**SiDoTek™ C57BL/6小鼠胚胎干细胞**

**产品货号：**ESC1002

**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。

SiDoTek™ 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SiDoTek™ 的小鼠胚胎干细胞培养基并在经γ-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。**

**产品信息**

|  |  |
| --- | --- |
| 产品名称 | SiDoTek™ C57BL/6小鼠胚胎干细胞 |
| 货号 | ESC1002 |
| 规格 | 1×106个/管 或 1×106个/瓶 |
| 冻存代次 | P20 |
| 保存条件 | 液氮（-196℃) |

**质量控制**

1. 通过细菌、真菌、支原体、内毒素检测。
2. 通过细胞复苏活力检测，复苏存活率>50%。
3. 通过细胞周期检测，倍增周期<72 h。
4. 通过免疫荧光检测，表达Oct4、SSEA-1和Nanog (≥90%)，不表达SSEA-3和 SSEA-4 (≤5%)。

**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. 如果使用饲养层细胞进行培养，建议使用SiDoTek™ ICR小鼠胚胎成纤维细胞（已灭活）（货号：SD-MUIEF-01002）。
5. 如果使用无血清无饲养层的培养条件，建议使用SiDoTek™ 小鼠胚胎干细胞无血清培养基（货号：SD-MUXES-90061）。
6. 通常SiDoTek™ C57BL/6小鼠胚胎干细胞接种密度为（1~2）×104个活细胞/cm2。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。**

**培养瓶（皿）包被0. 1%明胶**

**一．所需材料**

SiDoTek™ 0.1%明胶溶液（货号：SD-GLT-11301）

**二．操作步骤**

**注意：为了使y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℃保存两周。**

**ICR 小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 的复苏**

**一．所需材料**

1. SiDoTek™ ICR小鼠胚胎成纤维细胞（货号：SD-MUIEF-01002）

2. SiDoTek™ 小鼠胚胎成纤维细胞完全培养基（货号：SD-MUXEF-90011，以下简称完全培养基）

**二．操作步骤**

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

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

**注意: 融化过程必须晃动冻存管，保证冻存液融化迅速、均匀；晃动时应避免水没过管盖造成污染；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。**

1. 用75%医用酒精擦拭冻存管外表面。
2. 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。
3. 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。
4. 细胞悬液以250×g离心4 min。

**注意：请以公式a=ω2 r（a:向心加速度；ω:旋转角速度，ω=πn/30；r:转子半径）计算相应转速。**

1. 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。
2. 将细胞按2.5×10⁴个活细胞/cm²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。
3. 摇匀细胞，放入37℃、5% CO2饱和湿度的CO2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。**

1. 复苏次日，观察细胞状态，并更换新鲜的完全培养基或传代。

**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；胚胎干细胞复苏前一天复苏MEF细胞；如果MEF细胞换液当天将复苏小鼠胚胎干细胞，可以直接更换成小鼠胚胎干细胞培养基；复苏后的MEF应在3天内使用。**

**SiDoTek™ C57BL/6小鼠胚胎干细胞的复苏和培养**

**一．所需材料**

1. SiDoTek™ C57BL/6小鼠胚胎干细胞

2. SiDoTek™ C57BL/6小鼠胚胎干细胞完全培养基（货号：SD-MUXES-90011，以下简称完全培养基）

**二．操作步骤**

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

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

**注意: 融化过程必须晃动冻存管，保证冻存液融化迅速、均匀；晃动时应避免水没过管盖造成污染；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。**

1. 用75%医用酒精擦拭冻存管外表面。
2. 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。
3. 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。
4. 细胞悬液以250×g离心4 min。

**注意：请以公式a=ω2 r（a:向心加速度；ω:旋转角速度，ω=πn/30；r:转子半径）计算相应转速。**

1. 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。
2. 将小鼠胚胎干细胞按 (1.0~2.0) ×10⁴个活细胞/cm²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。
3. 摇匀细胞，放入37℃、5% CO2饱和湿度的CO2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。**

1. 复苏次日，观察细胞状态，并更换新鲜的完全培养基或传代。

**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。**

1. 之后每24h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。

**SiDoTek™ C57BL/6小鼠胚胎干细胞的传代**

**一．所需材料**

1. SiDoTek™ 0.25% Trypsin-0.04% EDTA（货号：SD-TEDTA-10001，以下简称胰酶）

2. SiDoTek™ Phosphate-Buffered Saline (1×PBS) （货号：SD-PBS-10001，以下简称PBS）

3. SiDoTek™ C57BL/6小鼠胚胎干细胞完全培养基（货号：SD-MUXES-90011）

4. SiDoTek™ 小鼠胚胎成纤维细胞完全培养基（货号：SD-MUXEF-90011）

5. 包被MEF的培养器皿

**二．操作步骤**

**注意：通常情况下，细胞培养48 h即可进行下一次传代；当小鼠胚胎干细胞出现以下情况时就必须传代：**

**①小鼠胚胎干细胞的克隆较大，出现分化或即将分化；**

**②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℃。
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。**

1. 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。
2. 收集的所有细胞悬液以250×g离心4 min。
3. 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℃）。
4. 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。
5. 将小鼠胚胎干细胞按 (1.0~2.0) ×10⁴个活细胞/cm²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。**

1. 摇匀细胞，放入37℃、5% CO2饱和湿度的CO2培养箱中。
2. 传代次日，观察细胞状态。若发现较多漂浮细胞，应予以换液。
3. 待细胞团生长至合适大小，即需传代或冻存。

**SiDoTek™ C57BL/6小鼠胚胎干细胞的分化**

**一．所需材料**

SiDoTek™ 拟胚体（EB）形成培养基（货号：SD-MUXES-90051）

**SiDoTek™ 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。**

**二．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1×10⁷cells）。当细胞生长至对数期时可进行拟胚体制备。

3. 消化细胞。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×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5×10⁶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℃、5% CO₂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5.5×10⁴个活细胞/mL，接种于60 mm细胞培养皿中，每个皿加入5mL细胞悬液。

**注意：此时需要使用未经Tissue culturetreated（TC 处理），适合悬浮细胞培养的容器。**

1. 放置于37℃、5% CO₂饱和湿度的培养箱中培养48 h。
2. 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×g，离心1 min）换液。
3. 换液后接种于新的培养皿（未TC处理）中，放置于37℃、5% CO₂饱和湿度的CO₂培养箱中继续培养72 h。
4. 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。
5. 拟胚体悬浮培养5天后，140×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，1mL/孔，共接种8孔，每孔拟胚体数量约10~20个。
6. 连续在37℃、5% CO₂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。
7. 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。

**SiDoTek™ 129胚胎干细胞的冻存**

**一．所需材料**

1. SiDoTek™ 通用无蛋白非程序冻存液（货号：SD-NCPF-10001）

2. SiDoTek™ 通用血清型程序冻存液（货号：SD-CYRO-10001）

通用无蛋白非程序冻存液（货号：SD-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℃冰箱，操作更加方便快捷。

1. **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SiDoTek™ 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℃冰箱内，以减弱细胞代谢，较好地保持细胞状态。**

6. 若选用SiDoTek™ 通用血清型程序冻存液，将冻存管放入预冷的程序降温盒中，再将程序降温盒放入-80℃冰箱中。若选用SiDoTek™ 通用无蛋白非程序冻存液，请将冻存管直接分散放入-80℃冰箱中。

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

7. 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℃冰箱中。我们建议在-80℃冰箱中的保存时间不要超过48 h。**