

细胞产品手册

OriCell[®]拟胚体 (EB) 形成试剂盒

产品货号: MUXES-90051



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。

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，比如细胞间的接触和间隙连接的建立。

由 OriCell®研发团队精心研制的 OriCell®拟胚体（EB）形成试剂盒套装，包含拟胚体形成基础培养基、OriCell®优级胎牛血清及细胞生长所需的其他添加物。

OriCell®拟胚体（EB）形成试剂盒可增强小鼠胚胎干细胞（ESC）分化形成 EB 的能力。本产品可采用悬滴形式或者在非吸附 Petri 培养皿中悬浮培养形成 EB。

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。

试剂盒成分

试剂盒成分	货号	体积
OriCell® Basal Medium For Cell Culture OriCell®细胞基础培养基	BHDM-03011	447 mL
OriCell® Fetal Bovine Serum（Superior-Quality） OriCell®优级胎牛血清	FBSSR-01021	50 mL
OriCell® Supplements For Mouse Embryoid Body Formation OriCell®小鼠 EB 诱导形成添加物	MUXES-04051	3 mL

质量控制

- 通过细菌、真菌、支原体、内毒素检测。
- 通过渗透压、pH 检测。
- 通过产品性能检测。

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和操作区域的清洁。
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. 各成分需按照保存条件妥善存放，并尽快使用。
4. 若短期内无法用完整套培养基，应按套装内各成分体积比例分批配制并分装保存。

产品稳定性及保存条件

1. 套装内所有成分均需避光保存。
2. 套装内基础培养基需置于 4℃冰箱保存，保质期为 1 年；其他成分需置于-20℃保存，保质期为 2 年。
3. 配制后的完全培养基，需放置 4℃保存，保质期为 1 个月；若能保证培养条件稳定，容器密封性能良好，避免冷热交替，则保质期可适当延长，但不得超过 45 天。
4. 所有产品请于保质期内使用；过期的成分可能严重影响培养效果。

完全培养基的配制

所需材料

- OriCell® 拟胚体 (EB) 形成培养基
- 清洁、无菌、质量稳定的一次性耗材 (移液管、移液器吸头、离心管等)
- 洁净的封口膜
- 铝箔纸等避光材料

操作步骤

1. 配制前至少 6 h, 将套装中的 OriCell® 优级胎牛血清放置于 4℃ 冰箱内完全融化。

注意：融化后的血清中可能出现絮状物，其主要成分为析出的血纤蛋白，这不会影响产品使用效果。

若不是对细胞培养体系的纯净度要求极高，我们不建议过滤或离心去除絮状物。

2. 配制前至少 30 min, 将套装中 OriCell® 小鼠 EB 诱导形成添加物放置于室温内，直至完全融化。
3. 用 75% 医用酒精仔细擦拭所有成分外包装。在超净台内打开包装。
4. 将血清、OriCell® 小鼠 EB 诱导形成添加物全部加入 OriCell® 细胞基础培养基中。
5. 拧紧基础培养基瓶盖，轻柔并充分摇匀。

注意：若短期内无法用完全部培养基，我们建议分批配制；请按照套装内各成分比例，配制所需量；

但剩余的成分必须严格按照各自的保存条件妥善保存，并且不可多次冻融。

6. 用封口膜密封瓶口，用铝箔纸包裹瓶身，并标注名称、配制日期等信息。

注意：OriCell® 拟胚体 (EB) 形成试剂盒套装内的所有成分都严格控制无菌，一般情况下我们不建议再次除菌。若配制过程有污染风险，可将完全培养基过滤除菌。

拟胚体的形成

所需材料

- OriCell® 拟胚体 (EB) 形成试剂盒

操作步骤

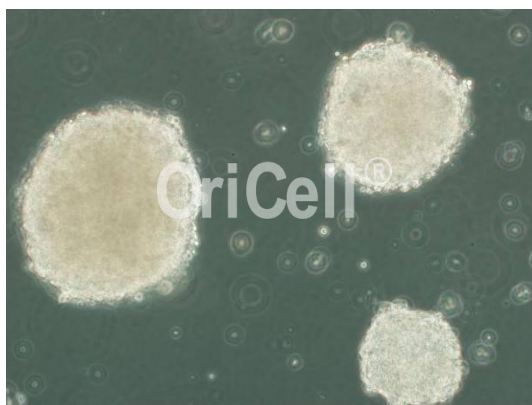
1. 准备明胶包被的 100 mm 细胞培养皿。
2. 准备一个 T75 培养瓶的胚胎干细胞 (约 1×10^7 cells)。当细胞生长至对数期时可进行拟胚体制备。
3. 消化细胞。注意：需将细胞消化为单个，确保其均一性。加入拟胚体形成培养基终止消化。
4. 收集细胞，将细胞悬液转入 15 mL 离心管， $250 \times g$ ，离心 5 min。
5. 小心弃去上清。
6. 加入拟胚体形成培养基进行重悬，接种约 5×10^6 个细胞至明胶包被的培养皿中，加入约 8 mL 拟胚体形成培养基。
7. 放入 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度的 CO_2 培养箱中贴壁培养 40 min 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 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 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°C 、5% CO_2 、饱和湿度的 CO_2 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°C 、5% CO_2 、饱和湿度的 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_2 、饱和湿度的 CO_2 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。

拟胚体 (EB) 图片



赛业（广州）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（广州）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。