

人多能干细胞培养基 (ips)**说明书**

名 称	人多能干细胞培养基 (ips)
英 文	Human Pluripotent Stem Cell Culture Medium (ips)
货 号	J10001-3
规 格	基础 400ml, 添加物 100ml
保 存	基础 2~8℃, 添加物 -20℃; 混合后 2~8℃保存; 12 个月
用 途	仅供科研使用

【产品描述】

人多能干细胞培养基是本公司研发生产的一款营养成分更丰富, 适用于大多数多能细胞系培养, 且适用于 iPS 建系。该培养基适用于 mTeSR 培养系统, 为无滋养层培养、无血清、化学成分明确。可应用于干细胞传代, 内含干细胞保护因子, 防止细胞的凋亡、分化, 对细胞具有良好的保护作用。

本产品与 mTeSR 体系对标, 细胞增殖与形态无差异; 营养更丰富, 适用于大多数细胞系培养, 且适用重编程过程细胞培养; 无需滋养层细胞, 成分明确, 批间差异小; 降低各类病毒、霉菌和支原体等的污染风险。

【操作说明】

准备工作:

- (1) 2~8℃解冻人多能干细胞培养基-添加剂, 融化后上下晃动混匀, 按实际用量进行分装, 立即使用或储存于 -20~-80℃, 避免反复冻融;
- (2) 按 1:4 的比例将人多能干细胞培养基-添加剂 (100mL) 加入到人多能干细胞培养基-基础 (400mL) 中, 混合均匀即成为人多能干细胞培养基。混匀后的人多能干细胞培养基可在 2~8℃ 稳定储存 2~3 周, 不建议使用配制已超过 3 周的人多能干细胞培养基。
- (3) 实验试剂平衡: 人多能干细胞培养基实验前放置室温避光平衡; PBS, 消化液等 37℃加热。

注意: 培养基中含有因子, 不要 37℃水浴加热。

一、操作步骤

1.1、基质胶包被培养板：取出 6 孔板/12 孔板，每孔内加入 1 mL/0.5 mL 即用型基质胶（CSP210），轻轻晃动 6 孔板/12 孔板使基质胶完全覆盖皿底，置于 37°C 培养箱中孵育 1h~2h，实验前拿出并置于超净工作台/生物安全柜中室温下平衡 20min。如果暂时不用，可用 Parafilm 封口后 2-8°C 储存，并于 1 周内使用。

注意：①一支冻存的干细胞的数量在 1×10^6 cells/mL 左右，对应 6 孔板 1 孔；

②即用型基质胶对温度敏感，即用即拿，用完后立即放回 4°C 冰箱保存，且勿用手直接接触基质胶液面所及的瓶身，影响基质胶质量。

1.2、先将 2~3mL 的干细胞培养基加入 15mL 离心管中备用。

1.3、解冻：将从液氮中取出的冻存管快速浸入 37°C 温水中，快速摇动，使其在 1~2min 内快速解冻；

注意：细胞从液氮中拿出的速度要快，尽量减少其暴露在室温中的时间。

1.4、离心：冻存管中的冻存液解冻后，将其逐滴加入含有干细胞培养基的 15mL 离心管中，将 15mL 离心管置于低速离心机中配平平衡后，1200rpm 离心 3min；

1.5、重悬：离心后弃上清加 1mL 人多能干细胞培养基对干细胞沉淀进行吹吸混匀，吹吸 3~5 次左右。

1.6、接种：吹吸均匀后，将已经平衡好的即用型基质胶弃掉，将吹打均匀的干细胞悬液加入到已经包被好的 6 孔板中，并补全每孔 2mL 培养体系。

1.7、培养：接种后的 6 孔板可以置于倒置相差显微镜下观察接种的干细胞密度以及细胞团块大小，呈 4 个细胞以上的团块较合格，水平十字轻轻晃动 6 孔板/12 孔板使细胞均匀分布。并置于 37°C，5% CO₂ 的恒温培养箱培养，第 2 天观察细胞贴壁情况；

1.8、换液：从复苏的时间开始每 24h 换液一次。

注意：因培养基中活性成分只足够维持一天，所以每 24h 应及时更换新鲜培养基。

二、传代

2.1、清洗：吸掉原有培养基，贴壁缓慢加入 1 mL PBS 缓冲液并轻轻晃动，然后沿培养皿边缘吸去 PBS 缓冲液；

2.2、消化：在 6 孔板中加入 2mL/孔人多能干细胞消化液（CSP215）使之覆盖皿底，并置于 37°C 培养箱中 2~5 min；

注意：消化时间依据干细胞生长密度，消化时间略有不同，根据经验一般建议时间 2-5min。消化过程中可以拿到倒置显微镜下观察细胞消化情况，若在显微镜下观察到大

部分克隆边缘以及克隆内部细胞间出现间隙，即可吸掉消化液终止消化。

2.3. 吹打：吸掉消化液后，加入 2mL 人多能干细胞培养基，用移液枪扇形吹打培养皿底，轻柔吹打 3~5 次，使皿底干细胞集落脱落，并将其并转移到 15mL 离心管中；

注意：吹吸皿底细胞的力度要轻柔，吹打脱落和吹吸混匀的次数在 3~5 次为宜，尽量避免形成单细胞。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。

2.4. 离心：1200rpm 离心 3min；

2.5. 接种：弃上清，用干细胞培养基吹打细胞 5-10 次，吸掉包被培养板中的基质胶，并将细胞悬液加入到培养板中，且补全每孔 2mL 的培养体系。

注意：吹打细胞要温柔，并且吹打次数不要超过 10 次

2.6. 换液：从传代的时间开始每 24h 换液一次。

注意：因培养基中活性成分只足够维持一天，所以每 24h 应及时更换新鲜培养基。

三、冻存

3.1. 清洗：同 2.1；

3.2. 消化：同 2.2；

3.3. 吹打：同 2.3；

3.4. 离心：同 2.4；

3.5. 重悬：离心后弃上清，加入 2mL ES/iPS 细胞冻存液（CSP193）对干细胞沉淀进行吹吸混匀，吹吸 3~5 次后，将其加入到冻存管中；

注意：冻存液即用即拿，及时放回 4℃冰箱。

3.6. 记录：在冻存管上标记冻存细胞种类、时间、操作者及细胞批次。

3.7. -80℃冰箱冻存：冻存管置于-80℃冰箱过夜。

注意：冻存管放置于-80℃冰箱时，要将冻存管直立放置，切忌冻存管斜放或横放。

3.8. 液氮冻存：24 小时后将-80℃冰箱中的细胞转移至液氮中长期冻存。

【注意事项】

- 1、注意无菌操作，避免污染；
- 2、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作；
- 3、仅供科研使用。