

人诱导多能干细胞（绿荧光）hiPSC-GFP-AAVS1 说明书

V2.0 版本，更新日期：2022 年 11 月 17 日

货号：CA4020106

规格： 1×10^6

储存条件：液氮储存

产品简介：



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

赛贝生物 (Cellapy) 提供的人诱导

多能干细胞（带绿色荧光）

(hiPSC-GFP-AAVS1) 是由人体细胞通过非整合的方法诱导获得，再经过基因编辑插入GFP构建得到的报告工具细胞系。hiPSC-GFP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，适合科学研究中干细胞研究和应用。hiPSC-GFP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
CA4020106	人诱导多能干细胞（绿荧光）hiPSC-GFP-AAVS1	1×10^6	2 支	液氮
CA1002008	PSCeasy®人多潜能干细胞复苏完全培养基	10 mL	2 瓶	-20℃

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。

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

细胞传代

细胞传代条件：

当满足以下条件之一时需要进行传代：

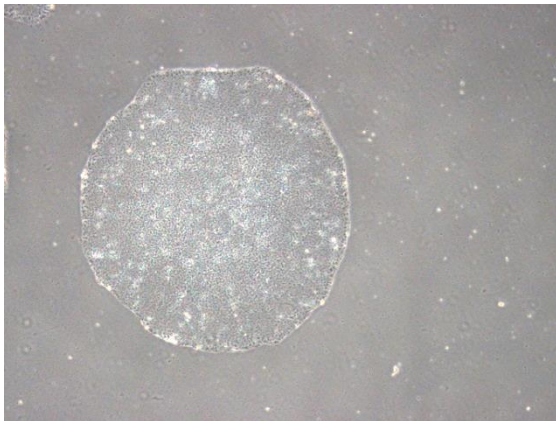
- 干细胞汇合度达到80%以上；
- 干细胞集落过大，中央细胞生长不良；
- 干细胞集落边缘有开始分化的迹象。

细胞传代比例：

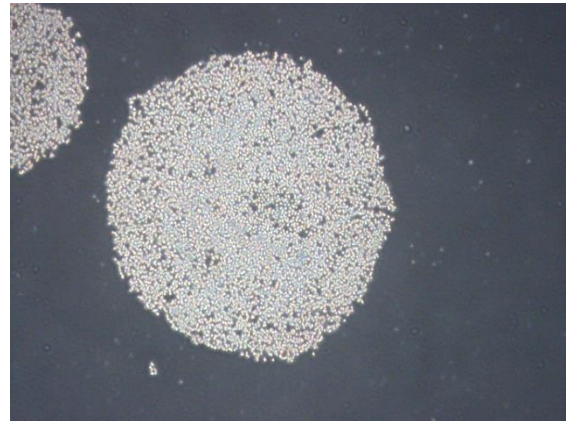
- 通常初次培养前几代的干细胞需要以较低的比例传代，如1:3；后面可以按照1:4 ~ 1:6的比例传代，传代的比例由细胞株的生长速率决定。
- 比较理想的传代时间间隔是3 ~ 6天一次。

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®人多潜能干细胞完全培养基，置于37℃恒温CO₂细胞培养箱中。
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。
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, 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。

- **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。