

## MEF P0 细胞培养 Protocol

### 复苏:

1. 将 MEF P0 细胞冻存管从液氮中取出，置于 37°C 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 MEF 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 MEF 完全培养液 2 ml，吹打悬浮。
4. 轻轻吹打，制成单细胞悬液，尽量避免气泡。
5. 按照 MEF 细胞说明书上建议的复苏培养体系转移至 1 个 T75 培养瓶中培养，加入培养液 14 ml。
6. 放入 37°C 培养箱内培养。
7. 复苏第二天观察，如死细胞较多，更换新鲜的 MEF 完全培养液，可以使细胞生长的更好。

### 传代:

1. 待细胞长到 90%–100%满时进行传代，一般 3-4 天，具体视细胞生长情况而定。
2. 吸除废液。
3. 用 PBS（不含钙镁离子）轻轻冲洗一遍。
4. 加入 2.5 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°C 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 2.5 ml MEF 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 MEF 完全培养液，多次轻轻吹打细胞，制成单细胞悬液。
9. 按照 1:2–1:3 的比例进行传代。
10. 放入 37°C 培养箱内培养。

### 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. 按每支冻存管内加入 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°C 过夜，转入液氮。

### 冻存液配方:

MEF 完全培养液 80%，FBS 10%，DMSO 10%

**丝裂霉素 C 处理：**

1. 一般地，P0 代 MEF 细胞传至 P3 代时，可以进行丝裂霉素 C (Sigma, M0503) 处理。处理过后的 MEF 细胞不再增殖，可直接作为 feeder 使用。
2. 传至 P3 代的 MEF 细胞长至 80%以上时，吸出旧的 MEF 完全培养液，加入含丝裂霉素 C (终浓度 10  $\mu\text{g/ml}$ ) 的新鲜 MEF 完全培养液 (以 T75 培养瓶为例，加入培养液的体积为 10 ml)。37°C 培养箱温育处理 3 小时。
3. 吸出培养液，用 PBS 快速洗 4 遍以去除残余的丝裂霉素 C。
4. 消化细胞、细胞计数并冻存。一般地，一个 T25 培养瓶铺  $1 \times 10^6$  细胞。

**辐照处理：**

也可通过辐照处理 P3 代 MEF 细胞，一般地，辐照条件为： $\gamma$  射线，50gray，辐照时间 59 分钟。

中国科学院干细胞库/干细胞技术平台