



## MEF 小鼠胚胎成纤维细胞 说明书

货号	PE101021
细胞名称	MEF 小鼠胚胎成纤维细胞
描述	取孕9 天的615 小鼠胚胎，去除脑、心脏等培养建立。该细胞可用作饲养层细胞，支持胚胎干细胞ES 的生长并维持ES 未分化的状态。当作为饲养层细胞时，MEF 需经丝裂霉素C 处理停止生长。建议作为ES 细胞的饲养层时，MEF 不要超过6 代。
种属	小鼠
组织来源	胚胎
形态	成纤维细胞样
培养特性	贴壁生长
安全性	所有动物细胞均视为有潜在的生物危害性，必须在二级生物安全台内操作，并注意防护，所有废液及接触过此细胞的器皿需要灭菌后方能丢弃。
培养基	推荐自配培养基：DMEM/F12 培养基+FBS 10%+P/S 1%。 温度：37°C 气相：95%空气，5%二氧化碳 培养箱湿度为70%-80%
细胞处理	<p><b>注意:</b>1.低温保存的细胞非常脆弱，请将冻存管放入 37°C 的水浴中解冻，尽快复苏细胞。</p> <p>2. 提前室温预热培养基。</p> <p>1) 冻存细胞的复苏：：</p> <p>将含有1mL 细胞悬液的冻存管在37°C 水浴中迅速摇晃解冻，加入到含4-6mL 完全培养基的离心管中混合均匀。在1000RPM 条件下离心3-5min，弃去上清液，完全培养基重悬细胞。然后将细胞悬液加入含6-8ml 完全培养基的培养瓶（或皿）中37°C 培养过夜。第二天显微镜下观察细胞生长情况和细胞密度。</p> <p>2) 细胞传代：如果细胞密度达80%-90%，即可进行传代培养。</p> <p>对于贴壁细胞传代可以参考以下方法：</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 弃去培养上清，用不含钙、镁离子的PBS 润洗细胞1-2 次。</li> <li>2. 加入0.25%（w / v）胰蛋白酶-0.53 mM EDTA 于培养瓶中（T25 瓶1-2mL，T75 瓶2-3mL），置于37°C 培养箱中消化1-2 分钟（难消化的细胞可以适当延长消化时间），然后在显微镜下观察细胞消化情况，若细胞大部分变圆并脱落，迅速拿回操作台，轻敲几下培养瓶后加入3-4ml 含10%FBS 的培养基来终止消化。</li> <li>3. 轻轻打匀后吸出，在1000RPM 条件下离心3-5min，弃去上清液，补加1-2mL 培养液后吹匀。将细胞悬液按1：2 的比例分到新T25 瓶中，添加6-8ml 按照说明书要求配置的新的完全培养基以保持细胞的生长活力，后续传代根据实际情况按1:2~1:5 的比例进行。</li> </ol> <p>3) 细胞冻存：收到细胞后建议在培养前3 代时冻存一批细胞种子以备后续实验使用。下面</p>



T25 瓶为例；

1. 细胞冻存时按照细胞传代的过程收集消化好的细胞到离心管中，可使用血球计数板计数，来决定细胞的冻存密度。一般细胞的推荐冻存密度为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  个活细胞/ml.
2. 1000rpm 离心3-5min，去掉上清。用配制好的细胞冻存液重悬细胞，按每1ml 冻存液含 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  个活细胞/ml 分配到一个冻存管中将细胞分配到冻存管中，标注好名称、代数、日期等信息。
3. 将要冻存的细胞置于程序降温盒中，-80 度冰箱中过夜，之后转入液氮容器中储存。同时记录好冻存管在液氮容器中的位置以便后续查阅和使用。

**注：**

1. **观察细胞密度最好用（4X 物镜）低倍镜观察，以便正确的判断细胞密度；观察细胞形态请用（10X或 20X）高倍镜观察；**
2. **瓶中运输的培养液不能重复使用，请换新鲜培养液培养；**
3. **有些细胞贴壁不牢，如发现贴壁细胞有脱落，可离心重悬后接种到新瓶内。**

保存 冻存条件：细胞冻存液 保存条件：液氮存储

供应限制 仅供研究之用

#### 常见问题及解决方案

- 1.在收到细胞后先观察培养瓶是否破裂，漏液等，如遇到上述问题请及时拍照并与我们联系。
- 2.贴壁细胞：培养瓶不开封，显微镜下检查细胞状态，瓶口酒精擦拭后平躺放置在培养箱。1-2 小时后观察，如细胞大部分又贴回瓶底，表明细胞活力正常，剩余少量漂浮的细胞可以去掉，留 8-10ml 培养液培养观察，细胞生长至汇合度到达 85%左右，进行消化传代；如细胞仍不贴壁，将细胞离心收集转到新培养瓶，原培养瓶加部分培养液继续培养，注意观察。如细胞仍不能贴壁，请用台盼蓝染色鉴定细胞活力，并请及时拍照（多倍数多视野），包括染色照片，并联系我们。（以上仅为贴壁细胞处理方法）
- 3.悬浮细胞：培养瓶不开封，显微镜下检查细胞状态，瓶口酒精擦拭后平躺放置在培养箱。1-2 小时后观察，将整瓶细胞及培养液分批离心（1000rpm, 5min），加入适量培养基，根据离心后的细胞量进行放回培养或分瓶培养。（以上仅为悬浮细胞处理方法）
- 4.半悬细胞：培养瓶不开封，显微镜下检查细胞状态，瓶口酒精擦拭后平躺放置在培养箱。1-2 小时后观察，将整瓶细胞培养液上层悬浮细胞离心（1000rpm, 5min），重悬细胞后加入原培养瓶培养至传代。细胞数量较大，可将贴壁细胞消化下来，与上层悬浮细胞混匀传代。重悬上层悬浮细胞时必须保持下层贴壁细胞的营养条件，防止贴壁细胞缺乏营养。（以上仅为半悬细胞处理方法）如遇到细胞培养问题请及时拍照并与我们联系，我们的技术人员会一直跟踪指导。