM基础培养基81%+优质胎牛血清15%+GlutaMAX-1谷氨酰胺1%+MEM NEAA非必需氨基酸 1 %+Sodium Pyruvate丙酮酸钠 1%P/S青霉素-链霉素1% β-巯基乙醇0.5 mL (1000X)LIF5μg (10ng/mL)
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	90%的血清，10%DMSO,现用现配
传代比例	根据实际情况按1:2~1:5的比例进行

使用昆明白MEF作为饲养层细胞

**【细胞处理】**

MEF 细胞铺制：

1. 在 T25 培养瓶中加入 0.2%明胶，摇匀后覆盖底面即可，于 37℃ 细胞培养箱至少放置 15min 以上。
2. 吸除 0.2%明胶，加入事先水浴加热至 37℃ 的 MEF 完全培养液。一般地，一个 T25 培养瓶中加入 5mlMEF 完全培养液。
3. 按实验需要:小鼠胚胎干细胞使用 KM-r P3 MEF 或 CF-1 P3 MEF;复苏 MEF 细胞若干支。将冻存管从液氮中取出，置于 37℃ 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。
4. 将冻存管内细胞悬液转移至含 2mlMEF 完全培养液的 15ml 离心管内，以 1000rpm，离心 5min，离心后将上清液吸除，另加入新鲜的 MEF 完全培养液 1ml，重悬后按照一个 T25 培养瓶铺  $1 \times 10^6$  的 MEF 细胞，平均加入到 T25 培养瓶中，轻轻摇匀后置于 37℃ 细胞培养箱。24h 以后可以传入小鼠胚胎干细胞。
5. 复苏或传代小鼠胚胎干细胞前，将 T25 培养瓶中的 MEF 完全培养液吸除，加入 2ml 小鼠胚胎干细胞完全培养液轻轻冲洗一遍后吸除，加入新鲜的小鼠胚胎干细胞完全培养液待用。

#### 【复苏细胞】

将含有 1mL 细胞悬液的冻存管在 37℃ 水浴中迅速摇晃解冻，加入 4-6mL 完全培养基混合均匀。在 1000RPM 条件下离心 3-5min，弃去上清液，完全培养基重悬细胞。然后将细胞悬液加入含 6-8ml 完全培养基的培养瓶(或皿)中 37℃ 培养过夜。第二天显微镜下观察细胞生长情况和细胞密度。

#### 【细胞冻存】

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。

**【对于贴壁细胞，传代可以参考以下方法】**

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 1.0ml 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 1-2min）。
6. 加 2ml 小鼠胚胎干细胞完全培养液终止消化。
7. 以 1000rpm，离心 5min，弃上清。
8. 加入约 1ml 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 5-6ml 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。

**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 10cm 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。

### **【运输和保存】**

1mL 冻存管包装干冰运输，收到后立即转入液氮或者-80 度冰箱冻存或直接复苏。

T25 瓶复苏的存活细胞常温发货，收到后按照细胞接收后的处理方法操作。

收到细胞后请拍照，若发现干冰已挥发干净、冻存管瓶盖脱落、破损及细胞有污染，请及时拍照与我们联系。

### **【注意事项】**

- ✔ 请换用按照说明书细胞培养条件新配制的完全培养基来培养细胞。
- ✔ 收到细胞后第一次传代建议 T25 培养瓶 1:2 传代。
- ✔ 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- ✔ **本产品仅供研究使用，不可用于人或动物的体外诊断与治疗。**
- ✔ **For laboratory use only. Not for diagnostic or therapeutic use.**