

人胚胎干细胞 H1（ESC H1）培养鉴定 实验报告

人胚胎干细胞 H1 培养鉴定

一、 实验目的

培养人胚胎干细胞 H1（ESC H1）并使用免疫荧光法、流式细胞法来进行鉴定，同时通过电镜观察进行鉴定。

二、 实验材料

1. 样本信息

人胚胎干细胞 H1（ESC H1）35P 冻存管 1 管。

2. 主要试剂与耗材

试剂名称	试剂来源	cat.No
IMMOCELL hPSC 试剂盒	逸漠生物	IMC-014
DMEM/F12 培养基	逸漠生物	IMC-205
IMMOCELL EDTA 传代工作液	逸漠生物	IMC-014-E
IMMOCELL hPSC 高活性冻存液	逸漠生物	IMC-014-S
IMMOCELL Y27632	逸漠生物	IMC-014-Y
流式抗体	Biolegend	-
免疫荧光抗体	ABclonal	-

3. 主要仪器与设备

仪器名称	仪器来源	cat. No.
移液器（不同规格）	Eppendorf	-
超净工作台	苏州净化	SW-CJ-1FD
CO ₂ 培养箱	SANYO	XD-101
台式低速离心机	上海医疗器械股份有限公司	80-2
生物倒置显微镜	OLYMPUS	IX51
振荡器	上海沪西分析仪器厂	WH-2
仪器名称	仪器来源	cat. No.
立式压力锅	上海博讯	YXQ-LS-50

台式恒温振荡器	上海精宏实验设备有限公司	THZ-312
激光共聚焦倒置显微镜	-	-
流式检测仪	-	-

三、实验方法

1. 细胞培养

1.1 细胞复苏

- 1) 将水浴锅预热至 37°C。
- 2) 将 Matrigel 包被的 6 孔板，提前放置生物安全柜中约 1 小时恢复至室温（15~30°C）。
- 3) 取 4 mL hPSC 完全培养基(mTeSR)，按照 1:4000 比例加入 1 μ l 的 IMMOCELL Supplement For hPSC-Y27632，恢复至室温（15~30°C）。

TIPS：不要在 37°C 水浴锅中预温培养基。

- 4) 取出 1 支冷冻的细胞置于 37°C 水浴锅手持轻轻摇晃，2 min 内解冻，肉眼观察细胞悬液内冰晶即将完全消失时取出。
- 5) 75%酒精无尘纸擦拭冻存管表面，转入生物安全柜；将细胞悬液移到事先准备好的 15 mL 离心管中，随后逐滴加入 10mL DMEM/F12，过程中轻柔晃动混匀细胞，160g 离心 5 min。
- 6) 吸弃上清，加入预温的 4 mL 的 hPSC 完全培养基（mTeSR）+IMMOCELL Supplement For hPSC 混匀细胞，尽量避免吹打。

注：可留 20 μ L 上清液，轻弹管底，使细胞悬浮液更均匀，避免成较大细胞团。

- 7) 吸除 6 孔板中 2 孔的 Matrigel 包被液，将混匀的细胞按照 2 mL/孔接种到 2 孔中。
- 8) 水平十字摇匀三次，置于 37°C，5% CO₂ 浓度，饱和湿度的培养箱中，再次水平十字摇匀三次培养。
- 9) 18-24 小时后换新的 hPSC 完全培养基（mTeSR），之后每天更换培养基。

注：在 hPSC 培养过程中，如果细胞的汇合度超过 50%，建议更换培养基时，培养基的体积增加至 3-4mL/孔。

1.2 细胞传代

- 1) 细胞汇合度达 85%左右，将孔内培养基吸取，加入 2 mL/孔的 DPBS（不含钙镁），轻轻摇晃并吸取。
- 2) 加入 2 mL/孔的 IMMOCELL EDTA 传代工作液使溶液完全覆盖孔底。
- 3) 置于 37℃培养箱中孵育 8-9 min，当大部分细胞变亮变圆，且细胞尚未脱离基质或漂起时即可终止消化。
- 4) 消化结束后轻轻地将细胞培养板拿回生物安全柜，避免震荡摇晃细胞，倾斜并吸除 IMMOCELL EDTA 传代工作液。
- 5) 及时加入 2 mL/孔预温的 hPSC 完全培养基（mTeSR）+IMMOCELL Supplement For hPSC-Y27632，水平十字摇晃 6 孔板使细胞脱离基质。
- 6) 吸取 6 孔板中的 Matrigel 溶液，加入预温的 hPSC 完全培养基（mTeSR）+IMMOCELL Supplement For hPSC-Y27632 2 mL/孔。
- 7) 在 6 孔板上标记细胞名称、代次、传代比例、日期、操作人。将步骤 9 获得的细胞悬液轻轻摇匀，按预先设定的传代比例均匀分配于孔板中。
- 8) 接种后，水平十字摇匀 6 孔板三次，置于 37℃，5% CO₂ 浓度，饱和湿度的培养箱中，再次水平十字摇匀 6 孔板三次，培养过夜。
- 9) 18-24 小时后更换新 hPSC 完全培养基（mTeSR），此后每天换液，4-5 天后继续传代/冻存。

1.3 细胞冻存

- 1) 当细胞汇合度达 85%左右，可收获冻存，一般 6 孔板每孔可冻存 1 管。
- 2) 准备相应数量的 2 mL 冻存管，标记细胞名称、代次（P#）、日期、操作人。
- 3) 取出 4℃冰箱中的 IMMOCELL hPSC 高活性冻存液，置于室温预温，使用前注意摇匀。
- 4) 吸取 hPSC 培养上清，加入 2 mL/孔的 DPBS（不含钙镁），轻轻摇晃数次，再吸取。
- 5) 加入 2 mL/孔的 IMMOCELL EDTA 传代工作液，将细胞置于 37℃培养箱中，计时 8-9 min（可参考“1.2 细胞传代”步骤）。
- 6) 消化结束，轻轻取出培养板，吸取 IMMOCELL EDTA 传代工作液。
- 7) 摇匀预温的 IMMOCELL hPSC 高活性冻存液，每孔加入 1 mL 冻存液，轻柔吹打，水平十字摇匀 3 次，随后吸取细胞悬液加入 1.5/2 mL 冻存管中。

- 8) 将细胞置于梯度程序降温盒中，并置-80℃冰箱中过夜，次日转入液氮罐中长期保存。

2. ESC H1 细胞鉴定

2.1 细胞鉴定（免疫荧光）

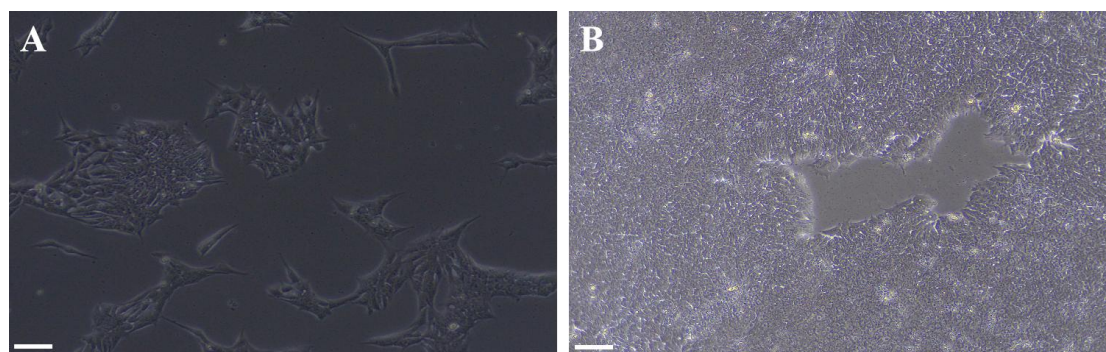
- 1) 将 ESC 细胞接种于由 Matrigel 包被的玻底培养皿中，生长 3-4 天；
- 2) 吸除培养基，加入 4%多聚甲醇固定 30 min-1 h；
- 3) 一抗于 4℃孵育过夜，二抗孵育 2 h；
- 4) 使用激光共聚焦倒置显微镜检测成像。
- 5) 获得激光共聚焦倒置显微镜成像结果图。

2.2 细胞鉴定（流式）

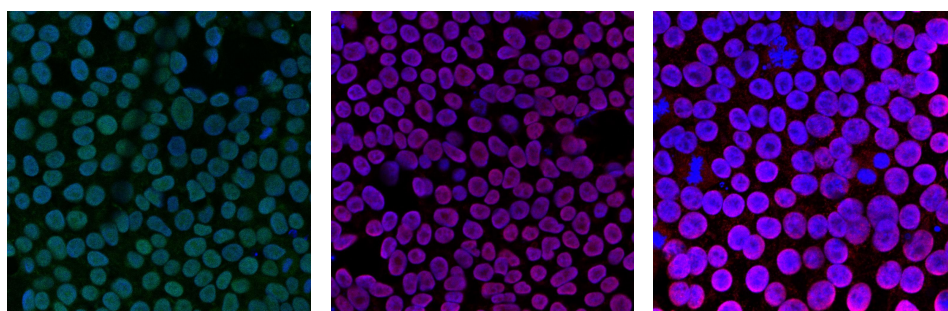
- 1) 收集适量的单细胞悬液；
- 2) 使用流式抗体孵育；
- 3) 待样本完成检测即可获得细胞表面特异性蛋白信息。

四、 实验结果

1. ESC H1 细胞鉴定



表型鉴定

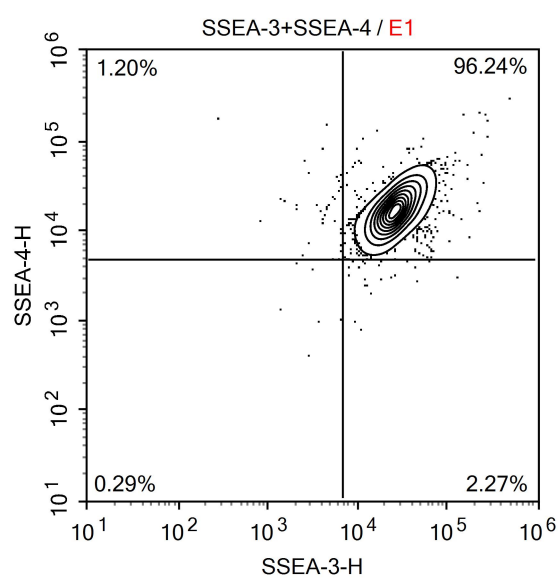


OCT4

SOX2

Nanog

免疫荧光检测



流式检测

五、 结果分析

本项目的实验目的是培养人胚胎干细胞（ESC H1）并通过电镜观察，荧光免疫法，流式细胞法来进行鉴定，以上结果显示，本公司培养人胚胎干细胞（ESC H1）鉴定正确，可供科研使用。