
人多能干细胞 hiPSC 培养鉴定

实验报告

人多能干细胞 hiPSC 培养鉴定

一、实验目的

培养人多能干细胞 hiPSC 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

人多能干细胞 hiPSC 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 10 mL 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 3-4 mL/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. hiPSC 细胞鉴定

2.1 细胞鉴定 (免疫荧光)

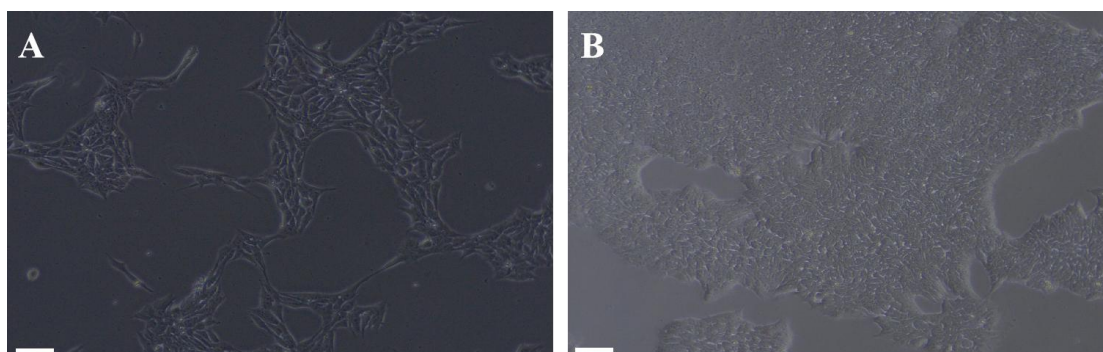
-
- 1) 将 ESC 细胞接种于由 Matrigel 包被的玻底培养皿中，生长 3-4 天；
 - 2) 吸除培养基，加入 4%多聚甲醇固定 30 min-1 h；
 - 3) 一抗于 4℃孵育过夜，二抗孵育 2 h；
 - 4) 使用激光共聚焦倒置显微镜检测成像。
 - 5) 获得激光共聚焦倒置显微镜成像结果图。

2.2 细胞鉴定（流式）

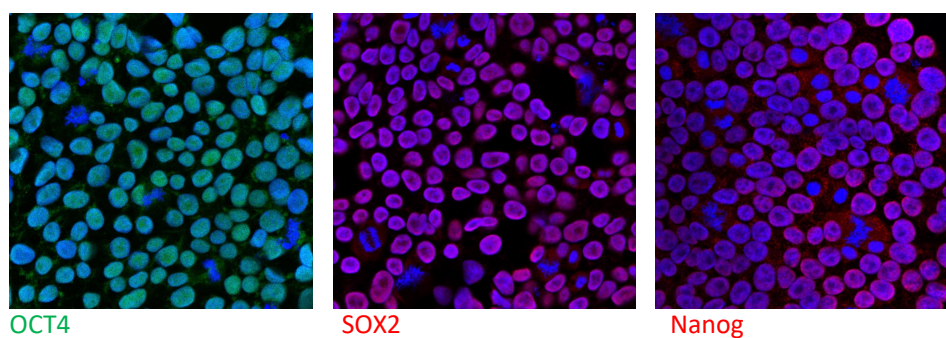
- 1) 收集适量的单细胞悬液；
- 2) 使用流式抗体孵育；
- 3) 待样本完成检测即可获得细胞表面特异性蛋白信息。

四、 实验结果

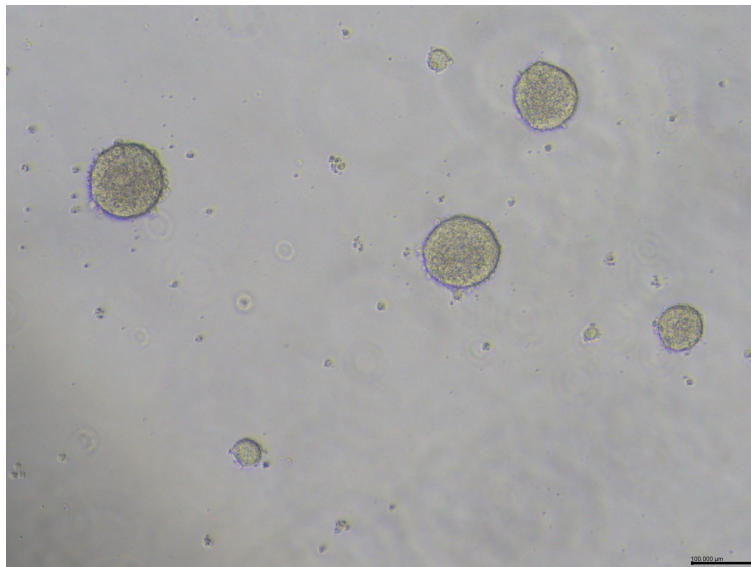
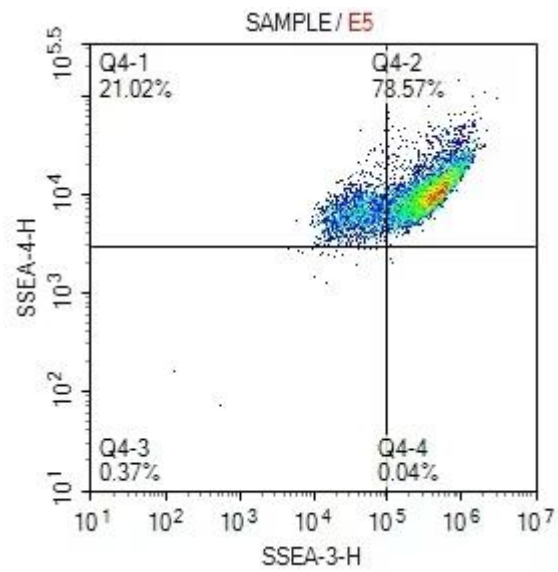
1. hiPSC 细胞鉴定



表型鉴定



免疫荧光检测



EB 诱导

五、 结果分析

本项目的实验目的是培养人多能干细胞 hiPSC 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，本公司培养人多能干细胞 hiPSC 鉴定正确，可供科研使用。