

人类胚胎干细胞H9

细胞名称：H9

细胞描述：人胚胎干细胞，曾用名WA09

形态：球形克隆，贴壁生长

来源性别：女性

组织：内细胞团

建议复苏培养体系：1个 T25 培养瓶或6cm培养皿

细胞状态：良好

支原体检测结果：阴性

细胞用途：仅供科研使用。

STR鉴定结果：

Amelogenim: X

D5S818: 11, 12

D13S317: 9

D7S820: 9, 11

D16S539: 12, 13

vWA: 17

THO1: 9

TPOX: 10,11

CSF1PO: 11

H9细胞完全培养基培养人胚胎干细胞

1.试剂和材料

H9细胞完全培养基试剂盒

成分	规格	数量	储存条件
H9细胞基础培养基	500mL	1瓶	2-8℃
H9细胞培养基添加剂	20mL	1支	-20℃

所需的其它试剂和材料

产品	规格	货号
Y27632	1mg	H9Med-CA005
Matrigel	5mL	H9Med-CA004
H9细胞消化液	500mL	H9Med-CA003
ES细胞专用冻存液	100mL	0700-T
另需细胞培养皿/瓶/板，15mL离心管和移液管等细胞培养耗材		

2.培养流程

2.1试剂的制备

2.1.1 完全培养基制备

2.1.1在室温（15-25℃）或冰箱内（2-8℃）过夜解冻细胞培养基添加剂，可在无菌条件下将添加剂分装为适量的工作等份，并在-20℃下冻存。冷冻的分量须在3个月内用完。解冻后的分量应该一天内制备成完全培养基。请勿在解冻后再次冷冻。

2.1.2.在无菌条件下将20mL的添加剂全部解冻后加入到500mL的基础培养基中，充分混匀。完全培养基在（2-8℃）下储存时刻维持稳定状态最多2-3周，或在-20℃下冷冻时刻维持稳定状态最多3个月。在室温（15-25℃）或冰箱内（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。

如果在无菌条件下制备，细胞完全培养基可直接使用。

2.1.2 Matrigel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。
2. 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。
3. 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。
4. **Matrigel的稀释比例建议为100倍稀释。**

本库建议的配制Matrigel工作液方法：

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。

2.1.3 Y27632 的配制

Y27632 粉末溶解在 PBS 中，配制成浓度未 10mM 的储存液，0.22μm 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 10μM），换液时不添加。

2.1. 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 H9 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 ROCK inhibitor Y27632，终浓度为 10μM。
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）。

2.2. 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ROCK inhibitor Y27632，终浓度为10μM。
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）。

2.3.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。