

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 $>1 \times 10^6$ 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）

- 在 4°C 条件下解冻 hESC/iPSC Growth Supplements A/B，勿在 37°C 培养箱/水浴锅解冻。
- 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°C 储存，封口膜封好后 2 周内使用。
- 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 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

- 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 = $5 \text{ mL} / 0.278 = 17.98$ 。
- 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°C 冰箱中预冷 1 小时。
- 将 Matrigel 放置 4°C 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°C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°C冰箱中预冷 1 小时，取出一支冷冻的 Matrigel（5mL）置于 4°C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（5mL）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°C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 4 mL hESC/iPSC 完全培养基，按照 1:4000 比例加入 1 μ L 的 hESC/iPSC Supplement C，恢复至室温（15~30°C）。

注意：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 4 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 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% 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 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。

表 2：hESC/iPSC 传代&培养操作试剂推荐用量

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

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，并按 1:4000 比例加入 hESC/iPSC Supplement C，恢复至室温（~25℃）。

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。

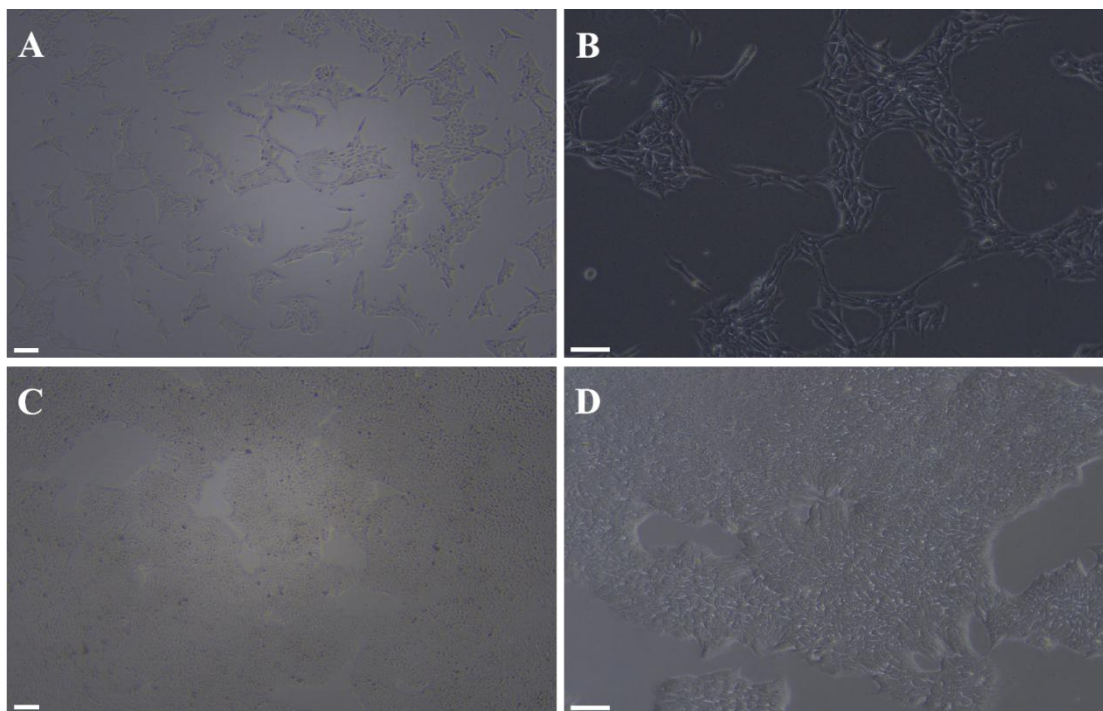


图 1. hESC/iPSC 完全培养基连续培养 hiPSC 细胞形态图：（A）和（C）分别为 hiPSC 细胞培养第 2 和 4 天时低倍镜 hiPSC 培养形态图示，（B）和（D）为培养至第 2 和 4 天时的高倍镜 hiPSC 培养形态图。

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）。

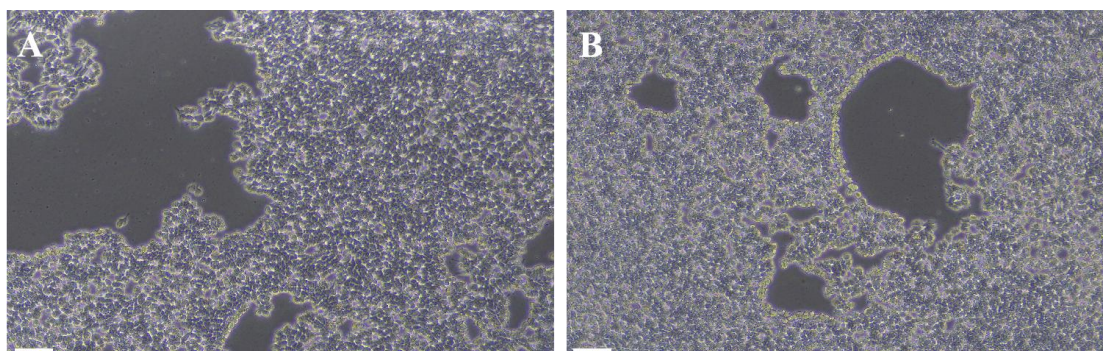


图 2：消化 hiPSC 细胞不同时间形态图：（A）消化 8 min 低倍镜 hiPSC 培养的的形态图；（B）消化 9 min 低倍镜 hiPSC 培养的的形态图。

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）。

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 2mL 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°C，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。

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。

5. 加入 2 mL/孔的 hESC/iPSC Passage Solution，将细胞置于 37°C 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°C 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。