

MEF 细胞铺制:

1. 在 T25 培养瓶中加入 5% Matrigel, 摇匀后覆盖底面即可, 于 37°C 细胞培养箱中至少放置 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 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, 另加入新鲜的 MEF 完全培养液 1 ml, 重悬后按照一个 T25 培养瓶铺 1¹⁰6 的 MEF 细胞, 平均加入到 T25 培养瓶, 轻轻摇匀后置于 37°C 细胞培养箱。48h 以后可以传入人胚胎干细胞。
5. 复苏或传代 hES 细胞前, 将 T25 培养瓶中的 MEF 完全培养液吸除, 加入 2 ml hES 完全培养液轻轻冲洗一遍后吸除, 加入新鲜的 hES 完全培养液待用。

复苏:

1. 将 hES 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 hES 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 hES 完全培养液 2-3 ml, 吹打一次使细胞悬浮。
4. 转移至 1 个已经铺好 MEF 细胞的 T25 培养瓶中培养。
5. 复苏第二天不换液, 第三天起每天更换 hES 细胞完全培养液。

注意: 复苏后 48 小时换液, 期间最好不要挪动细胞。hES 复苏后大约 4-5 天才开始有克隆出现。

传代:

1. 一般在复苏后第 7-10 天传代, 正常传代为 7 天一次。
2. 吸除废液。
3. 用 PBS (不含钙镁离子) 轻轻冲洗一遍。
4. 加入 4-5 ml 的 1 mg / ml 的 Collagenase-type IV 至培养瓶, 轻轻晃动, 使之覆盖底面, 置于 37°C 培养箱内消化细胞。
5. 在显微镜下观察, 直至克隆边缘大部分脱落 (一般需要 30-60 min)。
6. 用 10 ml 移液管轻轻吹打, 将克隆吹下, 细胞悬液转移至 15 ml 离心管中, 放置一会, 待克隆自然沉降后将上层 Collagenase-type IV 吸除, 加入 hES 完全培养液 3 ml, 放置一会, 待克隆自然沉降后将上层培养液吸除。

7. 加入的 hES 完全培养液 3 ml, 用 10 ml 移液管吹打 2-3 次, 细胞自然沉降, 将上层吹打的过小的克隆及培养液吸除, 加入 hES 完全培养液 3 ml, 悬浮细胞, 按照 1:4 的比例进行传代。
8. 放入 37°C 培养箱内培养。
9. 第二天不换液, 第三天起每天换液, 换液前显微镜下将分化的克隆挑除。

注意: 复苏后 48 小时换液, 期间最好不要挪动细胞。hES 复苏后大概 4-5 天才开始有克隆出现。

冻存:

1. 按传代的方法将细胞消化下来, 制成细胞悬液。
2. 细胞自然沉降, 吸除上层培养液, 逐滴加入已经预冷的冻存液, 轻轻悬浮细胞。
3. 按每支冻存管内加入 500 μ 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:

hES 完全培养液 60%, ES 级 FBS 30%, DMSO 10%