hESC/iPSC 细胞培养试剂盒

Cat NO: IMC-014

一、产品简介

hESC/iPSC 细胞培养基试剂盒是厦门逸漠生物科技有限公司研发技术团队开发的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 Grouth Supplements A	IMC-014-A	20 mL	-20℃ or -80℃
hESC/iPSC Grouth Supplements B	IMC-014-B	80 mL	-20℃ or -80℃
hESC/iPSC Supplement C	IMC-014-Y	1mg	-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℃
hESC/iPSC Planking Solution Supplement	IMC-014-P-1	1.2mL	-20℃
hESC/iPSC Planking Solution Basal Medium	IMC-014-P-2	90mL	2℃~8℃

IMMOCELL

本产品仅供科研使用

厦门逸漠生物科技有限公司
网址：www.immocell.com
电话：400-080-3389

三、试剂材料

表 3：其他试剂&材料

试剂&材料	品牌	货号
DMEM/F12 培养基	IMMOCELL	IMC-205
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 Grouth Supplements A/B，勿在 37℃培养箱/水浴锅解冻。

2. 在生物安全柜中，使用无菌移液管将 hESC/iPSC Grouth Supplements A/B 与 hESC/iPSC Basal Medium 混匀配制成 hESC/iPSC 完全培养基，之后根据使用情况将培养基分装，封口膜封好，确保置于 4℃储存的培养基 2 周内使用完毕，其余培养基于-20℃冷冻保存，需要时提前于 4℃过夜解冻。

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 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℃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。

IMMOCELL

厦门逸漠生物科技有限公司
网址：www.immocell.com
电话：400-080-3389

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（278μL）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（278μL），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℃；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。

2. 取 2 mL hESC/iPSC 完全培养基，加入 4uL hESC/iPSC Supplement C 使终浓度为 10uM，取 9mL DMEM/F12，加入 18uL hESC/iPSC Supplement C 使终浓度为 10uM，恢复至室温。

注意：不要在 37℃水浴锅中预温培养基。

IMMOCELL

本产品仅供科研使用

厦门逸漠生物科技有限公司
网址：www.immocell.com
电话：400-080-3389

官网 公众号 视频号

3. 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。

4. 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 9mL DMEM/F12，将离心管轻轻缓慢上下颠倒混匀，160g 离心 5 min。

5. 吸除 6 孔板中 1 孔的 Matrigel 包被液，加入 2mL 含有 hESC/iPSC Supplement C 的 hESC/iPSC 完全培养基。

6. 离心完吸弃上清，至留下 50uL 左右的上清，轻弹管底 3-4 下至细胞混匀在上清中，逐滴缓慢加入 1mL 含有 hESC/iPSC Supplement C 的 hESC/iPSC 完全培养基，轻弹管底 3-4 下混匀细胞，将这 1mL 细胞悬空滴加进 6 孔板的含有 hESC/iPSC Supplement C 的 hESC/iPSC 完全培养基中。

7. 水平十字摇匀三次，置于 37℃，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。

注：水平十字摇匀 3 次，左右两次+上下两次算一次。

8. 18-24 小时后换新的 hESC/iPSC 完全培养基，之后每天更换培养基。

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 cm²/孔	1mL/孔	1 mL/孔	1 mL/孔
12 孔板	4.5 cm²/孔	0.5mL/孔	0.5mL/孔	0.5 mL/孔
24 孔板	2 cm²/孔	0.3mL/孔	0.3 mL/孔	0.5 mL/孔

六、传代 hESC/iPSC（以 6 孔板为例）

IMMOCELL

本产品仅供科研使用

厦门逸漠生物科技有限公司

网址：www.immocell.com
电话：400-080-3389

官网 公众号 视频号

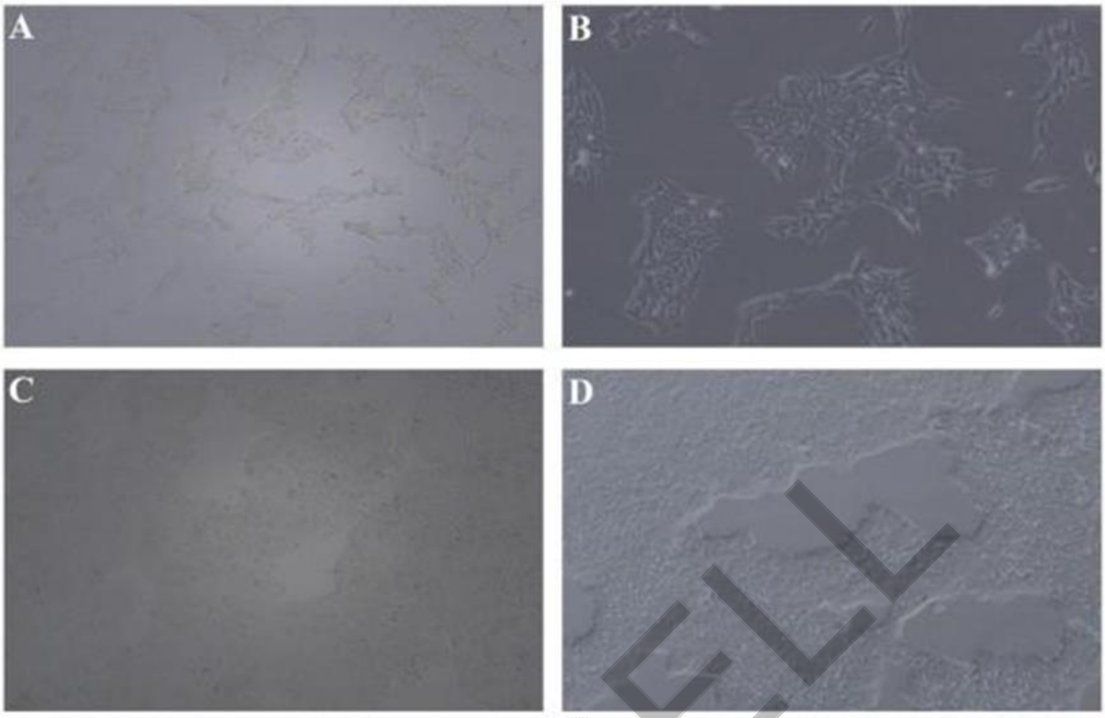

图 1.hESC/iPSC 完全培养基连续培养 hESC 细胞形态图：（A）和（C）分别为 hESC 细胞培养第 2 和 4 天时低倍镜 hESC 培养形态图示，（B）和（D）为培养至第 2 和 4 天时的高倍镜hESC 培养形态图。

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 个孔传 8 个孔（以 6 孔板为例）。

3. 将 Matrigel 包被的 6 孔板，hESC/iPSC Passage Solution，DPBS 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℃）。

5. 将细胞六孔板孔内培养基吸弃，加入 1 mL/孔的 DPBS（不含钙镁），轻轻摇晃后吸弃。

本产品仅供科研使用

厦门逸漠生物科技有限公司

网址：www.immocell.com
电话：400-080-3389

官网 公众号 视频号
IMMOCELL

6. 加入 1 mL/孔的 hESC/iPSC Passage Solution 使溶液完全覆盖孔底。

7. 置于 37℃培养箱中孵育 5-7 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，若大部分细胞仍未变亮，则需要延长消化时间，不超过 8min；

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。

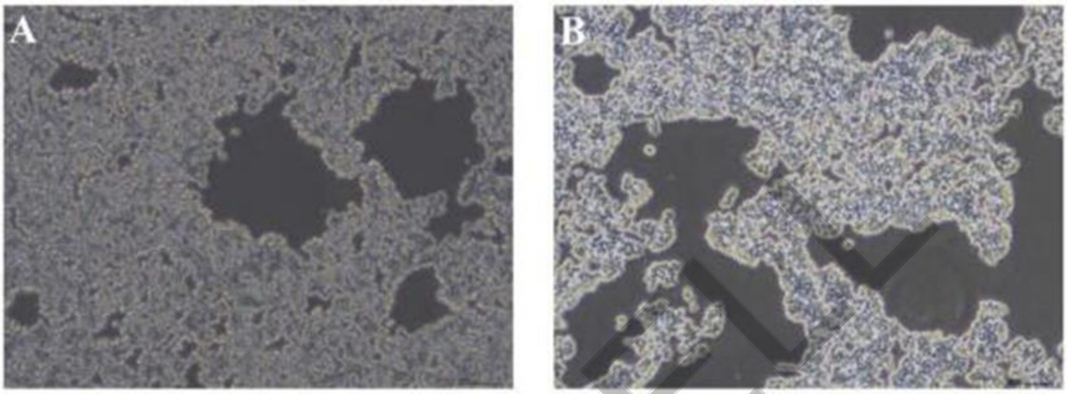

图2：消化 hESC 细胞不同时间形态图：（A）消化 6 min 低倍镜 hESC 培养的的形态图;（B）消化 7 min低倍镜 hESC 培养的的形态图。

8.消化时吸取 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。

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。及时加入 1 mL/孔预温的 hESC/iPSC 完全培养基+ hESC/iPSC Supplement C，将细胞吹下来。

注：① 加 hESC/iPSC 完全培养基 + hESC/iPSC Supplement C 时，可轻柔吹打细胞不能超过 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（< 8min）。

10.把这一毫升细胞悬液悬空滴加入板里的培养基，每孔 3-5 滴。在 6 孔板上标记细胞名称、代次、传代比例、日期、操作人，水平十字摇匀 3 次。

注：可将传完代后的细胞在镜下观察细胞密度，根据密度调整是否需要多加细胞滴。

11.置于 37℃，5% CO_2 浓度，饱和湿度的培养箱中，再次水平十字摇匀 3 次，不要叠放。

IMMOCELL

厦门逸漠生物科技有限公司
网址：www.immocell.com
电话：400-080-3389

12. 18-24 小时后换新的 hESC/iPSC 完全培养基，此后每天换液，第 4 天继续传代/冻存。

注：传代后隔天算第 1 天。

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 ，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 1 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。

IMMOCELL

本产品仅供科研使用

厦门逸漠生物科技有限公司
网址：www.immocell.com
电话：400-080-3389

九、问题及解决方案

hESC/iPSC 培养出现分化
• 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
• 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
• 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。 • 确保培养板已包被 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
• 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
• 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。

IMMOCELL

本产品仅供科研使用

厦门逸漠生物科技有限公司
网址：www.immocell.com
电话：400-080-3389