

小鼠胚胎干细胞C57BL/6

Cat No.:JY-Y1275



Description

种属	小鼠
别称	C57BL/6
组织来源	小鼠, C57BL/6品系
疾病	胚胎内细胞团
传代比例/细胞消化	1:2传代,消化2-3分钟。
完全培养基配置	DMEM培养基; 15%胎牛血清; 1% GlutaMAX-1谷氨酰胺; MEM NEAA非必需氨基酸; Sodium Pyruvate丙酮酸钠; β -巯基乙醇 0.5 mL; LIF 5 μ g; 1%双抗
简介	C57BL/6植入c2J囊胚时, 毛色嵌合体的得率高; 而植入FVB囊胚产生的嵌合体数量少。ES细胞可以进入FVB/NJ (FVB) 和同源突变品系C57BL/6-Tyrc-2J (c2J) 这两个供体宿主囊胚的生殖系。
形态	球形克隆细胞样
生长特征	贴壁生长
倍增时间	每周 2-3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	完全培养液 60%, FBS 30%, DMSO 10%现用现配
备注	使用昆明白MEF作为饲养层细胞。
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。

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°C细胞培养箱至少放置 15 min 以上。
2. 吸除 0.2%明胶，加入事先水浴加热至 37°C的 MEF 完全培养液。一般地，一个 T25 培养瓶中加入 5 ml MEF 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°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。
4. 将冻存管内细胞悬液转移至含 2 ml MEF 完全培养液的 15 ml 离心管内，以1000 rpm，离心 5 min，离心后将上清液吸除，另加入新鲜的 MEF 完全培养液 1 ml，重悬后按照一个 T25 培养瓶铺 1'10⁶ 的 MEF 细胞，平均加入到 T25 培养瓶中，轻轻摇匀后置于 37°C细胞培养箱。24 h 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 2 ml 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：

- 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。