

人诱导多能干细胞 (hiPSC) 说明书

V6.0 版本, 更新日期: 2022 年 11 月 17 日

货号: 参见细胞管标签或COA

规格: 1×10^6

储存条件: 液氮储存

产品简介:

赛贝生物 (Cellapy) 提供的人诱导多能干细胞 (hiPSC) 是由人体细胞 (皮

肤成纤维、尿液上皮或血液单个核细胞) 通过非整合的方法诱导获得。hiPS细胞在无饲养层、化学成分明确、并且无动物源成分的PSCeasy[®]人多潜能干细胞培养体系中培养, 适合临床级的干细胞研究和应用。hiPSC在PSCeasy[®]人多潜能干细胞培养体系中可以长期稳定快速增殖, 具有高度近似hESC的克隆形态和基因表达, 长期维持正常核型, 并在体内外具有三胚层分化潜能。

产品内容:

组分代码	名称	规格	数量	储存条件
参见细胞管标签或 COA	人诱导多能干细胞 (hiPSC)	1×10^6	2 支	液氮
CA1002008	PSCeasy [®] 人多潜能干细胞复苏培养基	10 mL	2 瓶	-20°C

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 (每0.7mL添加剂与50mL基础培养基混合)。PSCeasy[®]人多潜能干细胞完全培养基可在2 ~ 8°C稳定储存4周。

注: PSCeasy[®]人多潜能干细胞培养基添加剂需在室温解冻。

以我公司PSCeasy体系为例, 说明细胞的复苏、传代及冻存操作流程

注: 对于初次培养hiPS细胞的用户来说, 本细胞的培养有一定的难度, 请阅读本说明书并按照内容进行复苏、培养。

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;



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

- 干细胞集落边缘有开始分化的迹象。

细胞传代比例：

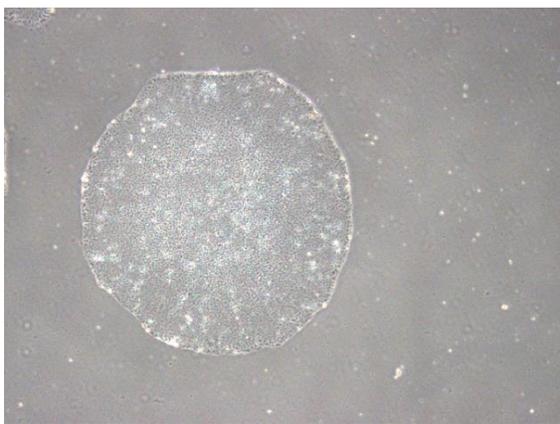
- 通常初次培养前几代的干细胞需要以较低的比例传代，如1:3；后面可以按照1:4 ~ 1:6的比例传代，传代的比例由细胞株的生长速率决定。
- 比较理想的传代时间间隔是3 ~ 6天一次。

细胞传代操作流程：

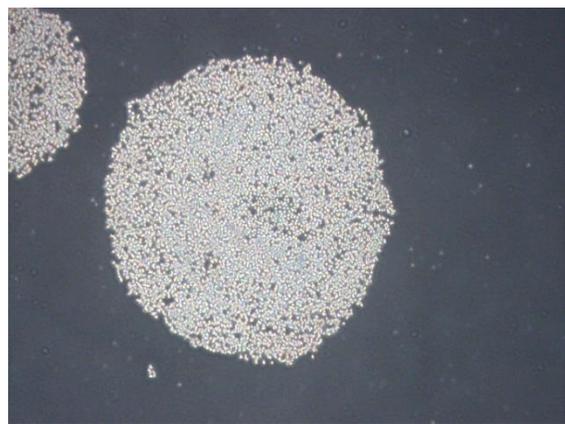
1. 将PSCeasy®人多潜能干细胞完全培养基取出并平衡至室温，取出包被好Matrigel的培养皿/瓶，吸去包被液并加入适量PSCeasy®人多潜能干细胞完全培养基，置于37℃恒温CO₂细胞培养箱中。

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

2. 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。
3. 加入PSCeasy®人多潜能干细胞消化液使之完全覆盖皿/瓶底。
4. 37℃恒温CO₂细胞培养箱中孵育5 ~ 10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。
5. 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。

6. 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。

7. 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。
8. 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。
9. 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，弃去培养皿/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5 ~ 10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， $1\sim5\times 10^6$ /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。

- **培养基中有沉淀状物质是否是质量问题？**

添加剂在解冻过程中，会有少量沉淀析出，属于正常现象，不影响使用，请充分混匀后与基础培养基混合。但添加剂不能在37℃解冻，否则会析出大量沉淀，影响培养基的效价。如果培养基中出现大量沉淀，请不要使用。

- **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. 细胞消化时间过长，细胞消化过度；
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；
3. 消化时间过短，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。