

人胚胎干细胞H9

Cat No.:JY-J970



Description

种属	人
别称	WA 09; WA-09; WA9; H9; H9.hESCs; H9 ESC; H9 hES; H9ES; GE09; WAe003-A; WICELLE003-A; WAe009-A; WA09-PCBC; PCBC02hse2014030502; SC14-067; UKERe008-A
组织来源	内细胞团
疾病	胚胎干细胞
传代比例/细胞消化	1:2传代
完全培养基配置	H9细胞基础培养基500ML;Y27632 1mg ;Matrigel 5ML ;H9细胞消化液 500ML ;ES细胞专用冻存液 100ML
简介	人类胚胎干细胞H9，曾用名WA09，每支细胞建议复苏培养体系：1个 T25 培养瓶或6cm培养皿，3至4后会形成30至40个克隆
形态	球形克隆细胞样
生长特征	贴壁生长
STR	Amelogenim: X D5S818: 11, 12 D13S317: 9 D7S820: 9, 11 D16S539: 12, 13 vWA: 17 THO1: 9 TPOX: 10,11 CSF1PO: 11
倍增时间	每周 2-3次
培养条件	气相：空气，95%；二氧化碳，5%。温度：37摄氏度，培养箱湿度为70%-80%。
冻存条件	ES细胞专用冻存液
产品使用	仅限于科学研究，不可作为动物或人类疾病的治疗产品使用。

细胞接收处理流程：

- 1: 观察有无破损漏液情况，如有请拍照及时联系客服。
- 2: 酒精消毒培养瓶表面后显微镜下观察细胞状态，观察拍照后不用打开培养瓶盖 放入培养箱静止 2-3小时稳定 细胞状态。
- 3: 请按照细胞操作指南进行第一次传代冻存处理。
- 4: 产品随货会附带细胞说明书、细胞培养操作指南、细胞鉴定、支原体检测报告。
- 5: 若产品有异常或其他疑问，可随时联系客服；转至技术支持。

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
Y27632	1mg
Matrigel	5mL
H9细胞消化液	500mL
ES细胞专用冻存液	100mL

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°C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10 μ M。
7. 将培养皿/板/瓶置于37°C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 °C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°C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°C预热好的消化液。
4. 37°C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10 μ M。
9. 将培养皿/板/瓶置于37°C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 °C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°C 预热好的 PBS 溶液清洗 1 次。
3. 加入适量（按 6 孔板每孔加 1 mL，6 cm 皿加 2 mL，10 cm 皿加 3 mL 的量）的 37°C 预热好的消化液。
4. 37°C 放置 1-2 min，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 5 min。
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，6 cm 皿冻 2-4 支，10 cm 皿冻 6-12 支。