

H9人胚胎干细胞

细胞名称：H19人胚胎干细胞

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

冻存日期/代数：详见 冻存管/培养瓶 标识

建议复苏培养体系：1个 T25 培养瓶

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：

D5S818	11	12
D13S317	9	9
D7S820	9	11
D16S539	12	13
VWA	17	17
TH01	9.3	9.3
AMEL	X	X
TPOX	10	11
CSF1PO	11	11
D12S391	15	19
FGA	26	28
D2S1338	18	24

H1 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
Y27632	1mg
Matrix	5mL
H1细胞消化液	500mL

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.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iPS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℃ 预热好的好无钙镁 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10 μ M。

9. 将培养皿/板/瓶置于37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 预热好的消化液。
4. 37 $^{\circ}$ 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. 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（冻存液为：90% iPS细胞完全培养基与 10% 的DMSO）。