

# 细胞产品手册

## OriCell® C57BL/6 小鼠胚胎干细胞

产品货号：MUBES-01001



## 产品介绍

胚胎干细胞（ESC）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。

C57BL/6 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。C57BL/6 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。

OriCell®C57BL/6 小鼠胚胎干细胞来源于 C57BL/6 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  $\gamma$ -射线处理的 MEF（小鼠胚胎成纤维细胞）上培养。

**注意：**本产品仅提供给进一步科研使用，不可用于临床治疗等其他用途。

**使用本细胞发表的文献需注明：** (OriCell, Cat.No. MUBES-01001 ) from Cyagen.

## 产品信息

产品名称	OriCell®C57BL/6 小鼠胚胎干细胞
货号	MUBES-01001
规格	1×10 <sup>6</sup> 个/管 或 1×10 <sup>6</sup> 个/瓶
冻存代次	P20
保存条件	液氮 (-196°C)

OriCell®C57BL/6 小鼠胚胎干细胞在倒置相差显微镜下的形态



## 质量控制

- 通过细菌、真菌、支原体、内毒素检测。
- 通过细胞复苏活力检测，复苏存活率>50%。
- 通过细胞周期检测，倍增周期<72 h。
- 通过流式检测，表达 Oct4、SSEA-1 和 Nanog ( $\geq 70\%$ )，不表达 SSEA-3 和 SSEA-4 ( $\leq 5\%$ )。

详情见《产品检测报告》。

## 处理原则

1. 严格的无菌环境。务必保证实验室整体、超净台和培养箱的清洁。
2. 规范的操作方式。请按照产品说明书描述的方式操作，严格控制变量，做好对照实验。
3. 需要合适的、质量可靠的实验耗材和试剂。本产品需使用适合贴壁细胞生长的培养容器，且不建议重复使用。使用的试剂必须经验证可靠，适宜细胞生长且批间差异小。
4. 通常 OriCell® C57BL/6 小鼠胚胎干细胞接种密度为 $(1\sim 2) \times 10^4$  个活细胞/cm<sup>2</sup>。该细胞的生长与供体自身特性和后续培养体系的关系极大。我们建议根据各批次、各代次实际生长情况按比例传代培养。

**注意：**本产品冻存液中含有 DMSO，其具有潜在风险，请谨慎处理。

## 产品选用建议

1. 如果使用饲养层细胞进行培养，建议使用 OriCell® ICR 小鼠胚胎成纤维细胞（已灭活）（货号：MUIEF-01002）。
2. 如果使用无血清有饲养层的培养条件，建议使用 OriCell® 小鼠胚胎干细胞无血清培养基（货号：MUXES-90062），体系更换流程请参考对应说明书。
3. 如果使用无血清无饲养层的培养条件，建议使用 OriCell® 小鼠胚胎干细胞无血清培养基（货号：MUXES-90061），体系更换流程请参考对应说明书。

## 培养瓶/皿包被 0.1%明胶

### 所需材料

- OriCell® 0.1%明胶溶液 (货号: GLT-11301)

### 操作步骤

**注意:** 为了使 $\gamma$ 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。

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: MU1EF-01002)
- OriCell® 小鼠胚胎成纤维细胞完全培养基 (货号: MUXEF-90011, 以下简称完全培养基)

### 操作步骤

**注意:** 收到的细胞如 24 h 内复苏, 可存放于 -80°C 冰箱; 超过 24 h 请存放于液氮中, 复苏前 10 min 取出, 放于 -80°C, 让管中液氮挥发。

1. 水浴锅 37°C 预热, 完全培养基温浴到 37°C。
2. 在 15 mL 离心管中加入 5 mL 以上完全培养基备用。
3. 从 -80°C 冰箱中取出细胞, 放入 37°C 水浴锅中, 快速晃动, 使冻存液迅速融化。

**注意:** 1) 融化过程必须晃动冻存管, 保证冻存液融化迅速、均匀;

2) 晃动时应避免水没过管盖造成污染;

3) 管内冻存液融化至只剩一个约 2 mm 直径的冰晶时, 即停止水浴。继续晃动冻存管, 至冰晶融化。

4. 用 75% 医用酒精擦拭冻存管外表面。
5. 在超净台中打开冻存管, 用巴氏吸管或移液枪吸取细胞冻存悬液, 转移至先前准备的离心管中。
6. 用 1 mL 完全培养基洗涤冻存管 1 次, 收集残留细胞, 减少损失。
7. 细胞悬液以 250×g 离心 4 min。

**注意:** 请以公式  $RCF=1.118 \times 10^{-5} \times r \times RPM^2$  计算相应转速 [RCF: 离心力, r: 转子半径(cm), RPM: 转速]。

8. 离心后去除上清。加入 1 mL 完全培养基, 轻柔吹打细胞沉淀, 充分吹散、混匀。
9. 将细胞按  $2.5 \times 10^4$  个活细胞/cm<sup>2</sup> 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。
10. 摇匀细胞, 放入 37°C、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中。

**注意:** 接种 2 h 内不可移动、观察细胞。这会严重影响细胞贴壁, 造成状态不佳、细胞聚团、贴壁不均匀等情况。

11. 复苏次日, 观察细胞状态, 并更换新鲜的完全培养基。

**注意:** 1) 若发现较多漂浮细胞或其他异常情况, 应及时排查原因, 并与我们联系;

2) 胚胎干细胞复苏前一天复苏 MEF 细胞;

3) 如果 MEF 细胞换液当天将复苏小鼠胚胎干细胞, 可直接更换成小鼠胚胎干细胞培养基;

4) 复苏后的 MEF 应在 5 天内使用。

## 胚胎干细胞的复苏和培养

### 所需材料

- OriCell® C57BL/6 小鼠胚胎干细胞
- OriCell® C57BL/6 小鼠胚胎干细胞完全培养基（货号：MUXES-90011，以下简称完全培养基）

### 操作步骤

**注意：**收到的细胞如 24 h 内复苏，可存放于-80°C冰箱；超过 24 h 请存放于液氮中，复苏前 10 min 取出，放于-80°C，让管中液氮挥发。

1. 水浴锅 37°C预热，完全培养基温浴到 37°C。
2. 在 15 mL 离心管中加入 5 mL 以上完全培养基备用。
3. 从-80°C冰箱中取出细胞，放入 37°C水浴锅中，快速晃动，使冻存液迅速融化。

**注意：**1) 融化过程必须晃动冻存管，保证冻存液融化迅速、均匀；

2) 晃动时应避免水没过管盖造成污染；

3) 管内冻存液融化至只剩一个约 2 mm 直径的冰晶时，即停止水浴。继续晃动冻存管，至冰晶融化。

4. 用 75%医用酒精擦拭冻存管外表面。
5. 在超净台中打开冻存管，用巴氏吸管或移液枪吸取细胞冻存悬液，转移至先前准备的离心管中。
6. 用 1 mL 完全培养基洗涤冻存管 1 次，收集残留细胞，减少损失。
7. 细胞悬液以 250×g 离心 4 min。

**注意：**请以公式  $RCF=1.118 \times 10^{-5} \times r \times RPM^2$  计算相应转速 [RCF:离心力，r:转子半径(cm)，RPM:转速]。

8. 离心后去除上清。加入 2 mL 完全培养基，轻柔吹打细胞沉淀，充分吹散、混匀。
9. 将小鼠胚胎干细胞按  $(1.0 \sim 2.0) \times 10^4$  个活细胞/cm<sup>2</sup> 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。
10. 放入 37°C、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中。

**注意：**接种 2 h 内不可移动、观察细胞。这会严重影响细胞贴壁，造成细胞聚团、贴壁不均匀等情况。

11. 复苏次日，观察细胞状态，并更换新鲜的完全培养基。

**注意：**若发现较多漂浮细胞或其他异常情况，应及时排查原因，并与我们联系。

12. 之后，每 24 h 更换一次完全培养基，直到细胞团生长至合适大小，即需传代。

## 胚胎干细胞的传代

### 所需材料

- OriCell® 0.25%Trypsin-0.04%EDTA (货号: TEDTA-10001, 以下简称胰酶)
- OriCell® Phosphate-Buffered Saline (1×PBS) (货号: PBS-10001, 以下简称 PBS)
- OriCell® C57BL/6 小鼠胚胎干细胞完全培养基 (货号: MUXES-90011)
- OriCell®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

### 操作步骤

**注意:** 1) 通常情况下, 细胞培养 48 h 即可进行下一次传代;

2) 当小鼠胚胎干细胞出现以下情况时就必须传代:

——小鼠胚胎干细胞的克隆较大, 出现分化或即将分化;

——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. 将完全培养基、PBS、胰酶预热至 37°C。
3. 吸去小鼠胚胎干细胞培养容器中的培养基。
4. 用 PBS (T25 培养瓶加入约 3 mL, T75 培养瓶加入约 6 mL) 洗涤细胞 2 次, 注意动作轻柔, 清洗全面。吸去 PBS。
5. 加入胰酶 (T25 培养瓶加入约 1.5 mL, T75 培养瓶加入约 3 mL), 迅速铺匀, 保证充分接触细胞表面。
6. 显微镜下观察消化情况, 约 70%~80%细胞收缩变圆后, 轻拍培养容器外壁, 使细胞脱离培养表面。
7. 立即加入小鼠胚胎成纤维细胞完全培养基 (T25 培养瓶加入约 3 mL, T75 培养瓶加入约 6 mL), 随即轻摇培养容器, 使培养基和胰酶迅速混匀, 终止消化。
8. 使用吸管或移液管吸取细胞悬液, 吹打培养容器底面数次, 尽可能将细胞都吹打下来。  
**注意:** 吹打动作不可剧烈, 避免产生大量气泡, 否则可能损伤和损失细胞。
9. 将细胞悬液转移至离心管中。用 PBS (T25 培养瓶加入约 3 mL, T75 培养瓶加入约 6 mL) 洗涤容器 1 次, 收集残留细胞。
10. 收集的所有细胞悬液以 250×g 离心 4 min。
11. 离心期间, 给提前准备的 MEF 换用小鼠胚胎干细胞完全培养基 (已预热至 37°C)。
12. 离心后去除上清。加入 2 mL 小鼠胚胎干细胞完全培养基, 轻柔吹打细胞沉淀, 充分吹散、混匀。

13. 将小鼠胚胎干细胞按  $(1.0\sim 2.0) \times 10^4$  个活细胞/cm<sup>2</sup> 的密度，接种到已换液的铺有 MEF 的培养器皿中。  
**注意：**培养 C57BL/6 小鼠胚胎干细胞对于细胞密度有较高的要求，我们建议有条件且计数效率较高的情况下，进行手工计数，以期获得精准的细胞浓度指导接种；在没有精确计数条件的情况下，按照适宜比例传代是更好的方法。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。请根据细胞实际生长情况调整传代比例。
14. 摇匀细胞，放入 37°C、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中。
15. 传代次日，观察细胞状态。若发现较多漂浮细胞，应予以换液。
16. 待细胞团生长至合适大小，即需传代或冻存。

## 胚胎干细胞的分化

### 所需材料

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

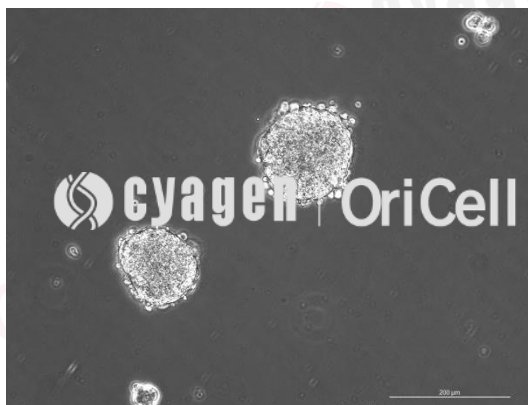
OriCell® C57BL/6 小鼠胚胎干细胞在体外培养条件下能形成拟胚体，体内实验能形成畸胎瘤。拟胚体 (EB) 的形成是胚胎干细胞分化的主要步骤。在缺少小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 饲养层的情况下，胚胎干细胞经 EB 形成培养基的刺激会自发分化形成三维聚集体，这种结构有利于细胞的相互作用，如细胞间的接触和间隙连接的建立。

### 胚胎干细胞拟胚体的诱导操作步骤

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”。
2. 准备一个 T75 培养瓶的胚胎干细胞 (约  $1 \times 10^7$  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， $250 \times g$ ，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  $5 \times 10^6$  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  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 、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，可重复上述 4~8 步骤一次，再次贴壁去除 MEF。
9. 计数后调整细胞密度为  $5.5 \times 10^4$  个活细胞/mL，接种于 60 mm 细胞培养皿中，每个皿加入 5 mL 细胞悬液。  
**注意：此时需要使用未经 Tissue culture treated (TC 处理)，适合悬浮细胞培养的培养容器。**
10. 放置于  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 、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 ( $140 \times g$ ，离心 1 min) 换液。
12. 换液后接种于新的培养皿 (未 TC 处理) 中，放置于  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 、饱和湿度的  $\text{CO}_2$  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， $140 \times g$ ，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%CO<sub>2</sub>，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。

经诱导后 OriCell® C57BL/6 胚胎干细胞形成的拟胚体 (EB) 图片



## 胚胎干细胞的冻存

### 所需材料

- OriCell®通用无蛋白非程序冻存液（货号：NCPF-10001）

OriCell®通用无蛋白非程序冻存液（货号：NCPF-10001）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。

### 操作步骤

**注意：**冻存前 24 h 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，即可准备冻存。
2. 细胞消化请参考 OriCell® C57BL/6 小鼠胚胎干细胞的传代操作步骤 2~10。
3. 离心后去除上清，用适量冻存液均匀重悬细胞，对细胞进行计数。
4. 将细胞按比例或数量分装至冻存管中。

**注意：**在没有成熟的计数条件下，我们建议将细胞按比例分装冻存即可，长时间在非培养条件下放置会严重影响细胞的状态。在计数时，我们建议将细胞放置于 4°C 冰箱内，以减弱细胞代谢，较好地保持细胞状态。

5. 选用 OriCell®通用无蛋白非程序冻存液，请将冻存管直接分散放入-80°C 冰箱中。

**注意：**细胞冻存期间，特别是开始冻存的 4h 内，不可打开冰箱门，这将严重影响细胞冷冻存活率。

6. 8 h 后即可将细胞转移入液氮长期保存。

**注意：**细胞不可长期保存在-80°C 冰箱中。我们建议在-80°C 冰箱中的保存时间不要超过 48 h。

## 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.

赛业（苏州）生物科技有限公司保留OriCell®细胞培养产品技术文件的所有权利。

没有赛业（苏州）生物科技有限公司的书面许可，本文件的任何部分，  
不得改编或转载用作其他商业用途。