

复苏:

1. 在 T25 培养瓶中加入 0.2% 明胶, 摇匀后覆盖底面即可, 于 37°C 细胞培养箱至少放置 15 min 以上。
2. 吸除 0.2% 明胶, 加入事先水浴加热至 37°C 的小鼠胚胎干细胞、小鼠 iPS 细胞培养液 5 ml。
3. 将小鼠胚胎干细胞、小鼠 iPS 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。
4. 将冻存管内细胞悬液转移至含 3-4 ml 小鼠胚胎干细胞、小鼠 iPS 细胞培养液的 15 ml 离心管内, 以 1000 rpm, 离心 5 min。
5. 离心后将上清液吸除, 另加入新鲜的小鼠胚胎干细胞、小鼠 iPS 细胞培养液 2 ml, 吹打悬浮。
6. 重复吹打, 制成单细胞悬液, 尽量避免气泡。
7. 转移至 1 个已经包被过明胶的 T25 培养瓶中培养。
8. 每天更换小鼠胚胎干细胞、小鼠 iPS 细胞培养液。

传代:

1. 一般在复苏后第 2-3 天传代, 视克隆大小和密度而定。
2. 吸除废液。
3. 用 PBS (不含钙镁离子) 轻轻冲洗一遍。
4. 加入 1.0 ml 的 0.25% 胰酶 (含 EDTA) 至培养瓶, 轻轻晃动, 使胰酶覆盖底面, 置于 37°C 培养箱内消化细胞。
5. 在显微镜下观察, 直至细胞层全部脱落 (一般需要 1-2 min)。
6. 加 2 ml 小鼠胚胎干细胞、小鼠 iPS 细胞培养液终止消化。
7. 多次轻轻吹打细胞, 制成单细胞悬液。
8. 加入足量的小鼠胚胎干细胞、小鼠 iPS 细胞培养液, 吹打混匀, 细胞悬液分装到预先包被过 0.2% 明胶的 T25 培养瓶中。一般地, 一个 T25 培养瓶中加入 5-6 ml 培养液。
9. 放入 37°C 培养箱内培养。
10. 每天换液。

传代比例: 1:4-1:7

冻存:

1. 按传代的方法将细胞消化下来, 制成细胞悬液。
2. 以 1000 rpm, 离心 5 min, 弃上清, 逐滴加入已经预冷的冻存液, 悬浮细胞。
3. 按每支存管内加入 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:

小鼠胚胎干细胞培养液或小鼠 iPS 培养液 80%，ES 级 FBS 10%，DMSO 10%