

hiPSC 细胞培养说明书

一、产品简介:

hiPSC 细胞株来源于 ATCC,是将健康男性新生儿包皮细胞诱导成 hiPSC,贴壁生长,呈克隆状,可在 hESC/iPSC 完全培养基中快速增殖,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。包装规格为 1mL 冻存管,含量为>1x10⁶个/mL,且支原体、细菌、酵母和真菌检测为阴性。

二、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 Grouth Supplements A/B, 勿在 37℃培养箱/水浴锅解冻。
- 2. 参考表 1 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 1: 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 Grouth Supplements A | 20 mL | 4 mL | 2 mL |
| hESC/iPSC Grouth Supplements B | 80 mL | 16 mL | 8 mL |

可根据实际用量将 hESC/iPSC Grouth 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 Grouth 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

- 货号 354277 的 Matrigel,操作说明中不标注蛋白浓度,而是以 Dilution Factor 表示,如果批次的推荐 Dilution Factor 为 278 μL,则表明 278 μL 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°C冰箱过夜解冻,当 Matrigel 完全解冻即可开始分装。

第1页共6页

本产品仅供科研使用











- 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(278 μ L)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. 用预冷吸头向解冻过的 Matrigel(278μL)加入 1 mL 冷的 DMEM/F12 并反复吹打解冻混匀。
- 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。

三、细胞培养操作:

1) 复苏 hESC/iPSC(以 6 孔板为例)

- 1. 将水浴锅预热至 37°C; 并将 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 2 mL hESC/iPSC 完全培养基,加入 hESC/iPSC Supplement C 终浓度为 10uM,恢复至室温(15~30℃)。

注意: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。

第2页共6页

本产品仅供科研使用











- 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,随后缓慢逐滴加入 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 2 mL 的 hESC/iPSC 完全培养基+hESC/iPSC Supplement C 制备细胞悬液,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 1 孔的 Matrigel 包被液,将细胞悬液按照 2 mL/孔接种到 1 个孔中。
- 8. 水平十字摇匀三次,置于 37°C,5% CO_2 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 hiPSC 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。

| The second of Reflection Williams | | | | | | | |
|-----------------------------------|------------------------|-----------|------------|-----------|--|--|--|
| 培养容器(孔数) | 底面积 | DPBS (mL) | EDTA 传代工作液 | hPSC 培养基* | | | |
| 6 孔板(1 管/1 孔) | 9.6 cm ² /孔 | 2mL/孔 | 2 mL/孔 | 2 mL/孔 | | | |
| 12 孔板 (1 管/2 孔) | 4.5 cm ² /孔 | 1mL/孔 | 1 mL/孔 | 1 mL/孔 | | | |
| 24 孔板 (1 管/4 孔) | 8 cm ² /孔 | 0.5mL/孔 | 0.5 mL/孔 | 0.5 mL/孔 | | | |

表 2: hESC/iPSC 传代&培养操作试剂推荐用量

2) 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,加入 hESC/iPSC Supplement C 终浓度为 10uM,恢复至室温(~25℃)。

第3页共6页

本产品仅供科研使用











- 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(\sim 25°C)。
- 6. 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。
- 7. 加入 2 mL/孔的 hESC/iPSC Passage Solution 使溶液完全覆盖孔底。
- 8. 置于 37℃培养箱中孵育 5-6 min。
- 注: ① 消化 5-6 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。

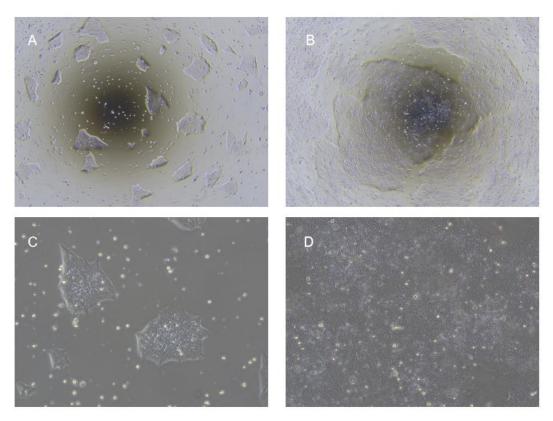


图 1. hESC/iPSC 完全培养基连续培养 hiPSC 细胞形态图: (A) 和(B) 分别为 hiPSC 细胞培养第 2 和 4 天时低倍镜 hiPSC 培养形态图示, (C) 和(D) 为培养至第 2 和 4 天时的高倍镜 hiPSC 培养形态图。

- 9. 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。
- 10. 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

第4页共6页

本产品仅供科研使用





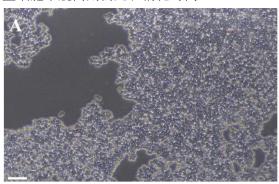






晃6孔板使细胞脱离基质。

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)。



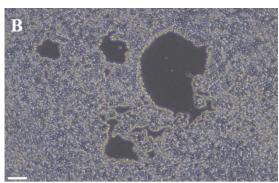


图 2: 消化 hiPSC 细胞不同时间形态图: (A) 消化 5 min 低倍镜 hiPSC 培养的的形态图; (B) 消化 6 min 低倍镜 hiPSC 培养的的形态图。

- ② hiPSC 细胞不能长时间处于 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)。
- 11. 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。
- 12. 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 8 获得的细胞悬液收集至 2mL 离心管,轻柔颠倒混匀细胞 1-2 次;再按照传代比例接种。
- 13. 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。
- 14. 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。

3) 冻存 hESC/iPSC(以 6 孔板为例)

- 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°C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。

第5页共6页

本产品仅供科研使用











- 5. 加入 2 mL/孔的 hESC/iPSC Passage Solution,将细胞置于 37℃培养箱中, 计时 5-6 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。

四、收货注意事项:

- 1. 收到细胞后首先观察细胞瓶是否完好,培养液是否有漏液、浑浊等现象,**干冰运输的细胞检查干冰是否完全挥发,细胞是否解冻**,若有上述现象发生请及时和我们联系。
- 2. **仔细阅读细胞说明书,了解细胞相关信息,如细胞形态、所用培养基、血清比例、所需细胞因子等,确保细胞培养条件一致,**若由于培养条件不一致而导致细胞出现问题,责任由客户自行承担。
- 3. 请客户用相同条件的培养基用于细胞培养。
- 4. 建议客户**复苏细胞后前3天各拍几张细胞照片**,记录细胞状态,便于和我司技术部沟通 交流。由于运输的原因,细胞会出现不稳定的情况,请及时和我们联系,告知细胞的具体情况,以便我们的技术人员跟踪回访直至问题解决。
- 5. 该细胞仅供科研使用。

第6页共6页

本产品仅供科研使用





