

产品说明书

OriCell 129 小鼠胚胎干细胞 (**ESCs**)

货号: **MUAES-01001**

目录

产品基本信息.....	1
产品介绍.....	1
产品特性.....	1
产品应用领域.....	2
处理原则.....	2
培养瓶/皿包被 0.1%明胶.....	2
ICR 小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）的复苏.....	3
OriCell 129 小鼠胚胎干细胞的复苏.....	4
OriCell 129 小鼠胚胎干细胞的传代.....	6
OriCell 129 小鼠胚胎干细胞的分化.....	7
无蛋白非程序冻存液冻存 OriCell 129 小鼠胚胎干细胞.....	9
相关产品.....	9
参考文献.....	10

产品基本信息

产品名称	129 小鼠胚胎干细胞
货号	MUAES-01001
规格	1×10 ⁶ 个细胞/管
冻存代次	P20
保存条件	液氮



警告：产品冻存液中含有DMSO，具有潜在的生物公害，操作者请谨慎处理。

产品介绍

胚胎干细胞（ESCs）是来源于囊胚内细胞团的全能干细胞。具有向外胚层、内胚层、中胚层分化的能力，可以分化成各种类型细胞。不同于其他干细胞，胚胎干细胞具有无限增殖能力。胚胎干细胞的可塑性和无限增殖的能力，使其成为再生医学和组织工程研究的热点。

Cyagen 129 小鼠胚胎干细胞在体外扩增培养后仍维持正常二倍体，表达胚胎干细胞的特殊标记物，在体外培养能形成拟胚体（EB），体内实验可以形成畸胎瘤。

Cyagen 129 小鼠胚胎干细胞来源于129小鼠3.5天囊胚期的内细胞团，使用OriCell的小鼠胚胎干细胞培养基并在经 γ -射线处理的MEF（小鼠胚胎成纤维细胞）上培养。

质量控制：

- 本产品经过了细菌/真菌、支原体、内毒素检测。
- 本产品还经过细胞复苏活力检测，细胞周期，细胞传代能力，分化潜能鉴定。

该产品仅提供给进一步科研使用，不可应用于临床治疗等其他方面。

产品特性

- 具有向三个胚层分化的能力。
- 在特定条件下能无限增殖。

- 表达Oct4、SSEA-1 和Nanog ($\geq 90\%$), 不表达 SSEA-3和SSEA-4 ($\leq 5\%$)。

产品应用领域

129 小鼠胚胎干细胞是很多领域的基础和应用研究的强有力工具, 包括发育和调控研究、再生生物学、潜在治疗方法。此外对胚胎干细胞进行基因修饰并将其引入到小鼠生殖系中是获得基因修饰小鼠的一个非常有效的方法。

处理原则

1. 要在无菌的条件下处理该产品。
2. 如果使用饲养层的条件下, 建议使用Cyagen OriCell ICR小鼠胚胎成纤维细胞 (已灭活) (货号: MUIEF-01002)。
3. 如果使用无血清无饲养层条件培养, 建议使用Cyagen OriCell 小鼠胚胎干细胞无血清培养基 (货号: MUXES-90061)。
4. 传代培养过程, 建议的接种密度是 $(1.0\sim 2.0) \times 10^4$ cells/cm², 具体数量请根据细胞状态加以调整。



注意: 我们强烈建议使用OriCell 培养基和其他相关试剂以达到最理想的培养效果。

培养瓶/皿包被 0.1%明胶

所需材料

- 明胶溶液 (货号: GLT-11301)

为了使 γ 射线照射处理的第一代小鼠胚胎成纤维细胞更有效地贴附于培养器皿, 要对培养器皿的表面进行明胶包被。

操作:

1. 加适量0.1%明胶到培养瓶/皿中, 能覆盖整个培养瓶/皿底面即可。
2. 摇匀液体使其覆盖整个培养瓶/皿的底面。
3. 将铺有0.1%明胶的培养瓶/皿放置在超净台至少30 min。
4. 30 min后弃去明胶, 待培养瓶/皿晾干后, 即可用于接种细胞。



注意: 包被明胶的培养瓶/皿在无菌和明胶不蒸干的条件下, 可以在4°C保存两周。

ICR 小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）的复苏

所需材料

- OriCell ICR小鼠胚胎成纤维细胞（货号：MUIEF-01002）
- OriCell ICR小鼠胚胎成纤维细胞完全培养基（货号：MUXEF-90011）

MEF细胞的复苏

1. 水浴锅37°C预热。
2. 准备好ICR小鼠胚胎成纤维细胞完全培养基，温浴到37°C。
3. 取一个15 mL离心管中加入9 mL ICR小鼠胚胎成纤维细胞完全培养基。
4. 从液氮罐中取出一管MEF细胞，立即放入-80°C冰箱（目的是让进入冻存管的液氮挥发）。
5. 在-80°C放置2~3 min后，取出MEF，迅速放入37°C水浴锅中快速晃动，仔细观察，直至冻存液完全融化。



注意：

- ① 尽可能避免水没过管帽，以减少污染的风险。
 - ② 要快速完成细胞复苏过程，融化过程时间过长，会造成复苏后的细胞活性较差。
6. 用70%~75%酒精消毒冻存管口的表面。
 7. 在超净台中打开冻存管，用吸管将细胞冻存悬液转移至装有9 mL 胚胎成纤维细胞完全培养基的离心管中。
 8. 用1 mL培养基再次冲洗冻存管，减少细胞的损失。
 9. 将细胞悬液经250 ×g（对应于Eppendorf 5810R离心机是1134 rpm）离心5 min后，尽量去除上清液。
 10. 向细胞沉淀物加入1 mL的胚胎成纤维细胞完全培养基，轻轻吹打混匀细胞沉淀。
 11. 将细胞按 2.5×10^4 个活细胞/cm²的密度接种到培养器皿中，加入足量的胚胎成纤维细胞完全培养基，轻轻摇晃细胞培养器皿使细胞均匀分布。
 12. 放入37°C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。
 13. 复苏后的第2天，给复苏的细胞换用新鲜的小鼠胚胎成纤维细胞完全培养基（已预热到37°C）。



注意:

- ① 如果MEF细胞换液当天将复苏小鼠胚胎干细胞，可以直接更换成小鼠胚胎干细胞培养基。
- ② 胚胎干细胞复苏前一天复苏MEF细胞。
- ③ 复苏后的MEF应在5天内使用。

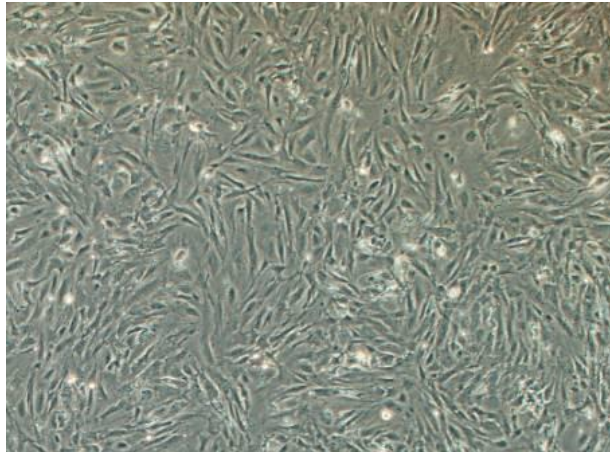


图1 生长在0.1%明胶包被培养瓶/皿上的Cyagen OriCell MEF (已灭活)

OriCell 129 小鼠胚胎干细胞的复苏

所需材料

- OriCell 129 小鼠胚胎干细胞（货号：MUAES-01001）
- OriCell 129小鼠胚胎干细胞完全培养基（货号：MUAES-90011）

复苏小鼠胚胎干细胞

1. 水浴锅37°C预热。
2. 准备好129小鼠胚胎干细胞完全培养基，温浴到37°C。
3. 在15 mL 离心管中加入 9 mL胚胎干细胞完全培养基。
4. 从液氮罐中取出冻存的小鼠胚胎干细胞，立即放入-80°C冰箱（目的是让进入冻存管的液氮稍加挥发）。
5. 在-80°C放置2~3 min后，取出冻存细胞，将冻存管迅速放入37°C温水中，快速晃动使管内含物尽快融化。仔细观察，待冻存管内含物完全融化后取出。



注意:

- ① 尽可能避免水没过管帽，以减少污染的风险。
- ② 要快速完成细胞复苏过程，融化过程时间过长，会造成复苏后的细胞活性较差。

6. 用70%~75%酒精擦拭消毒冻存管口的外表面。
7. 在超净台中打开冻存管，用吸管将细胞冻存悬液转移至装有完全培养基的离心管中。注意尽量避免产生气泡。
8. 为了减少细胞损失，再往冻存管中加入1 mL完全培养基，稍微吹打，收集至离心管中。
9. 将细胞悬液经 $250 \times g$ （对应于Eppendorf 5810R离心机是1134 rpm）离心5 min。
10. 尽量去除上清液，向细胞沉淀物加入1~2 mL的完全培养基（已预热至 37°C ），轻轻吹打混匀细胞沉淀。
11. 将小鼠胚胎干细胞按 $(1.0\sim 2.0) \times 10^4$ 个活细胞/ cm^2 的密度接种到已换好液的铺有MEF的培养器皿中，加入足量的胚胎干细胞完全培养基（已预热至 37°C ）。轻轻摇晃细胞培养器皿，使细胞均匀分布。
12. 放入 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中培养；
13. 复苏之后的第2天，给复苏的细胞换用新鲜的小鼠胚胎干细胞完全培养基（已预热至 37°C ）。



注意：为避免反复温热培养基，如果在一次操作中无法用完整瓶培养基，建议分装到适当的无菌容器中。换液时只取当天所需用量的培养基量进行预热。

14. 之后，每24 h给细胞更换新鲜的小鼠胚胎干细胞完全培养基（已预热至 37°C ）。

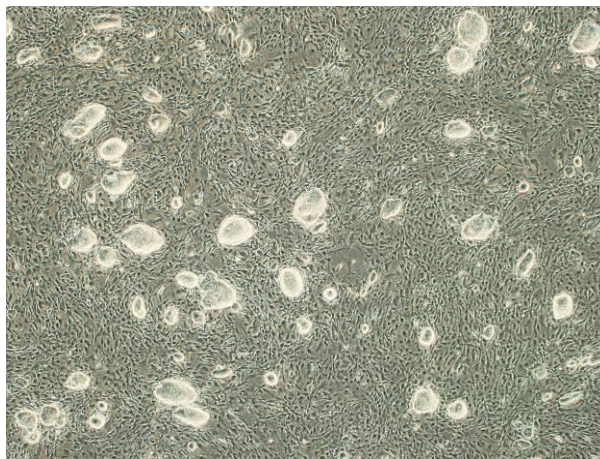


图2 培养在Cyagen OriCell MEF（已灭活）上的129小鼠胚胎干细胞（P21）

OriCell 129 小鼠胚胎干细胞的传代

所需材料

- OriCell 129小鼠胚胎干细胞完全培养基（货号：MUAES-90011）
- OriCell ICR小鼠胚胎成纤维细胞完全培养基（货号：MUXEF-90011）
- 包被MEF的培养器皿

胚胎干细胞传代



注意：通常情况下，细胞培养 48 h 即可进行下一次传代。

当小鼠胚胎干细胞出现以下情况时就必须传代：

- ① 小鼠胚胎干细胞的克隆较大，出现分化或即将分化。
- ② 小鼠胚胎干细胞虽然没有出现明显的分化，但是由于传代接种密度的问题，出现或即将出现克隆间融合。

1. 实验准备：提前1~3天准备饲养层细胞（见ICR小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）的复苏）。
2. 将129小鼠胚胎干细胞完全培养基、ICR小鼠胚胎成纤维细胞完全培养基（终止消化用）、1×PBS、0.25% Trypsin-0.04% EDTA预热至37°C。
3. 吸去小鼠胚胎干细胞培养器皿中旧的培养基。
4. 用1×PBS洗涤（T25培养瓶加入约3 mL）2~3次，以去除残留的血清。注意不要损害贴壁的细胞。
5. 吸去1×PBS。
6. 加入0.25% Trypsin-0.04% EDTA（T25培养瓶加入约1 mL），轻轻旋转，使Trypsin-EDTA覆盖细胞表面，消化，显微镜下观察到约70%~80%左右的细胞变圆后，用手轻拍培养器皿的壁使细胞脱壁。



注意：由于不同实验室所使用的胰酶效价不同，消化时间可能会略有不同，具体时间应以显微镜下观察到的情况为准。

7. 当看到明显的细胞脱落下来，立即加入预热的ICR小鼠胚胎成纤维细胞完全培养基（T25培养瓶加入约3 mL）终止消化。
8. 用吸管吸取液体，反复吹打培养器皿底壁，使细胞彻底脱离瓶皿底壁。吹打时动作不宜太剧烈，尽量避免产生气泡。
9. 将细胞悬液转移到15 mL的离心管中。用1×PBS清洗低壁，收集洗液至离心管中。
9. 250 ×g，离心5 min。

10. 离心后小心弃去上清液，加入2 mL小鼠胚胎干细胞完全培养基重悬细胞。吹打时动作不宜太猛，尽量避免产生气泡。
11. 将小鼠胚胎干细胞按 $(1.0\sim 2.0) \times 10^4$ 个活细胞/cm² 的密度，接种到已换好液的铺有MEF的培养器皿中。轻轻摇晃细胞培养器皿，使细胞均匀分布。



注意：一定要按照合适的密度进行接种，密度太稀则细胞生长慢，密度过密则容易导致胚胎干细胞分化。

12. 放入37°C、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。
13. 每天24 h给细胞更换新鲜的小鼠胚胎干细胞完全培养基（已预热至37°C）。

OriCell 129 小鼠胚胎干细胞的分化

OriCell 129小鼠胚胎干细胞在体外培养条件下能形成拟胚体，体内实验能形成畸胎瘤。

所需材料

- OriCell 拟胚体（EB）形成培养基（货号：MUXES-90051）

拟胚体（EBs）的形成是胚胎干细胞分化的主要步骤。在缺少小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）饲养层的情况下，胚胎干细胞经EB形成培养基的刺激会自发分化形成三维聚集体，这种结构有利于细胞的相互作用，比如细胞间的接触和间隙连接的建立。

胚胎干细胞拟胚体的诱导

1. 准备明胶包被的100 mm细胞培养皿。见“培养瓶/皿包被0.1%明胶”。（Page 2）
2. 准备一个T75培养瓶的胚胎干细胞（约 1×10^7 cells）。当细胞生长至对数期时可进行拟胚体制备。
3. 消化细胞。注意：需将细胞消化为单个，确保其均一性。加入拟胚体形成培养基终止消化。
4. 收集细胞，将细胞悬液转入15 mL离心管，250 ×g 离心5 min。
5. 小心弃去上清。
6. 加入拟胚体形成培养基进行重悬，接种约 5×10^6 个细胞至明胶包被的培养皿中，加入约8 mL拟胚体形成培养基。
7. 放入37°C、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中贴壁培养40 min去除MEF。
8. 取出培养皿，轻轻用吸管收集未贴壁细胞（多数为胚胎干细胞）进行下一步。收集悬液中的MEF残留较多，有必要可重复上述5~8步骤一次，再次贴壁去除MEF。

9. 计数后调整细胞密度为 5.5×10^4 cells/mL，接种于60 mm细胞培养皿中，每个皿加入5 mL细胞悬液。
10. 放置于 37°C、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养 48 h。
11. 两天后可见大小不均匀的球形悬浮状拟胚体，此时大部分拟胚体较小，胚体透亮，折光性良好，采用离心法（140 ×g，离心1 min）换液。
12. 换液后接种于新的细菌培养皿中，放置于37°C、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中继续培养72 h。
13. 在接下来的三天中胚体逐渐增大，高倍镜下拟胚体应透亮紧密，个别拟胚体间可能会呈现聚集粘连趋势。
14. 拟胚体悬浮培养5天后，140 ×g，离心1 min，用拟胚体形成培养基将拟胚体重悬，将其接种于24孔板，1 mL/孔，共接种8孔，每孔拟胚体数量约10~20个。
15. 连续在37°C、5%CO₂，饱和湿度培养箱中培养14天，每2~3天换液，观察拟胚体分化情况，如分化较理想，在分化5~7天时可观察到分化心肌的自主搏动现象。
16. 14天后，用免疫荧光法检测内胚层、中胚层、外胚层的分化情况。

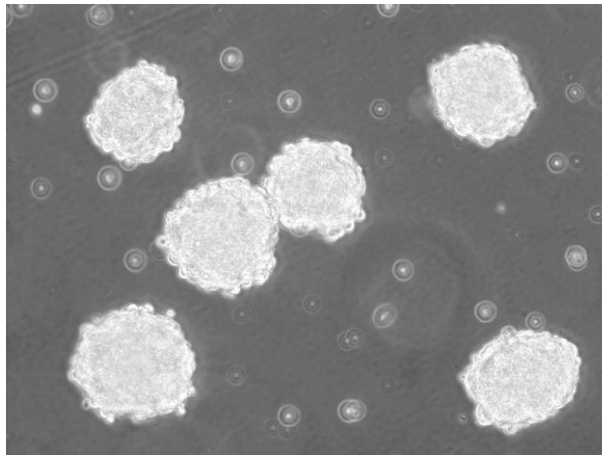


图3 来源于OriCell 129 胚胎干细胞的拟胚体（EB）图片

无蛋白非程序冻存液冻存 OriCell 129 小鼠胚胎干细胞

所需材料

- OriCell 小鼠胚胎干细胞无蛋白非程序冻存液（货号：MUXES-07021）

OriCell 小鼠胚胎干细胞无蛋白非程序冻存液 (货号：MUXES-07021) 是无蛋白、即用型冻存液。无蛋白、成分明确，适合于干细胞和原代细胞冻存，不影响细胞的生长和分化潜能。无需程序冻存，细胞可直接置于-80°C 冰箱，操作更加方便快捷。

冻存：



注意：冻存前24小时需要给细胞换上新鲜的完全培养基。

1. 待细胞生长至可传代的密度，即可消化准备冻存。
2. 细胞的消化参考OriCell 129 小鼠胚胎干细胞的传代操作1-10步骤。（Page 6）
3. 对细胞进行计数。
4. 消化后的细胞悬液经250 ×g，离心5 min。
5. 小心弃去上清。
6. 用OriCell 小鼠胚胎干细胞无蛋白非程序冻存液重悬细胞，并使细胞的密度为 1×10^6 个活细胞/mL（或希望达到的细胞密度）。



注意：OriCell 小鼠胚胎干细胞无蛋白非程序冻存液在使用前需保持4°C。

7. 将细胞悬液分装到冻存管中，做好相应标识。
8. 将封好的冻存管直接放进-80°C 冰箱。24 h 后将细胞转移至液氮进行长期保存。



注意：如使用程序冻存液，需将封好的冻存管放入程序降温盒后方可放入-80°C 冰箱。

相关产品

产品名称	产品货号
OriCell ICR小鼠胚胎成纤维细胞（灭活）	MUIEF-01002
OriCell 小鼠胚胎干细胞无血清培养基（I型） （无血清有饲养层）	MUXES-90062
OriCell小鼠胚胎干细胞无血清培养基（II型） （无血清无饲养层）	MUXES-90061

参考文献

G R Martin.(1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. PNAS 78:7634-7638.

T M Magin, J McWhir, and D W Melton. (1992) A new mouse embryonic stem cell line with good germ line contribution and gene targeting frequency. Nucleic Acids Research 20(14):3795-3796.

J A Thomson, J Kalishman, and T G Golos.(1995) Isolation of a primate embryonic stem cell line. PNAS 92: 7844-7848.

Cyagen Biosciences保留OriCell细胞培养产品技术文件的所有权利。

没有**Cyagen Biosciences**的书面许可，本文件的任何部分不得改编或转载用作其他商业用途。