

hESC（H1）-eGFP 人胚胎干细胞-绿色荧光蛋白标记

一、产品简介：

人胚胎干细胞H1，曾用名WA01。该细胞由美国威斯康星大学麦迪逊分校的JamesThomson教授团队于1998年建立。Thomson团队首次成功分离并建立了人胚胎干细胞系，H1是随后建立的几个核心细胞系之一。**该细胞稳定表达绿色荧光蛋白(此细胞带有嘌呤霉素抗性)。**

二、试剂准备：

hESC（H1）-eGFP细胞专用完全培养基

成分	规格	数量	储存条件
hESC细胞基础培养基	450mL	1瓶	2-8℃
hESC细胞培养基添加剂	50mL	1瓶	-20℃

所需的其它试剂和材料

产品	规格
Y27632	1mg
Matrigel(干细胞用，不含酚红)	1mL
hESC细胞消化液	20mL
干细胞专用冻存液	10mL

三、培养流程

3.1试剂的制备

3.1.1完全培养基制备

在无菌条件下将50mL的添加剂全部解冻后加入到450mL的基础培养基中，充分混匀。配置完全的培养基在（2-8℃）下储存时刻维持稳定状态最多2-3周。在冰箱内（2-8℃）过夜解冻冷冻的培养基，不要长时间放在37℃水浴内加热培养基。

3.1.2Matrigel工作液的配制与包被

鉴于基质胶的操作环境要求比较严格，为保证您的实验顺利，特此对以下几个方面进行温馨提示：

1.收货时，首先确认还有干冰，Matrigel成固态，液面水平，如有异常请及时拍照取证并联系我们。

整个Matrigel只能分装一次，在分装前，要先放4℃冰箱（最好先把Matrigel插在冰上，然后放入4℃冰箱）过夜，且分装用的枪头、EP管等都要提前-20℃预冷（基质胶在10℃以上会发成胶凝固导致基质胶报废），整个分装过程都需在冰上进行，且以后每次试验时拿出本次用量所需的基质胶。

实验人员手心不要接触基质胶，如：要手持装有Matrigel的EP管的上方，防止体温使基质胶成胶凝固。

本库建议的配制Matrigel工作液方法（Matrigel的稀释比例建议为100倍稀释。）：

- 1.稀释前将Matrigel放入4℃冰箱过夜融化。
- 2.将适量体积的稀释液（DMEM/F12或PBS）置4℃冰箱预冷。
- 3.将融化的Matrigel与稀释液从冰箱中取出并打开盖子，用移液管吹吸稀释

上海葵赛生物科技有限公司

液几次以冷却移液管，并吸取少量稀释液加入Matrigel管中混匀，将Matrigel转移到稀释液中，并吹打混匀。（因为Matrigel遇15℃以上温度就会成凝胶粘在原装玻璃壁和移液管壁上，故Matrigel从冰箱拿出来以后尽快打开盖子并转移到预冷的稀释液中，吸取Matrigel的移液管一定要冷却）。

4.立即用稀释后的Matrigel包被培养板或培养皿。对于6孔板，每个孔使用1mL稀释后的Matrigel，对于6cm的培养皿，每个孔使用2mL稀释后的Matrigel，晃动培养板使Matrigel溶液均匀的分布在表面上。

5.使用前，包被的培养板应放在培养箱（37℃）下至少1h。请勿让培养板脱水。在培养板可供使用之前，请勿移除Matrigel溶液。

如果不立即使用，培养板必须密封，以防止脱水。包被后的培养板可在2-8℃下最多储存7天。如果Matrigel溶液并未完全覆盖表面，则无法实验最佳的细胞培养，因此，不建议使用含有溶液已蒸发区域的培养板。

如果已将培养板在2-8℃下储存，则在移除Matrigel溶液之前，将培养板在培养箱（37℃）下放置30min。

3.1.3Y27632的配制

Y27632粉末溶解在PBS中，配制成浓度未10mM的储存液，0.22 μ m滤膜过滤除菌。分装后冷冻于-20℃。

Y27632提高复苏和传代后的克隆形成率，所以只在复苏和传代步骤添加（1:1000，即终浓度为10 μ M），换液时不添加。

3.2.复苏

在开始复苏前，将所有试管、预热后的培养基和培养皿准备好，已确保尽快完成复苏过程。

1.将冻存管从液氮中取出，快速在37℃水浴槽中解冻，轻柔持续地摇动冻存管，直到只剩下一个小冷冻团。从水浴槽取出冻存管，70%乙醇擦拭进行消毒。

2.使用移液管将冻存管中含有H1细胞的冻存液轻轻转移至一个含有5-6mL已经预热的完全培养基的15mL离心管中，过程必须轻柔防止吹散细胞团。3.室温300g离心5min。

4.吸出培养基，确保细胞团完整。

5.然后缓慢加入1mL完全培养基，用手指轻弹离心管底部，使细胞团脱离底部并分散。

6.轻轻的将此1mL细胞悬液转移至已包被的培养皿/板/瓶，根据最终培养细胞的液体体积，加入Y27632，终浓度为10 μ M。

7.将培养皿/板/瓶置于37℃培养箱中，每天更换培养基（换液不需要再添加Y27632，但培养基需提前预热）。

3.3.传代

当集落变得较大、中心变得密集、明亮（对比边缘），相邻的集落开始融合时，此时可进行传代。

1.传代前，准备37℃预热好的无钙镁PBS溶液及消化液，完全培养基。2.

吸走上清，并加入37℃预热好的PBS溶液清洗1次。

3.加入适量（按6孔板每孔加1mL，6cm皿加2mL，10cm皿加3mL的量）的37℃预热好的消化液。

4.37℃放置1-2min，用手指轻弹皿/板/瓶身，显微镜下观察到大部分克隆边

缘开始脱离培养皿/板底，克隆内部大部分细胞成团脱落。

5.加入适量的完全培养基终止消化。

6.移入离心管，300g离心5min。

7.离心后重悬（重悬步骤参照复苏4-5步）。

8.传代比例为1: 6—1: 8，根据最终培养细胞的液体体积，加入Y27632，终浓度为10 μ M。

9.将培养皿/板/瓶置于37℃培养箱中，每天更换培养基（换液不需要再添加Y27632，但培养基需提前预热）。

3.4.冻存

当集落变得较大、中心变得密集、明亮（对比边缘），相邻的集落开始融合时，此时可进行传代。

1.传代前，准备37℃预热好的无钙镁PBS溶液及消化液，完全培养基。

2.吸走上清，并加入37℃预热好的PBS溶液清洗1次。

3.加入适量（按6孔板每孔加1mL，6cm皿加2mL，10cm皿加3mL的量）的37℃预热好的消化液。

4.37℃放置1-2min，用手指轻弹皿/板/瓶身，显微镜下观察到大部分克隆边缘开始脱离培养皿/板底，克隆内部大部分细胞成团脱落。

5.加入适量的完全培养基终止消化。

6.移入离心管，300g离心5min。

7.离心后重悬（重悬步骤参照复苏4-5步）。

8.使用预冷的冻存液轻轻的重悬细胞团，然后将细胞悬液转移至冻存管，冻存按6孔板每孔冻1支，6cm皿冻2-4支，10cm皿冻6-12支。