

## MEF 细胞铺制:

### 一. 作为【小鼠胚胎干细胞、小鼠 iPS 细胞】用饲养层时的使用方法:

1. 在 T25 培养瓶中加入 0.2% 明胶，摇匀后覆盖底面即可，于 37°C 细胞培养箱中至少放置 15 min 以上。
2. 吸除 0.2% 明胶，加入事先水浴加热至 37°C 的 MEF 完全培养液。一般地，一个 T25 培养瓶中约加入 5 ml MEF 完全培养液。
3. 按实验需要：mES 使用 KM-r P3 MEF；小鼠 iPS 使用 ICR-r P3 MEF 或都使用 CF-1-r P3 MEF，复苏 MEF 细胞若干支。将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。
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，按照 MEF 细胞说明书上建议的复苏培养体系，另加入新鲜的 MEF 完全培养液 2 ml，重悬后平均加入到 T25 培养瓶中，轻轻摇匀后置于 37°C 细胞培养箱培养。24 h 以后可以传入小鼠胚胎干细胞或小鼠 iPS 细胞。

### 二. 作为【人胚胎干细胞】用饲养层时的使用方法:

1. 在 T25 培养瓶中加入 5% Matrigel，摇匀后覆盖底面即可，于 37°C 细胞培养箱至少放置 30 min 以上。
2. 吸除 Matrigel，加入事先水浴加热至 37°C 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. 按实验需要复苏 CF-1-r P3 MEF 若干支。将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。
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，按照 MEF 细胞说明书上建议的复苏培养体系，另加入新鲜的 MEF 完全培养液 2 ml，重悬后平均加入到 T25 培养瓶中，轻轻摇匀后置于 37°C 细胞培养箱培养。24 h 以后可以传入人胚胎干细胞。