

## 小鼠胚胎干细胞 ES-E14TG2a 说明书

中国科学院干细胞库编号：SCSP-204

细胞名称：ES-E14TG2a

细胞描述：小鼠胚胎干细胞

物种：小鼠，品系：129/Ola

细胞来源：2007 年引进

ATCC number：CRL-1821™

完全培养液配方：mES 完全培养液（产品编号 SCSP-603）。配方见备注。

建议冻存细胞总数： $1 \times 10^6$ /支

建议冻存体积：500μl/支

预期存活率：70%

批次/冻存日期：详见 冻存管/培养瓶 标识

建议复苏培养体系：1 个 T25 培养瓶

参考传代周期：2–3 天

参考传代比例：1:4–1:7

参考换液频率：每天

冻存液配方：完全培养液 60%，ES 级 FBS 30%，DMSO 10%

细胞状态：贴壁生长，需使用昆明白 MEF（SCSP-101R）作为饲养层细胞

支原体检测结果：阴性

### References:

Smith AG, Hooper ML. Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. Dev. Biol. 121: 1-9, 1987. PubMed: [3569655](#)

Kuehn MR, et al. A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. Nature 326: 295-298, 1987. PubMed: [3029599](#)

Doetschman T, et al. Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. Nature 330: 576-578, 1987. PubMed: [3683574](#)

**备注:**

1. mES 完全培养液配方 (600 ml):

|                                 |                            |
|---------------------------------|----------------------------|
| DMEM (Invitrogen 12430054)      | 497 ml                     |
| ES 级 FBS (Gibco)                | 90 ml                      |
| Glutamax (Invitrogen 35050061)  | 6 ml                       |
| NEAA (Invitrogen 11140050)      | 6 ml                       |
| LIF (Millipore ESG1107)         | 60 $\mu$ l (终浓度为 1000U/ml) |
| $\beta$ -Mer (Invitrogen 21985) | 1.5 ml                     |

2. 其他相关产品信息 : 培养 ES-E14TG2a 所使用的饲养层细胞为昆明白 MEF。

本细胞库可提供:

SCSP-101      P0,可以增殖

SCSP-101R      已经经过射线处理, 不再增殖, 可直接作为 feeder 使用。

详情访问中科院干细胞库/干细胞技术平台 <http://www.cellbank.com.cn/index.asp>;

电话: 021-54921358

感谢您选择我们的服务!

中国科学院干细胞库/干细胞技术平台

## 附：小鼠胚胎干细胞（mES 细胞）、小鼠 iPS 细胞培养 Protocol

### 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 15 min 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 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；小鼠 iPS 使用 ICR-r 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 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  $1 \times 10^6$  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。24 h 以后可以传入小鼠胚胎干细胞或小鼠 iPS 细胞。
5. 复苏或传代小鼠胚胎干细胞或小鼠 iPS 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、小鼠 iPS 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、小鼠 iPS 细胞完全培养液待用。

### 复苏：

1. 将小鼠胚胎干细胞、小鼠 iPS 细胞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。
2. 将冻存管内细胞悬液转移至含 3–4 ml 小鼠胚胎干细胞、小鼠 iPS 细胞完全培养液的 15 ml 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、小鼠 iPS 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、小鼠 iPS 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（小鼠 iPS 细胞 OSKM-1、OSK-1 生长相对较慢，可在复苏后 4–5 天再传代，具体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℃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、小鼠 iPS 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、小鼠 iPS 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、小鼠 iPS 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。
  10. 放入 37℃培养箱内培养。
  11. 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  $\mu$ l 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℃过夜，转入液氮。

#### 冻存液配方：

小鼠胚胎干细胞完全培养液或小鼠 iPS 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℃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。