

## 人类胚胎干细胞 BG01V 说明书

**目录号:** SCSP-305

**细胞名称:** BG01V

**细胞描述:** BG01V 是一株具有异常核型的人类胚胎干细胞系。尽管有异常的核型 (49, XXY, +12, +17), 但当在鼠类胚胎饲养层 (MEFs) 上生长时, 这些克隆状仍显示出均匀的形态, 可预测生长速率, 并且在培养中易于维持。据报道, 细胞的多能性标记和碱性磷酸酶活性呈阳性。

**物种:** 人

**组织:** 内细胞团

**细胞来源:** 2013 年引入

**生物安全等级:** BSL-1

**完全培养液配方:** hES 完全培养液 (产品编号 SCSP-613)。配方见备注

**批次/冻存日期:** : 详见 冻存管/培养瓶 标识

**参考传代周期:** 7 天

**参考传代比例:** 1:3-1:4

**参考换液频率:** 每天

**2×冻存液:** hES 完全培养基 20%, FBS 60%, DMSO 20%。

或使用 我库配制的 hES 专用冻存液 (另售) 进行冻存

**细胞状态:** 球形克隆, 贴壁生长

**支原体检测结果:** 阴性

**细胞照片:**

**参考文献:**

Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts, James A. Thomson, et al. Science 282, 1145(1998)

Zeng X, et al. Properties of pluripotent human embryonic stem cells BG01 and BG02. Stem Cells 22: 292-312, 2004. PubMed:15153607

Brimble S, et al. Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder free maintenance and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9th 2001. Stem Cells Dev. 13(6): 585-597, 2004. PubMed: 15684826

Mitalipova M, Calhoun J, Shin S, Wining D, Schulz T, Noggle S, Venable A, Lyons I, Robins A, Stice S. (2003). Human embryonic stem cell lines derived from discarded embryos. *Stem Cells*, 21(5), 521-6. PubMed: 12968106

Schulz TC, Noggle S, Palmarini G, Weiler D, Lyons I, Pensa K, Meedeniya A, Davidson B, Lambert N, Condie B (2004). Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Dopaminergic Neurons in Serum Free Suspension Culture. *Stem Cells*, 22(7), PMID: 15579641

Hay RJ, Caputo JL, Macy, ML, Eds. (1992) ATCC Quality Control Methods for Cell Lines. 2nd edition, Published by ATCC.

Fleming, D.O., Richardson, J. H., Tulis, J.J. and Vesley, D., (1995) *Laboratory Safety: Principles and Practice*. Second edition, ASM press, Washington, DC.

Caputo JL. Biosafety procedures in cell culture. *J. Tissue Culture Methods* 11:223-227, 1988

### 备注:

#### 1. hES 完全培养液配方:

DMEM/F12 (Invitrogen, 11330)	466 ml
Knockout Serum Replacement (Invitrogen, 10828)	120 ml
Non-essential Amino Acids, 100× (Invitrogen, 11140)	6 ml
Glutamax (Invitrogen, 35050)	6 ml
55 mM 2-mercaptoethanol (Invitrogen, 21985)	1.5 ml
bFGF (Invitrogen, 13256)	2.4 µg

#### 2. 相关产品 : BG01V 所使用的饲养层细胞: CF-1 MEF

本细胞库可提供:

SCSP-105 P0, 可增殖, 需处理后作为 feeder 使用。

SCSP-105R P3  $3 \times 10^6$ , 已经经过射线处理, 不再增殖, 可直接作为 feeder 使用。

3. 我库冻存时, 每支冻存管体积为 500 µl, 预期存活率 70%, 每支冻存管复苏, 3 至 4 天后, 会形成 30 至 40 个克隆, 建议复苏至 1 个 T25 培养瓶中。

中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库/干细胞库

## 人胚胎干细胞（hES）（有饲养层）培养 Protocol

### MEF 细胞铺制:

1. 在 T25 培养瓶中加入 3ml Matrigel 工作液，摇匀覆盖培养瓶底面，于 37℃ 细胞培养箱中放置 1 小时以上。
2. 吸除 Matrigel，加入事先水浴温热至 37℃ 的 MEF 完全培养液。一般一个 T25 培养瓶中加入 5 ml MEF 完全培养液。
3. 按实验需要复苏 MEF 细胞。将冻存管从液氮中取出，置于 37℃ 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  $7 \times 10^5$  的 MEF 细胞，平均加入到 T25 培养瓶，轻轻摇匀后置于 37℃ 细胞培养箱。24h 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，用 4ml DPBS 漂洗 2 遍，加入新鲜的 hES 完全培养液适量待用。

### 配制 Matrigel 工作液方法:

Matrigel (CORNING, 货号 354277) 根据瓶子上的批号上 CORNING 网站 <http://www.corning.com/worldwide/en.html> 下载 quality certificate. 了解分装体积 (dilution factor), 一般情况下稀释比例为 1: 80 左右, 即 5ml matrigel 稀释到 395ml DMEM/F12 中。

1. 稀释前将 Matrigel 放入 4 度冰箱过夜融化,
2. 将适量体积的 DMEM/F12 (GIBCO, 11330) 放 4 度冰箱预冷,
3. 将融化的 matrigel 和 DMEM/F12 从冰箱取出并打开盖子, 10ml 移液管吸吹 DMEM/F12 几次以冷却移液管, 并吸取少量 DMEM/F12 加入 matrigel 瓶中混匀, 将 matrigel 转移到 DMEM/F12 培养液中, 并吹打混匀。(因为 matrigel 遇 15 度以上温度就会成凝胶粘在原装玻璃瓶壁和移液管壁上, 故 matrigel 从冰箱拿出来以后尽快打开盖子并转移到预冷的培养液中, 吸取 matrigel 的移液管一定要冷却。)
4. DMEM/F12 重新放入 4 度冰箱过夜, 使 matrigel 充分溶解。
5. 第二天将稀释好的 matrigel 吹打混匀, 分装, -80 度或者 -20 度保存, 三个月之内都可以使用。
6. 冷冻的 matrigel 工作液应放入 4 度冰箱融化, 混匀后铺皿。不能放入水浴锅温育或在室温下久置。

因许多使用者反映按照产品说明书上的冰上操作有带入微生物污染的风险,

故可以采用以上方法稀释 matrigel。如果稀释好的 matrigel 3 个月之内用不完，可以按照产品说明书上的方法，根据 dilution factor 推荐的分装体积分装 matrigel 原液到 EP 管中，每次要使用前取一管用 25ml DMEM/F12 稀释，稀释过程中的注意点同上。

#### 复苏:

1. 将 hES 细胞冻存管从液氮中取出，置于 37℃ 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，轻弹离心管底，使细胞沉淀松散，加入新鲜的 hES 完全培养液 2-3 ml，轻轻吹打一次使细胞克隆块悬浮。
4. 转移至 1 个已经铺好 MEF 细胞的 T25 培养瓶（MEF 细胞铺制中的步骤 5）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：**复苏时不能吹打过度，不能吹打成单细胞，保持细胞克隆块状，复苏后 48 小时换液，期间最好不要挪动细胞。hES 复苏后可能 4-5 天才开始有克隆出现，7-10 天传代（具体视克隆密度和大小而定）。

#### 传代:

1. 一般在复苏后第 7-10 天传代，之后常规传代为 6-7 天一次。
2. 吸除废液。
3. 用 DPBS（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℃ 培养箱内消化细胞。
5. 在显微镜下观察，直至克隆脱落（一般需要 30-60 min）。
6. 将带有脱落克隆的 Collagenase-type IV 消化液转移至 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 轻轻混匀，放置一会，待克隆自然沉降后将上层培养液吸除，重复一次（即 hES 完全培养液漂洗 2 遍，沉降后吸掉上清）。
7. 加入 hES 完全培养液 3 ml，用 1ml 移液器吹打 2-3 次，将克隆块吹散成大小为原来的约 1/10（若想得到大小较均一的克隆块，此时可将细胞静置片刻，待细胞自然沉降后取悬浮于液体中间层的克隆块传代），传代比例根据母瓶克隆密度和大小而定，一般 1:4-1:8 传代。
8. 放入 37℃ 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：**传代时不能吹打过度，不能吹打成单细胞，保持细胞克隆块状，传代后 48 小时换液，期间最好不要挪动细胞。每 6-7 天传代一次。

**冻存:**

1. 按传代的方法将细胞消化下来，漂洗后细胞沉于离心管底部（上述**传代**中步骤 6）。
2. 冷冻比例根据母瓶克隆密度和大小而定，一般 1 个 T25 培养瓶可冷冻 1-3 个冻存管。向离心管内加入 1/2 冷冻体积的 hES 完全培养液，轻轻混匀。
3. 逐滴加入已经预冷（4℃）的 2×冻存液（也是 1/2 冷冻体积），一边加一边轻轻晃动离心管。
4. 1ml 移液器轻轻混匀细胞（保持克隆块，不可吹打过度），每支冻存管内加入 500 μl 细胞悬液，标记细胞名称、代数、冻存日期等基本信息。
5. 将冻存管置于程序降温盒内，-80℃过夜，转入液氮。

**2×冻存液配方:**

hES 完全培养基 20%，FBS 60%，DMSO 20%。

**（冻存液反复冻融不得超过 3 次）**

中国科学院干细胞库/干细胞技术平台