

hES/hiPS 细胞传代复苏及冻存说明书

V2.0 版本，更新日期：2022 年 11 月 17 日

说明：

推荐使用赛贝公司PSCeasy或者PGM1人多潜能干细胞系列培养基进行细胞操作。

相关产品配置流程详见具体产品的说明书。



扫描二维码，关注微信公众号即可查看[产品说明书](#)、[视频教程](#)、[产品相关论文下载](#)

(如果您有什么其他问题，可联系相关销售或拨打下方联系电话咨询)

联系电话：010—69737398

试剂准备：

- PSCeasy®人多潜能干细胞完全培养基：室温解冻PSCeasy®人多潜能干细胞添加剂，吹打混匀，随后将添加剂加入PSCeasy®人多潜能干细胞基础培养基形成PSCeasy®完全培养基。PSCeasy®人多潜能干细胞完全培养基可在2 ~ 8℃稳定储存4周。
- PSCeasy®人多潜能干细胞铺底工作液包被培养皿/瓶：
往培养皿/瓶中添加工作液至完全覆盖皿/瓶底，37℃包被过夜备用。包被好的培养皿/瓶，如果暂时不用，可用PARAFILM封口后2 ~ 8℃储存，并于1周内使用，保存期间，PSCeasy®人多潜能干细胞铺底工作液需始终保持完全覆盖皿底。

细胞传代

细胞传代条件：

当满足以下条件之一时需要传代：

- 干细胞汇合度达到80%以上；
- 干细胞集落过大，中央细胞生长不良；
- 干细胞集落边缘有开始分化的迹象。

细胞传代比例：

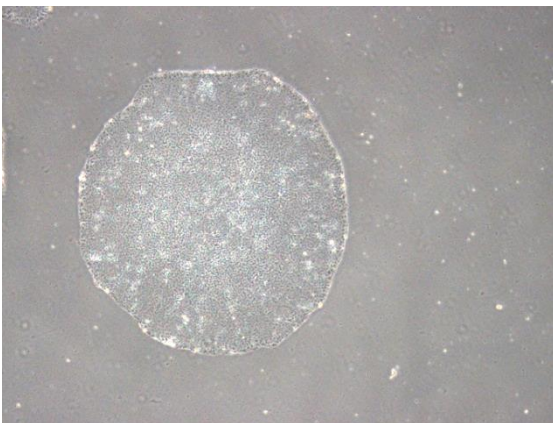
- 通常初次培养前几代的干细胞需要以较低的比例传代，如1:3；后面可以按照1:4 ~ 1:6的比例传代，传代比例由细胞株的生长速率决定。
- 比较理想的传代时间间隔是3 ~ 6天一次。

细胞传代操作流程：

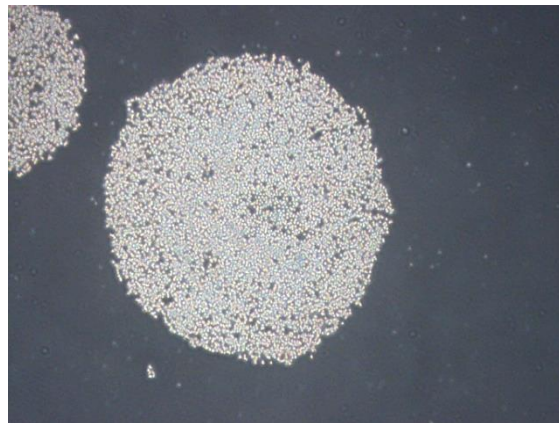
1. 取适量PSCeasy®人多潜能干细胞铺底工作液加入培养皿/瓶，进行包被，37度过夜
2. 将PSCeasy®人多潜能干细胞完全培养基取出并平衡至室温，取出包被好铺底工作液的培养皿/瓶，吸去包被液并加入适量PSCeasy®人多潜能干细胞完全培养基，置于37℃恒温CO₂细胞培养箱中。

注：初次进行传代操作的客户，建议将其中一个孔加入复苏完全培养基

3. 吸走待传代细胞培养皿/瓶中的PSCeasy®人多潜能干细胞完全培养基，并且加入**无钙镁**的PBS溶液洗一次。
4. 加入PSCeasy®人多潜能干细胞消化液使之完全覆盖皿/瓶底。
5. 37℃恒温CO₂细胞培养箱中孵育4~6分钟，显微镜下观察到大部分克隆边缘开始脱离皿/瓶底，克隆内部大部分细胞间出现较为明显的间隙，肉眼观察到细胞集落变得不透明且发白，表明细胞消化时间理想。
6. 吸去消化液，即刻加入新鲜的PSCeasy®人多潜能干细胞完全培养基，用移液器**扇形**吹打培养皿/瓶底，使皿/瓶底贴附的干细胞集落脱落，轻柔缓慢吹吸混匀。



消化前



消化终点

注：吹吸的力度要轻柔，吹打脱落和吹吸混匀的次数总共不超过10次为宜。吹打过度导致大量单细胞出现是造成细胞分化或死亡的重要原因。

注：如有少量细胞无法从皿底脱落，属于正常现象。如有大量细胞无法从皿底脱落，需延长消化时间。

7. 按照传代比例吸取适量细胞悬液加入已准备好的培养皿/瓶中。
8. 显微镜下观察细胞呈4~20个细胞大小的团块，水平十字摇匀。**于室温放置10~15分钟。**
9. 显微镜下观察到大部分克隆贴在皿底后将细胞置于37℃恒温CO₂细胞培养箱培养。
10. 每天换液直至达到可以传代的标准。

细胞冻存

细胞冻存操作流程:

1. 将准备冻存的细胞取出,吸走待传代细胞培养皿/瓶中的PSCeasy®人多潜能干细胞完全培养基,并且加入**无钙镁**的PBS溶液洗一次。
2. 加入PSCeasy®人多潜能干细胞消化液使之完全覆盖皿/瓶底。
3. 37℃恒温CO₂细胞培养箱中孵育4~6分钟,显微镜下观察到大部分克隆边缘开始脱离皿/瓶底,克隆内部大部分细胞间出现较为明显的间隙,肉眼观察到细胞集落变得不透明且发白,表明细胞消化时间理想。
4. 吸去消化液,加入PSCeasy培养基轻柔吹打细胞于皿底呈小团块脱落,吸取细胞悬液加入15 mL离心管中200 g,离心5分钟,弃上清后用**FrozenEasy无血清冻存液 (CA1013100)**重悬细胞

注:吹吸的力度要轻柔,吹打脱落和吹吸混匀的次数总共不超过10次为宜。吹打过度导致大量单细胞出现是造成细胞分化或死亡的重要原因。

注:如有少量细胞无法从皿底脱落,属于正常现象。如有大量细胞无法从皿底脱落,需延长消化时间。

5. 按照复苏所需要的量, $1 \sim 5 \times 10^6$ /mL, 每管1mL冻存。
6. 直接转移到-80℃冰箱。
7. -80℃过夜后,将冻存细胞转移至液氮保存。

细胞复苏**细胞复苏操作流程:**

1. 将PSCeasy®人多潜能干细胞复苏完全培养基取出并平衡至室温;取出包被过PSCeasy®人多潜能干细胞铺底工作液的培养皿/瓶,吸去包被液并加入适量PSCeasy®人多潜能干细胞复苏完全培养基,置于37℃恒温CO₂细胞培养箱中。
2. 37℃水浴解冻细胞,小心摇晃使细胞融化至仅剩一小块冰晶,迅速取出并用75%酒精消毒冻存管外表面,转移至无菌操作台中。
3. 将细胞悬液转移至新的15mL离心管中,缓慢加入4mL PSCeasy®人多潜能干细胞完全培养基,轻柔吹吸2次混匀。
4. 200g离心5分钟。
5. 弃上清,加入适量PSCeasy®人多潜能干细胞复苏完全培养基重悬细胞,轻柔吹吸2次混匀,并接种到准备好的培养皿中,显微镜下观察细胞呈4~10个细胞大小的团块。
6. 水平十字摇匀,于室温放置10~15分钟。显微镜下观察到大部分克隆贴在皿底后,37℃恒温CO₂细胞培养箱中培养24小时。

7. 弃掉PSCeasy®人多潜能干细胞复苏完全培养基，加入新鲜的PSCeasy®人多潜能干细胞完全培养基继续培养，每天更换新鲜的PSCeasy®人多潜能干细胞完全培养基。

疑难解答：

• 细胞复苏率低是什么原因？

细胞复苏需使用PSCeasy®人多潜能干细胞复苏培养基，可大大提高细胞的复苏效率。复苏过程中，转移细胞、吹打混匀和重悬细胞时，吹打力度要轻柔，并尽量减少吹打次数，细胞接种后，即刻在镜下观察细胞团块的大小，4 ~ 10个细胞的团块为最佳。如果吹打力度过大或次数过多，导致细胞分散成单细胞，细胞复苏率将偏低。

• 是否能在37℃反复水浴PSCeasy®完全培养基？

不推荐。频繁地在4℃和37℃之间转换会导致PSCeasy®完全培养基中含有的因子失活，PSCeasy®完全培养基在使用前放置至室温即可。

• 是否能用dispase酶或者胶原酶进行传代？

在PSCeasy®培养体系中培养的人iPSC需用非酶的温和消化方式传代，用dispase酶或者胶原酶消化细胞会对细胞造成伤害，影响传代后细胞的存活率和贴壁率。

• 细胞消化后成了单细胞是什么原因？

人iPSC消化成小克隆（4个以上20个以下的细胞聚集）进行传代最为适宜，消化为单细胞会短暂影响细胞的状态。造成细胞消化成单细胞的原因有：

1. PSCeasy®人多潜能干细胞消化液消化过度，需减短消化时间。
2. 对细胞悬液吹吸的力度过重，或次数过多，需缓慢吸液与吹液，每皿/瓶的吹吸次数控制在10次以下。

• 人ESC/iPSC在传代后不贴壁怎么解决？

造成人ESC/iPSC传代后不贴壁的最可能的原因：

1. 细胞消化时间不合适 2) 消化后吹打次数不合适，使得完成传代后细胞集落过大或过小。
2. 消化时间不合适，把细胞强行吹打下来。

• 人ESC/iPSC分化怎么处理？

1. 细胞在刚复苏或传代时，小的细胞团不呈现标准的克隆形态，培养几天或传代后可恢复；
2. 如果人ESC/iPSC分化的表现为干细胞克隆形态良好，克隆周边出现散在的分化细胞，可通过高比例传代（ $\geq 1:6$ ），使得分化细胞的密度减少，低密度的分化细胞可被PSCeasy®培养体系筛选去除，如未完全去除，可用细胞刮或巴斯德管刮除；

3. 如果人ESC/iPSC分化的表现为克隆内部松散，边缘不平滑，在分化比例小或分化不严重的情况下，可通过连续传代2 ~ 3次恢复，如果分化严重，建议弃除。