

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，或在 2° C 至 8° C 下解冻过夜，**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 2° C 至 8° 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。
- 使用前，将当天所需的完全培养基在室温下预热至不再感觉冰凉。或者，可将当天使用的小份培养基在 37° C 水浴中预热至不再感觉冰凉。避免在 37° C 下长时间放置。复溶后，完全培养基可分装并在 -5° C 至 -20° C 下储存长达 6 个月。或者，可将补剂分装成使用量大小的小份，并在 -5 至 -20° C 下冷冻储存长达 6 个月。避免多次冻融循环。

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	450 mL	90mL	45 mL
hESC/iPSC Growth Supplements A	50 mL	10 mL	5 mL

可根据实际用量将 hESC/iPSC Growth Supplements A 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 冻融总次数不能超过 2 次。

2) 基质胶铺板（以包被 6 孔板为例）

A. 分装基质胶（IMV-A026）

- 基质胶建议铺板浓度为 $1 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ ，以六孔板为例，六孔板一孔底面积约为 10cm^2 ，铺板所需基质胶为 $10\mu\text{L}$ ，一般按包被四个六孔板的量分装基质胶，即 $240\mu\text{L}/\text{管}$ ，5mL 基质胶可以分装约 21 管。

2. 准备 21 个无菌 1.5 mL EP 管，标记基质胶日期、操作人；1mL 无菌吸头；EP 管架，均置于 -20℃ 冰箱中预冷 1 小时。

3. 将基质胶放置 4℃ 冰箱过夜解冻，当基质胶完全解冻即可开始分装。

注：在解冻时，将基质胶放置冰箱内侧角落，切勿放在靠近冰箱门附近。

4. 准备一个装满碎冰的冰盒，将解冻过的基质胶、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. 混匀基质胶，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. 将分装后的基质胶置于 -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，标记基质胶批号、日期和操作人。

2. 1 mL 无菌吸头置于 -20℃ 冰箱中预冷 1 小时，取出一支冷冻的基质胶（240 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，将解冻过的基质胶、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基质胶（240 μ L）加入 1 mL 冷的 DMEM/F12 并反复吹打解冻混匀。

5. 吸出已解冻混匀的基质胶加入离心管中剩余的 DMEM/F12，使用 10 mL 移液管再次反复吹打约 20 次，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。

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℃；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℃）。

2. 取 2 mL hESC/iPSC 完全培养基，加入 4 μ L hESC/iPSC Supplement C 终浓度为 10 μ M，取 9 mL 含有 hESC/iPSC Supplement C 的 DMEM/F12，加入 18 μ L hESC/iPSC Supplement C 使终浓度为 10 μ M，恢复至室温（15-30℃）。

注意：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 10mL DMEM/F12，过程中轻柔晃动混匀细胞，160g 离心 5 min。

5. 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，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。

6. 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。

注：水平十字摇匀 3 次，左右两次+上下两次算一次

7. 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）	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）

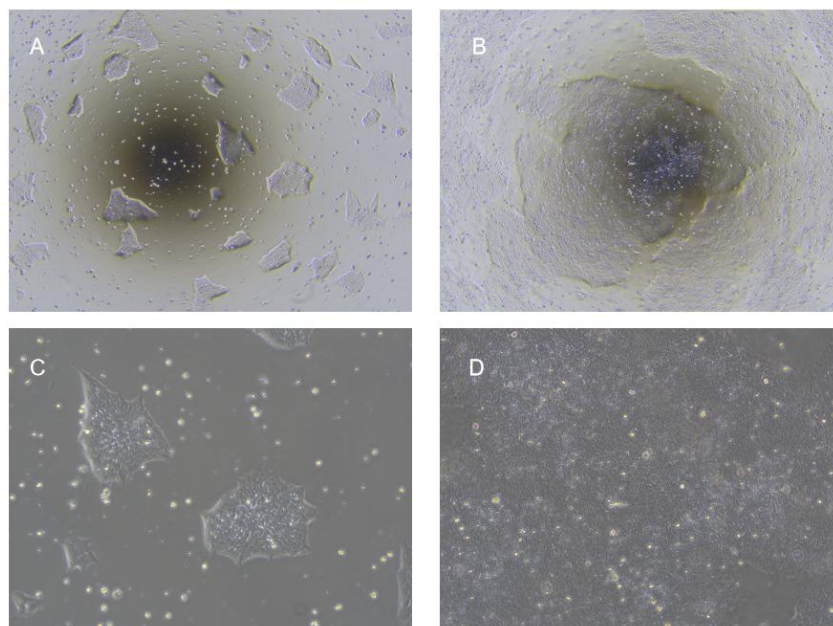


图 1. hESC/iPSC 完全培养基连续培养 hiPSC 细胞形态图：（A）和（B）分别为 hiPSC 细胞培养第 2 和 4 天时低倍镜 hiPSC 培养形态图示，（C）和（D）为培养至第 2 和 4 天时的高倍镜 hiPSC 培养形态图。

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 细胞汇合度较高，集落变得过于密集或过大；③细胞集落分化增多。

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(B-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，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. 将孔内培养基吸取，加入 1 mL/孔的 DPBS（不含钙镁），轻轻摇晃并吸取。
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 5-6 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；hiPSC 细胞不能长时间处于 hESC/iPSC Passage Solution（<10min）。

- 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。

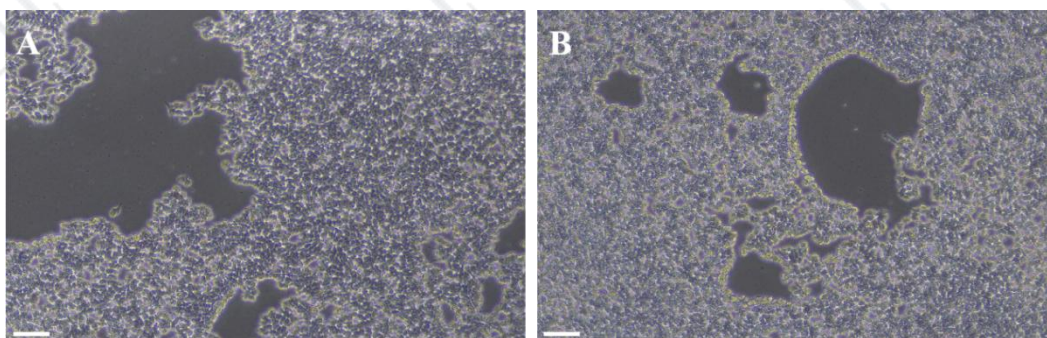


图 2：消化 hiPSC 细胞不同时间形态图：（A）消化 5 min 低倍镜 hiPSC 培养的的形态图；（B）消化 6 min 低倍镜 hiPSC 培养的形态图。

8. 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。
9. 及时加入 2 mL/孔预温的 hESC/iPSC 完全培养基+hESC/iPSC Supplement C，快速轻柔吹打，利用枪头中的培养基吹打一次后，吸悬液再吹打一次，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）。

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）。

10. 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。

11. 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。

12. 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。

13. 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。

注：传代后隔天算第一天

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，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 1 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“三（2）、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. 摇匀含有终浓度为 10uM 的 hESC/iPSC Supplement C 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。