



细胞系使用说明书

细胞名称	D3小鼠胚胎干细胞
货号	CQ50015
种属	小鼠
细胞来源	ATCC/中科院/协和医院等地引进
生长特性	球形，贴壁
培养条件	培养基：D3 小鼠胚胎干细胞完全培养液 温度：37℃ 气相：95%空气，5%二氧化碳
传代	1. 小鼠胚胎成纤维细胞（MEF）的复苏 2. 小鼠胚胎干细胞的复苏（以 T25 为例） a. 水浴锅 37° C 预热，将小鼠胚胎干细胞完全培养液温浴到 37° C。 b. 从液氮中取出冻存的小鼠胚胎干细胞，放入水浴锅中，快速晃动使管中的细胞尽快融化，仔细观察，待剩最后一块冰晶时，快速取出。 c. 用 75%酒精擦拭消毒冻存管口的外表面，在超净台中打开冻存管，将细胞冻存悬液转移至含有 4ml 完全培养基的离心管中，注意减少气泡的产生。 d. 为了减少细胞损失，再往冻存管中加入 1ml 完全培养基，稍微吹打，收集至离心管中。 e. 将细胞悬液离心 1000rpm/5min。离心期间，将 MEF 细胞换用小鼠胚胎干细胞完全培养液。 f. 离心后，去除上清，加入 1ml 小鼠胚胎干细胞完全培养液，轻轻吹打混匀。 g. 将小鼠胚胎干细胞按 10000-40000 个活细胞/cm² 的密度接种到已经换好液的 MEF 细胞中，轻轻摇晃培养瓶，使细胞均匀分布。放入 37° C，5%CO₂ 的培养箱中培养。 h. 复苏后第二天，给复苏的细胞换用新鲜的小鼠胚胎干细胞完全培养基（已 37° C 预热）。每天换液。 3. 小鼠胚胎干细胞的传代 a. 当小鼠胚胎干细胞的克隆较大，出现分化或即将分化；或者由于复苏或传代接种的密度的问题，即将出克隆间融合，就必须传代。 b. 传代前准备，提前 1-3 天准备 MEF 细胞 c. 将小鼠胚胎干细胞完全培养基，小鼠胚胎成纤维细胞完全培养液，0.25%胰酶（含 EDTA），PBS 预热至 37° C。 d. 吸弃培养瓶的旧培养液，加入 2ml PBS 洗涤细胞，吸弃 PBS，加 1ml 0.25%胰酶覆盖细胞表面，消化，显微镜下观察，约 70-80%左右的细胞变圆后，用手轻拍培养瓶的壁，使细胞脱落下来。 e. 立即加入 1ml 小鼠胚胎成纤维细胞完全培养液，终止消化。轻轻吹打混匀。 f. 将细胞悬液转移到 15ml 离心管中。1000rpm/5min。





	i. 离心期间，将 MEF 细胞换用小鼠胚胎干细胞完全培养液。 j. 离心后，去除上清，加入 1ml 小鼠胚胎干细胞完全培养液，轻轻吹打混匀。 k. 将小鼠胚胎干细胞按 10000-40000 个活细胞/cm² 的密度接种到已经换好液的 MEF 细胞中，轻轻摇晃培养瓶，使细胞均匀分布。放入 37° C, 5%CO₂ 的培养箱中培养。 注意：一定要按照合适的密度进行接种，密度太稀则细胞长得慢，密度过密则容易导致胚胎干细胞的分化。
保存	冻存条件：50%完全培养基+40%FBS+10%DMSO (备注：建议使用本公司的冷冻液（H-W-100），用 4 度保存的冷冻液直接重悬细胞，不能预热后使用。) 保存条件：液氮存储
供应限制	仅供研究之用
常见问题及解决方案	1.培养瓶有破裂，培养液有漏液：细胞极大可能会污染，所以我们会及时安排帮老师解决。 2. 收到细胞后尽快更换为含 10%血清的新鲜培养基，如因特殊情况需要继续使用原瓶培养基，请在原瓶培养基中额外添加 10%的血清（原瓶培养基的继续使用时间最长不宜超过 72 小时） 3.细胞漂浮：培养瓶不开封，瓶口酒精擦拭后平躺放置在培养箱。1-2 小时后观察，如细胞大部分又贴回瓶底，表明细胞活力正常，剩余漂浮的细胞可以去掉，留 8-10ml 培养液培养观察，细胞生长至汇合度 80%，进行消化传代；如细胞还是不贴壁，将细胞离心收集转到新培养瓶，原培养瓶加部分培养液继续培养，中间注意观察，我们的技术人员会一直跟踪指导，直到问题解决。

