

人胚胎干细胞 H1 (Feeder-free) 说明书

目录号: SCSP-306

细胞名称: H1 (Feeder-free)

细胞描述: 人胚胎干细胞, 曾用名 WA01

物种: 人, 男性

组织: 内细胞团

细胞来源: 2006 年引进

生物安全等级: BSL-1

完全培养液配方: 采用 mTeSR1 (STEMCELL Technologies) 培养

冻存日期/冻存代数: 详见 冻存管/培养瓶 标识

参考传代周期: 5 天左右

参考传代比例: 1:2-1:4

参考换液频率: 每天

冻存液配方: 无血清无动物成分细胞冻存液 (STEMCELL Technologies, 货号 07930)

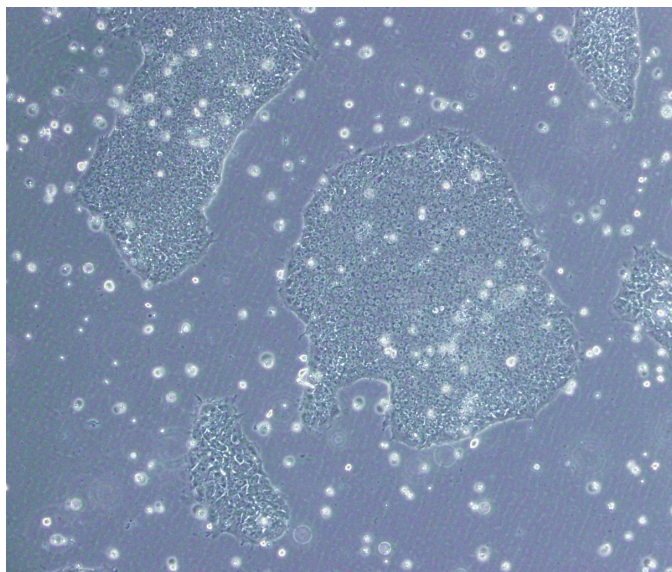
细胞形态: 贴壁, 呈克隆状

支原体检测结果: 阴性

STR 鉴定结果:

D5S818: 9,11;
D13S317: 8,11;
D7S820: 8,12;
D16S539: 9,13;
vWA: 15,17;
TH01: 9.3,9.3;
Amelogenin: X,Y;
TPOX: 8,11;
CSF1PO: 12,13.

H1 FeederFree 细胞照片:



参考文献:

Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts, James A. Thomson, et al. Science 282, 1145(1998)

备注:

1. 我库冻存时，体积为 500 μ 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。

中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库/干细胞库



用 mTeSR1 培养人胚胎干细胞 (hESC) 和人 iPS 细胞 (hiPS)

1. 试剂和材料

mTeSRTM1 培养基试剂盒 (产品号#85850) 包括:

成分	规格	存放条件
mTeSR TM 1 基础培养基 (#85851)	400 mL	2-8 °C
mTeSR TM 1 5X 添加物 (#85852)	100 mL	-20 °C

所需的其他试剂和材料

产品	品牌/货号
Cryostor CS10	STEM CELL/07930
温和分离液	STEM CELL/07174
DPBS (不含钙镁离子)	GIBCO/14190
DMEM/F12	GIBCO/11330
Y27632	STEM CELL/ 72302
BD Matrigel hESC-qualified Matrix	CORNING/354277 (BD 该系列产品已被 CORNING 收购)
细胞刮	如, CORNING/3010
另需细胞培养板/瓶/皿, 15ml 离心管和移液管等细胞培养耗材。	

2. 试剂的制备

2.1 mTeSR1 的制备

2.1.1 在室温 (15 - 25° C) 下或冰箱内 (2 - 8° C) 过夜解冻 mTeSRTM1 5X 添加物 (成分编号 #05852)。如需要, 可在无菌条件下将 5X 添加物分装为适量的工作等份, 并在 -20° C 下冻存。冷冻的分量须在 3 个月内用完。解冻后的分量应在 1 天内制备成完全的 mTeSRTM1 培养基。请勿在解冻后再次冷冻。

2.1.2 在无菌条件下将 100 mL 的 5X 添加物全部解冻后加入到 400 mL 的基础培养基中, 形成总共 500 mL 的容量。充分混匀。完全的 mTeSRTM1 培养基在 (2 - 8° C) 下储存时可维持稳定状态最多 2 周, 或在 -20° C 下冷冻时可维持稳定状态最多 6 个月。在室温 (15 - 25° C) 下或冰箱内 (2 - 8° C) 过夜解冻冷冻的培养基, 不要长时间放在 37° C 水浴内加热培养液。

如果在无菌条件下制备, 完全的 mTeSRTM1 培养基可直接使用, 但如需要, 也可使用 0.2 μm 的低蛋白结合过滤器过滤培养基。

2.2 Matrigel 工作液配制和包被

应分装和冷冻保存 BD MatrigelTM hESC-qualified matrix (BD 产品号 #354277)。有关分装的完整说明和建议, 请查阅与 BD MatrigelTM 同时提供的产品说明书。分装后的小包装可在 -70° C 下最多储存 6 个月。

将一份 BD MatrigelTM 加入到 25 mL 的 DMEM/F12 中, 这足以包被四个 6 孔培养板 (1 mL / 孔) 或三个 100 mm 培养皿 (8 mL / 培养皿)。

- (1) 将 25 mL 的稀释培养基 (DMEM/F12; 产品号#11330) 分装入离心管放在冰上。
- (2) 将一份分装后的 BD Matrigel™自-70° C 取出 , 在冰上解冻, 直到成为液体, 然后将解冻后的 BD Matrigel™ 加入到冷稀释培养基 (在 50 mL 的试管中) 中, 充分混匀。如需要, 可用冷培养基冲洗 EP 管。
- (3) 立即用稀释后的 BD Matrigel™ 溶液包被组织培养板。对于 6 孔培养板, 每个孔使用 1 mL 稀释后的 BD Matrigel™; 对于 100 mm 培养板, 每个培养板使用 8 mL 稀释后的 BD Matrigel™。旋动培养板, 以使 BD Matrigel™ 溶液均匀地分布在表面上。

要包被其他尺寸的组织培养皿, 则按照需要包被的培养皿的表面积决定稀释后的 BD Matrigel™用量。

- (4) 使用前, 包被的培养板应放在培养箱 (37° C) 下至少 1 个小时。请勿让培养板脱水。在培养板可供使用之前, 请勿移除 BD Matrigel™ 溶液。

如果不立即使用, 培养板必须密封, 以防止脱水 (如利用 Parafilm®)。包被后的培养板可在 2 - 8° C 下最多储存 7 天。

如果 BD Matrigel™溶液并未完全覆盖表面, 则无法实现最佳的 hPSC 培养; 因此, 不建议使用含有溶液已蒸发区域的培养板。

- (5) 轻轻地将培养板向一个角落倾斜, 使过剩的 BD Matrigel™ 溶液汇聚在那个角落。用一次性移液管或通过抽取移除溶液。确保移液枪头不刮到已包被的表面。立即加入 mTeSR™1 培养基和细胞。

如果已将培养板在 2 - 8° C 下储存, 则在移除 BD Matrigel™溶液之前, 将培养板在培养箱 (37° C) 下放置 30 分钟。

2.3 配制 Y27632 溶液

Y27632 粉末溶解在 DPBS 中, 配成浓度为 10mM 的储存液, 0.22um 滤膜过滤除菌。分装后冷冻于-20° C, 6 个月内使用。

Y27632 提高复苏和传代后的克隆形成率, 所以只在复苏步骤和传代步骤添加, 换液时不添加。

3. 解冻复苏 hES /hiPS

在开始操作程序之前, 将所有试管、加热后的培养基和培养板准备好, 以确保尽快完成解冻程序。

- (1) 快速在 37° C 水浴槽中解冻 hPSC, 方法是轻柔持续地摇动冷冻管, 直到只剩一个小冷冻团。从水浴槽中取出冷冻管, 用 70% 乙醇擦拭, 以进行消毒。
- (2) 使用一个 1 mL 的移液管将冷冻管中的内容物转移至一个 15 mL 锥形试管中, 过程必须轻柔防止吹散细胞团。
- (3) 将 5 - 7 mL 温暖的 mTeSR™1 逐滴加入试管中, 在加入培养基的同时轻柔混匀。
- (4) 在室温 (15 - 25° C) 下, 以 300 x g 离心细胞 5 分钟。
- (5) 吸出培养基, 使细胞团保持完整。使用一个 1 mL 的移液管, 轻轻地将细

胞重新悬浮在 1 - 2 mL 的 mTeSR™1 中，确保维持细胞的团块状态。根据最终培养细胞的液体体积，加入 ROCK inhibitor Y27632，终浓度为 10 μ M

(6) 轻轻地将培养板/皿向一个角落倾斜，使过剩的 BD Matrigel™ 溶液汇聚在那个角落，从而从已包被的组织培养板中移除 BD Matrigel™。使用一次性移液管或通过抽取移除溶液。确保移液枪头不刮到已包被的表面。

如果已将培养板在 2 - 8° C 下储存，则在移除 BD Matrigel™ 溶液之前，将培养板在培养箱 (37° C) 下放置 30 分钟。

(7) 将含有细胞聚集体的培养基转移至 BD Matrigel™ 包被的培养器皿上。一般一支冻存管细胞复苏到一个 T25 培养瓶或 6 孔板中的 2 个孔。

(8) 将培养板放在 37° C 培养箱中，然后快速地左右、前后移动培养板，以均匀地将细胞团分布在各个孔内。在 37° C、5% CO₂ 和 95% 湿度的条件下培养细胞。

(9) 每天更换培养基(不需要再添加 Y27632)。在解冻后大约 5 - 7 天内检查可进行传代的未分化集落(有密集的中心)。

如果在解冻后仅观察到很少的未分化集落，则可能需要只选择这些集落进行传代，并将它们重新放在新的 BD Matrigel™ 包被的培养板大小相同的孔中。

(10) 每天换液。

4. 用 mTeSR1 对 hES/hiPS 进行传代

在 mTeSR™1 中生长的细胞当集落变得较大、中心变得密集和明亮(对比其边缘)而相邻的集落开始融合时，这时可进行传代。根据接种的细胞团的大小和密度，传代周期为 5 天左右。如果太早对集落进行传代或传代太过频繁，则细胞可能吸附不好、产量将会减少且细胞可能分化。如果太晚对集落进行传代，培养物将开始显示分化迹象(特点是细胞类型出现不同的形态)。

(1) 分装足够的 mTeSR™1 以传代细胞。将分装的 mTeSR™1、温和分离液(产品号#07174)和 DMEM/F-12 加热至室温(25° C 左右)。

(2) 使用显微镜观察确定分化的区域。用毡制粗头笔或透镜标志器在培养板底部标记这些区域。如果培养物品质优异，分化的区域不会超过培养孔的 20%。

(3) 用移液枪头刮除或抽取，去除分化区域。

(4) 从 hPSC 培养物中吸出培养基，然后用 DPBS(不含钙镁离子)冲洗。

(5) 向每个培养瓶内加入温和分离液(每个 T25 加 3ml)，覆盖底面，在室温下静置 1 分钟。

(6) 吸掉温和分离液，然后用 6ml DMEM/F-12 轻轻的洗涤培养皿一次。

(7) 向培养瓶内加适量 mTeSR™1，并用细胞刮(如 Corning 产品号#3010)将细胞集落刮离培养瓶底。

(8) 将分离的细胞聚集体转移至一个 15 mL 锥形试管中，并加入适量 mTeSR™1 冲洗培养瓶，以收集残留的细胞聚集体。将冲洗液一并收集到 15 mL 离心管内。

轻轻吹打细胞聚集体 2-3 次，调整培养基的体积，以实现适当的分配。根据最

终培养细胞的液体体积，加入 ROCK inhibitor Y27632，终浓度为 10 μ M。

(9) 将细胞聚集体与 mTeSR™1 接种至新的 BD Matrigel™ 包被的培养板上。一般传代周期为 5 天左右，传代比例为 1: 3-1: 6。如果集落过于密集或过于稀疏，则下一次传代时相应地调整传代比例。请注意，这些指导基于中科院干细胞库 hESC H1 和 H9 以及 hiPS DYR0100 和 DYP0530 细胞系的生长特征，在其他不同的细胞系和实验室之间可能会存在差异。

(10) 快速前后和左右多次移动培养板，以使细胞分散在各个孔的表面。将培养板放在 37° C 培养箱中。确保新接种的集落均匀地分布在 BD Matrigel™包被的培养板的整个表面。细胞团分布不均匀有可能导致 细胞分化。

(11) 每天换液。

5. 冷冻 hESC 或 hiPS 细胞

(1) 用显微镜观察需要冻存的培养物，确定已分化的区域。用毡制粗头笔或透视镜标志器在培养板底部标记这些区域。

如果培养物品质优异，分化的区域不会超过培养孔的 20%。

(2) 用移液枪头刮除或抽取，去除分化区域。

(3) 从培养孔中吸出残留的培养基，然后用 DPBS（不含钙镁离子）冲洗。

(4) 向每个培养瓶内加入温和分离液(每个 T25 加 3ml)，覆盖底面，在室温下静置 1 分钟。

(5) 吸掉温和分离液，然后用 6ml DMEM/F-12 轻轻的洗涤培养皿一次。

(6) 向培养瓶内每个孔内加适量 mTeSR™1，并用细胞刮（如 Corning 产品号 #3010）将细胞集落刮离培养瓶底。

(7) 将分离的细胞聚集体转移至一个 15 mL 锥形试管中，并加入适量 mTeSR™1 冲洗培养瓶，以收集残留的细胞聚集体。将冲洗液一并收集到 15 mL 离心管内。小心地尽量将细胞团保持到最大。

(8) 在室温(15- 25° C) 下，以 300 x g 离心装有细胞聚集体的 15 mL 离心管 5 分钟。离心细胞时，准备和标记冻存管。

(9) 轻轻地吸出上清液，小心保持细胞团完整。

(10) 使用预冷的(2 -8° C) CryoStor™CS10 轻轻地重新悬浮细胞团，然后将细胞悬液转移至冷冻管中。

(11) 将冷冻管置于程序降温盒内（大约-1° C /min）-80° C 冷冻细胞过夜，然后转移至液氮长期储存。