

# hESC(H1)细胞培养

Cat NO: IM-H522

## 产品简介

hESC(H1)细胞株来源于健康男性内细胞团，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。

## 试剂准备

### 1) hESC/iPSC 完全培养基配制 (500 mL)

1. 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。
2. 在生物安全柜中，使用无菌移液管将 hESC/iPSC Growth 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°C 储存的培养基 2 周内使用完毕，其余培养基于 -20°C 冷冻保存，需要时提前于 4°C 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  $\mu$ L，则表明 278  $\mu$ 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°C 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。  
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、预冷的 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.取冷藏的 36 mL DMEM/12 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 μL) 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 (278 μL) 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，急用时可放置培养箱 40 分钟。

## 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℃；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 4 μL hESC/iPSC Supplement C 使终浓度为 10 μM，取 9mL DMEM/F12，加入 18 μL hESC/iPSC Supplement C 使终浓度为 10 μM，恢复至室温。

注：不要在 37℃水浴锅中预温培养基。



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 50 μL 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 细胞悬液滴加进 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<sub>2</sub> 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 1: 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)	传代工作液	hPSC 培养基*
6 孔板 (1 管/1 孔)	9.6 cm <sup>2</sup> /孔	1mL/孔	1 mL/孔	2 mL/孔
12 孔板 (1 管/2 孔)	4.5 cm <sup>2</sup> /孔	0.5mL/孔	0.5 mL/孔	1 mL/孔
24 孔板 (1 管/4 孔)	2 cm <sup>2</sup> /孔	0.3mL/孔	0.3 mL/孔	0.5 mL/孔

## 2) 传代hESC/iPSC (以 6 孔板为例)



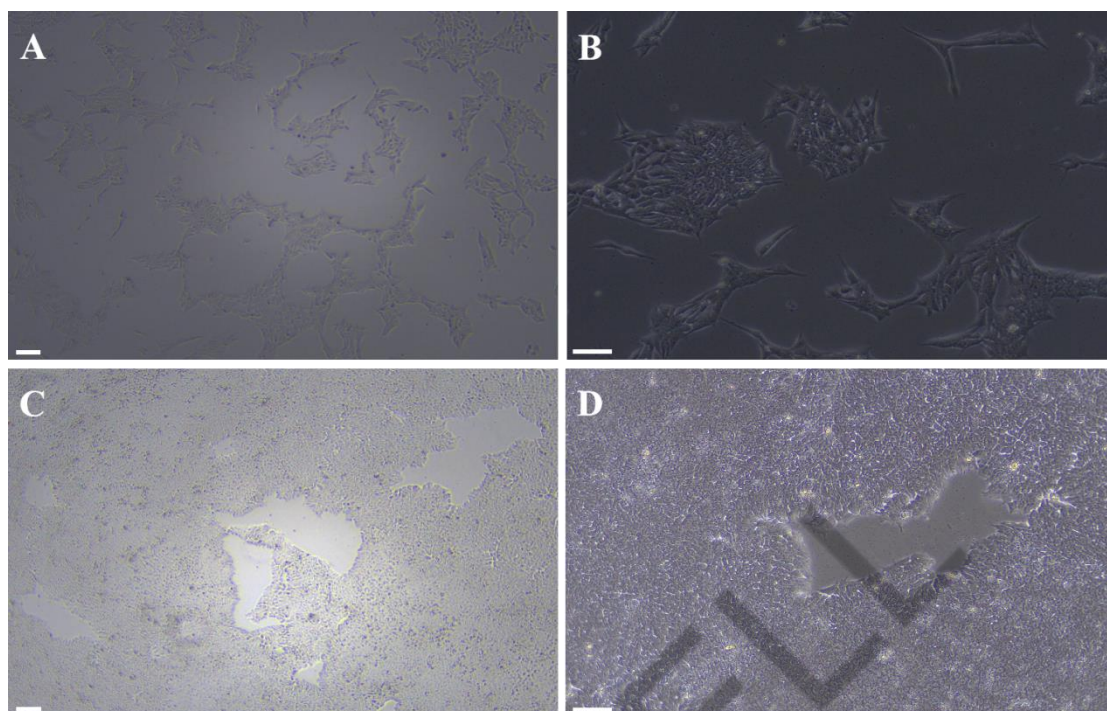


图 1. hESC/iPSC完全培养基连续培养hiPSC细胞形态图：（A）和（C）分别为hESC(H1)细胞培养第 2 和 4 天时低倍镜hESC(H1)培养形态图示，（B）和（D）为培养至第 2 和 4 天时的高倍镜hESC(H1)培养形态图。

#### 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。



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

7. 置于 37°C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。

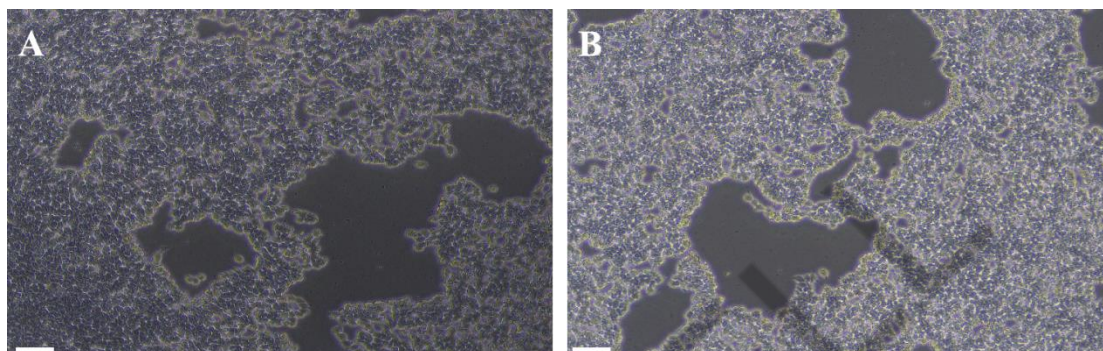


图 2：消化 hESC(H1)细胞不同时间形态图：（A）消化 5 min 低倍镜 hESC(H1)培养的的形态图；（B）消化 6 min 低倍镜 hESC(H1)培养的的形态图。

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°C，5% CO<sub>2</sub> 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。

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。

### 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(B-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 1 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 5-7 min (可参考“三 (2)、传代 hESC/iPSC”步骤)。
6. 消化结束, 轻轻取出培养板, 吸弃 hESC/iPSC Passage Solution。
7. 混匀含有终浓度为 10uM 的 hESC/iPSC Supplement C 的 hESC/iPSC Cryopreservation Solution, 每孔加入 1 mL, 轻柔吹打, 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。

### 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。

