

hPSC 试剂盒说明书

一、产品简介

hESC/iPSC 细胞培养基试剂盒是一种适用于无饲养层培养，成分明确，补充多种生长因子的人多能干细胞（hPSC）无血清培养体系。hESC/iPSC 在 hESC/iPSC 细胞培养基中可以快速增殖，而边缘分化的细胞则在该培养基中生长较慢，从而选择性扩增并获得高纯度人多能干细胞。

二、产品信息

表 1：hESC/iPSC 完全培养基试剂盒产品内容

产品信息	货号	规格	储存条件
hESC/iPSC 细胞培养基试剂盒	IMC-014	1 Kit	2℃~-20℃*
hESC/iPSC Basal Medium	IMC-014-M	400 mL	2℃~8℃
hESC/iPSC Growth Supplements A	IMC-014-A	20 mL	-20℃ or -80℃
hESC/iPSC Growth Supplements B	IMC-014-B	80 mL	-20℃ or -80℃
hESC/iPSC Supplement C	IMC-014-Y	1mL	-20℃ or -80℃

表 2：hESC/iPSC 其他相关试剂产品内容

产品信息	货号	规格	储存条件
hESC/iPSC Passage Solution	IMC-014-E	500 mL	2℃~8℃
hESC/iPSC Cryopreservation Solution	IMC-014-S	50 mL	2℃~8℃

三、试剂材料

表 2：其他试剂&材料

试剂&材料	品牌	货号
DMEM/F12 培养基	--	--
6/12/24 孔板	--	--
1 mL/5 mL/10 mL/25 mL 移液管	--	--
15 mL/50 mL 离心管	--	--
1.5/2 mL 冻存管	--	--
梯度程序降温盒	--	--

四、试剂准备:

1) hESC/iPSC 完全培养基配制 (500 mL)

1. 在 4℃ 条件下解冻 hESC/iPSC Growth Supplements A/B, 勿在 37℃ 培养箱/水浴锅解冻。
2. 参考表 3 在生物安全柜中, 使用无菌移液管混匀下列成分配制成 hESC/iPSC 完全培养基, 之后置于 4℃ 储存, 封口膜封好后 2 周内使用。
3. 有初培养需扩建的需求, 建议先配置 100 mL, 保证 2 周内使用完毕。

表 3: hESC/iPSC 完全培养基配置说明*

组分	500 mL	100 mL	50 mL
hESC/iPSC Basal Medium	400 mL	80 mL	40 mL
hESC/iPSC Growth Supplements A	20 mL	4 mL	2 mL
hESC/iPSC Growth Supplements B	80 mL	16 mL	8 mL

可根据实际用量将 hESC/iPSC Growth Supplements A/B 分装后冷冻保存。具体配置比例可参考表 3 的配置说明。hESC/iPSC Growth Supplements A/B 冻融总次数不能超过 2 次。

2) Matrigel 铺板 (以货号为 354277 的 Corning® Matrigel® 包被 6 孔板为例)

A. 分装 Matrigel

1. 货号 354277 的 Matrigel, 操作说明中不标注蛋白浓度, 而是以 Dilution Factor 表示, 如某批次的推荐 Dilution Factor 为 278 μ L, 则表明 278 μ L 可包被 4 块 6 孔板, 分装数量=5 mL /0.278=17.98。
2. 准备 18 个无菌 1.5 mL EP 管, 标记 Matrigel 日期、操作人; 1mL 无菌吸头; EP 管架, 均置于-20℃冰箱中预冷 1 小时。
3. 将 Matrigel 放置 4℃ 冰箱过夜解冻, 当 Matrigel 完全解冻即可开始分装。
注: 在解冻时, 将 Matrigel 放置冰箱内侧角落, 切勿放在靠近冰箱门附近。
4. 准备一个装满碎冰的冰盒, 将解冻过的 Matrigel、预冷的 1.5 mL EP 管及 EP 管架、1mL 吸头放置于生物安全柜上。
5. 混匀 Matrigel, 无菌分装于各个 1.5 mL EP 管中, 并置于冰上。当吸头被堵塞可能导致分装体积不准时需要更换吸头。
6. 将分装后的 Matrigel 置于-20℃冰箱中保存。

B. 铺板

1. 取 36 mL 冷藏 DMEM/F12 于 50 mL 离心管中, 准备 4 个 6 孔板, 标记 Matrigel、批号、日期和操作人。

2. 1 mL 无菌吸头置于-20℃冰箱中预冷 1 小时，取出一支冷冻的 Matrigel (5mL) 置于 4℃ 冰箱解冻至完全化冻。
3. 准备一个装满碎冰的冰盒，将解冻过的 Matrigel、预冷的 1mL 吸头放置于生物安全柜上。
4. 用预冷的吸头向解冻过的 Matrigel (5mL)，加入 1 mL 冷的 DMEM/F12 反复吹打解冻并混匀。
5. 吸出已解冻混匀的 Matrigel 加入离心管中剩余的 DMEM/F12，使用 10 mL 移液管再次反复吹打混匀。
6. 分装 1.5 mL/孔于 4 个六孔板中，轻轻摇晃混匀。
7. 培养板置于室温 1 小时后即可使用，或置于 4℃ 冷藏过夜，两周内使用。

五、复苏 hESC/iPSC (以 6 孔板为例)

1. 将水浴锅预热至 37℃。
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℃)。
3. 取 4 mL hESC/iPSC 完全培养基，按照 1:4000 比例加入 1 μL 的 hESC/iPSC Supplement C，恢复至室温 (15~30℃)。

TIPS: 不要在 37℃ 水浴锅中预温培养基。

4. 取出 1 支冷冻的细胞置于 37℃ 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，160 g 离心 5 min。
6. 吸弃上清，加入预温的 4 mL 的 hESC/iPSC 完全培养基混匀细胞，尽量避免吹打。
注：可留 20 μL 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℃，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 hESC/iPSC 完全培养基，之后每天更换培养基。

注：在 hESC 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。

表 4：hESC/iPSC 传代&培养操作试剂推荐用量

培养容器	底面积	DPBS (mL)	EDTA 传代工作液	hPSC 培养基*
6 孔板	9.6 cm ² /孔	2mL/孔	2 mL/孔	2 mL/孔
12 孔板	4.5 cm ² /孔	1mL/孔	1 mL/孔	1 mL/孔
24 孔板	8 cm ² /孔	0.5mL/孔	0.5 mL/孔	0.5 mL/孔

六、传代 hESC/iPSC (以 6 孔板为例)

1. 传代条件：① 细胞汇合度达 85%左右（如图 1(C-D)所示），一般情况下每 3-4 天传代；
② 细胞汇合度较低，生长密度分布不均匀。

注：即使克隆团较小、汇合度不足，也建议不要连续培养超过 5 天。

2. 传代比例：可根据细胞生长状态和实验需要按 1:5~1:12 的比例进行传代，如果细胞正常，克隆团汇合度 85%，大小均匀（如图 1(C-D)所示），建议按照 1:8 进行传代，如果密度偏低，则可降低传代比例；密度偏高，则增加传代比例。

注：1:8 传代就是 1 个孔瓶传 8 个孔（以 6 孔板为例）。

3. 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（~25℃）。
4. 根据传代接种的孔数准备 2 mL/孔的 hESC/iPSC 完全培养基，并按 1：4000 比例加入 hESC/iPSC Supplement C(IMC-014-Y)，恢复至室温（~25℃）。

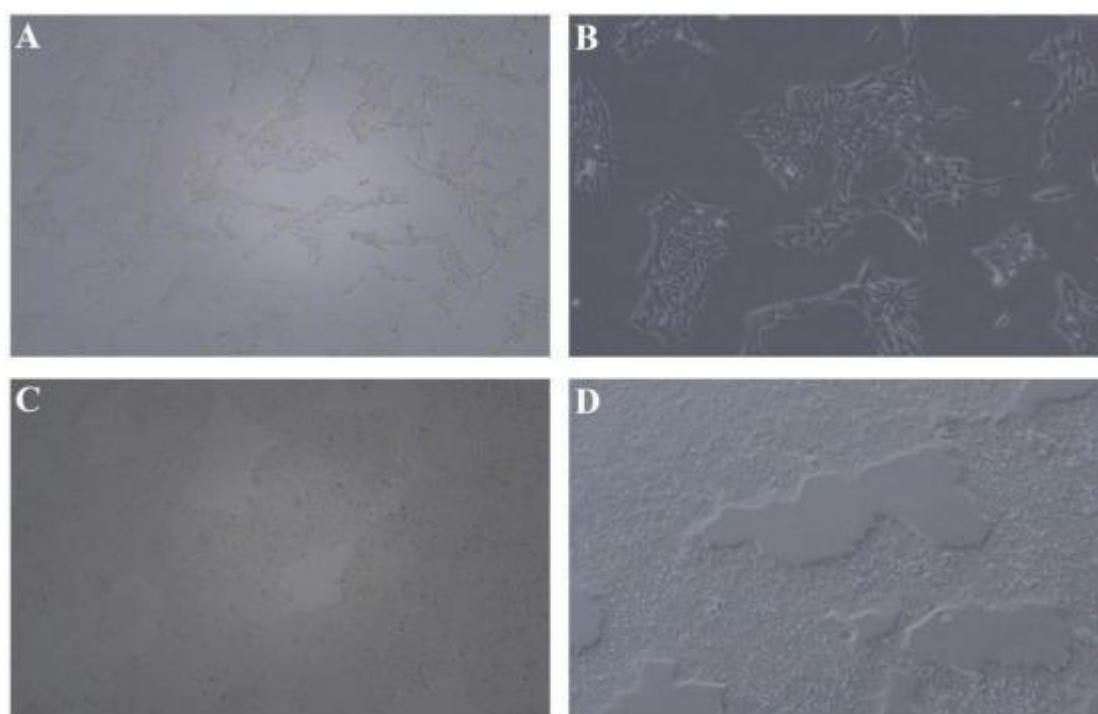


图 1.hESC/iPSC 完全培养基连续培养 hESC 细胞形态图：（A）和（C）分别为 hESC 细胞培养第 2 和 4 天时低倍镜 hESC 培养形态图示，（B）和（D）为培养至第 2 和 4 天时的高倍镜 hESC 培养形态图。

5. 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（~25℃）。

6. 根据传代接种的孔数准备 2 mL/孔的 hESC/iPSC 完全培养基，并按 1：4000 比例加入 hESC/iPSC Supplement C，恢复至室温（~25℃）。

7. 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。

8. 加入 2 mL/孔的 hESC/iPSC Passage Solution 使溶液完全覆盖孔底。

9. 置于 37℃ 培养箱中孵育 8-9 min。

注：① 消化 8-9 min 后镜下观察细胞变化，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，若大部分细胞仍未变亮，则需要延长消化时间；

② 保持 6 孔板与培养箱金属隔板直接接触，使 6 孔板受热均匀，不要叠放。

10. 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 hESC/iPSC Passage Solution。

11. 及时加入 2 mL/孔预温的 hESC/iPSC 完全培养基+hESC/iPSC Supplement C，水平十字摇晃 6 孔板使细胞脱离基质。

注：① 加 hESC/iPSC 完全培养基+hESC/iPSC Supplement C 时，可轻柔吹打细胞 1-2 次，不能超过 2 次，避免反复吹打；有部分细胞（10%~15%）未脱离基质是正常现象，若有大量细胞未脱离则需延长消化时间（< 10min）。

② hESC 不能长时间处于 hESC/iPSC Passage Solution（<15 min），所以收集接种细胞时操作必须快速，以及最好一次操作不要超过 4 孔（六孔板）。

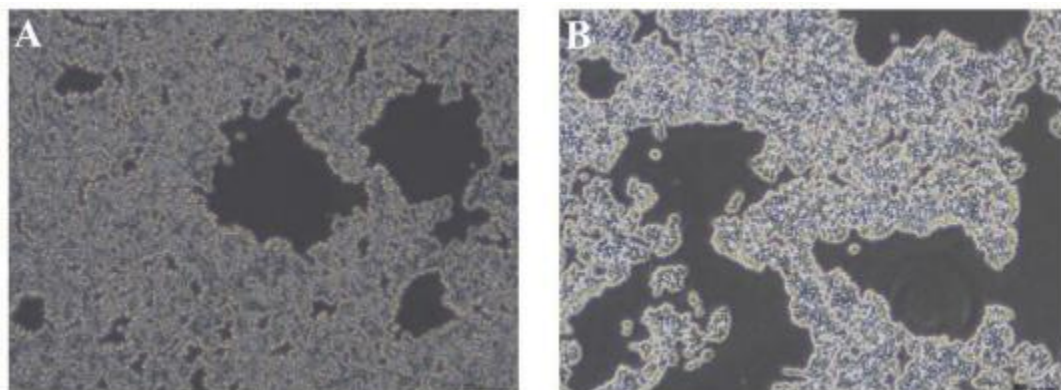


图 2：消化 hESC 细胞不同时间形态图：（A）消化 8 min 低倍镜 hESC 培养的的形态图；（B）消化 9 min 低倍镜 hESC 培养的的形态图。

12. 吸取 6 孔板中的 Matrigel 溶液，加入预温的 hESC/iPSC 完全培养基+hESC/iPSC Supplement C 2 mL/孔。

13. 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。

注：为了铺板均匀并降低对细胞的损伤，可以将步骤 9 获得的细胞悬液收集至 2 mL 离心管，

轻柔颠倒混匀细胞 1-2 次；再按照传代比例接种。

14. 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。

15. 18-24 小时后更换新 hESC/iPSC 完全培养基，此后每天换液，4-5 天后继续传代/冻存。

七、冻存 hESC/iPSC

1. 当细胞汇合度达 85%左右（如图 1(C-D)所示）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 1.5/2 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 hESC/iPSC Cryopreservation Solution，置于室温预温，使用前注意**摇匀**。

4. 吸取上清液，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 hESC/iPSC Passage Solution，将细胞置于 37℃培养箱中，计时 8-9 min（可参考“六、传代 hESC/iPSC”步骤）。

6. 消化结束，轻轻取出培养板，吸取 hESC/iPSC Passage Solution。

7. 摇匀预温的 hESC/iPSC Cryopreservation Solution，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。

八、其他培养体系中 hESC/iPSC 更换为 hESC/iPSC 完全培养基条件的适应

其他无饲养层条件培养的 hESC/iPSC 可以在细胞状态良好时，使用原培养基进行细胞传代，24 小时后更换成混合培养基（原培养基与 hESC/iPSC 完全培养基按照 1:1 混合）培养，培养 2 代后完全换成 hESC/iPSC 完全培养基培养，培养 2-3 代后可完全适应新的培养体系，此时可进行细胞冻存处理。

九、问题及解决方案

hESC/iPSC 培养出现分化
<ul style="list-style-type: none">• 确保 hESC/iPSC 完全培养基储存于 4℃，并在 2 周内用完，每次只预温当次实验所需的培养基，减少其温度变化，避免培养基中的因子效价下降。• 如 hESC/iPSC 克隆整体形态良好，零星分化细胞 (<1%) 出现于克隆周边，可以通过 hESC/iPSC Passage Solution 去除。• 确保传代 hESC/iPSC 的细胞团大小均匀，约 20 个细胞左右的团块为佳；若细胞团较大，可用 5 mL 移液管轻柔吹打不超过 3 次，力度要轻且均匀，否则细胞受压过大易产生破损、分化。• 每次观察时避免将细胞从培养箱中取出超过 15 min。• 若 hESC/iPSC 克隆表现为内部松散，边缘不平滑，分化比例超过 20%，则建议废弃。
能否用 Dispase 或胶原酶传代 hESC/iPSC
<ul style="list-style-type: none">• 可以用 Dispase 或胶原酶传代，但细胞消化不会太好，影响传代后细胞的存活率，也容易积存分化的细胞。hESC/iPSC 完全培养基体系中的 hESC/iPSC 建议使用非酶的温和的消化方式传代。• 如果实验需要将 hESC/iPSC 消化成单细胞，建议使用 Accutase 酶消化 5-10 分钟。
hESC/iPSC 传代后不贴壁或贴壁率低
<ul style="list-style-type: none">• 传代比例不要过高 (>1:12)。• hESC/iPSC Passage Solution 消化时间不宜过长，部分可能需要延长消化时间超过 9 min，不要超过 15 min。• 避免过度吹打细胞 (<2 次)，以免细胞团被吹散，或对细胞造成损伤。• 确保培养板已被 Matrigel 或其他适合多能干细胞生长的基质成分。• 确保培养基中加入了 hESC/iPSC Supplement C。
换液后细胞漂起
<ul style="list-style-type: none">• 接种后 18-24 小时后进行第一次换液，确保细胞已贴壁良好。• 换液操作要轻柔，避免使细胞团脱离基质。
孔内 hESC/iPSC 克隆团分布不均匀
<ul style="list-style-type: none">• 确保包被的基质均匀地分布于容器底部。• 传代接种时确保细胞分散均匀，水平十字摇匀后避免晃动培养板导致细胞聚集于孔的中间部分。• 再把培养板放置入培养箱时，需再次水平十字摇匀。