

MEF 细胞铺制:

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 MEF 完全培养液。一般地，一个 T25 培养瓶中加入 5 ml MEF 完全培养液。
3. 按实验需要：小鼠胚胎干细胞使用 KM-r P3 MEF 或 CF-1 P3 MEF；小鼠 iPS 使用 ICR-r P3 MEF，复苏 MEF 细胞若干支。将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 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 1×10⁶ 的 MEF 细胞，平均加入到 T25 培养瓶中，轻轻摇匀后置于 37°C 细胞培养箱。24 h 以后可以传入小鼠胚胎干细胞或小鼠 iPS 细胞。
5. 复苏或传代小鼠胚胎干细胞或小鼠 iPS 细胞前，将 T25 培养瓶中的 MEF 完全培养液吸除，加入 2 ml 小鼠胚胎干细胞、小鼠 iPS 细胞完全培养液轻轻冲洗一遍后吸除，加入新鲜的小鼠胚胎干细胞、小鼠 iPS 细胞完全培养液待用。

复苏:

1. 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。
2. 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，另加入新鲜的小鼠胚胎干细胞、小鼠 iPS 细胞完全培养液 2 ml，吹打悬浮。
4. 重复吹打，制成单细胞悬液，尽量避免气泡。
5. 转移至 1 个已经铺好 MEF 细胞的 T25 培养瓶中培养。
6. 每天更换小鼠胚胎干细胞、小鼠 iPS 细胞完全培养液。

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 细胞完全培养液终止消化。
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 细胞完全培养液，吹打混匀，细胞悬液分装到铺好 MEF 细胞的 T25 培养瓶中。一般地，一个 T25 培养瓶加入 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 μl 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：

小鼠胚胎干细胞完全培养液或小鼠 iPS 完全培养液 60%，ES 级 FBS 30%，DMSO 10%

附：小鼠胚胎干细胞与 MEF 细胞分离的简易方法（差速贴壁法）：

1. 培养中的小鼠胚胎干细胞，按传代的操作方法将细胞用胰酶消化并吹打成单细胞悬液后，加入适量的提前温育好的小鼠胚胎干细胞完全培养液重悬细胞，吹打混匀，细胞悬液分装到无 MEF 细胞的培养皿或培养瓶（一般地，一个 T25 培养瓶中培养的小鼠胚胎干细胞，在一个 10 cm 培养皿中进行差速贴壁。不要事先铺明胶，如铺明胶则细胞贴壁速度过快无法有效分离小鼠胚胎干细胞与 MEF 细胞）中。
2. 培养皿或培养瓶置于 37°C 培养箱内静置 1 小时。
3. 1 小时后，绝大部分 MEF 细胞已贴在培养皿或培养瓶底面，而大部分小鼠胚胎干细胞仍然悬浮在培养液中。
4. 收取培养液，进行后续实验。