

hiPSC/hESC 培养基-NcTarget

使用说明书

一、产品简介

NcTarget™ hPSC Medium 是一种适用于无饲养层培养，成分明确的人多能干细胞（hESC/hiPSC）无血清培养基。hESC/hiPSC 在 NcTarget™ hPSC Medium 中可以快速增殖，而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。

二、产品信息

表 1: NcTarget™ hPSC Medium 产品说明

产品信息	货号	规格	储存条件
NcTarget™ hPSC Medium 包含:	RP01020	1 Kit	*
NcTarget™ hPSC Medium Basal Medium	RP01020-1	400 mL	2-8 °C
NcTarget™ hPSC Medium Supplement A	RP01020-A	20 mL	-80°C 或 -20°C
NcTarget™ hPSC Medium Supplement B	RP01020-B	80 mL	

*将基础液和添加物混匀配置成完全培养基，可在 2-8 °C 中存储，2 周内用完。

三、试剂材料

表 2: 试剂&材料

试剂&材料	品牌 (e.g.)	货号 (e.g.)
NcTarget™ hPSC Medium	首宁生物	RP01020
hPSC Cryopreservation Medium	首宁生物	RP01003
hPSC Dissociation Buffer(EDTA传代工作液)	首宁生物	RP01007
Blebbistatin (10mM)	首宁生物	RP01008
DMEM/F12培养基	Thermo Sci.	11330
6孔板	Thermo Sci.	140685
1 mL/5 mL/10 mL/25 mL移液管	Thermo Sci.	N/A
15 mL/50 mL离心管	Thermo Sci.	N/A
1.5/2 mL冻存管	Thermo Sci.	N/A
梯度程序降温盒	Thermo Sci.	5100-0001

四、试剂准备

(一) NcTarget hPSC 完全培养基配制 (500 mL)

1. 在 4 °C 解冻 **NcTarget Supplement A/B**，不要在 37 °C 条件下解冻。
2. 参考表 3 在生物安全柜中，使用无菌移液管混匀下列成份配制成完全培养基。完全培养基可置于 4 °C 储存，2 周内使用。

表 3: NcTarget™ hPSC Medium-配置说明*

组分	500 mL 完全培养基	100 mL 完全培养基	50 mL 完全培养基
NcTarget™ hPSC Medium Basal Medium	400 mL	80 mL	40 mL
NcTarget™ hPSC Medium Supplement A	20 mL	4 mL	2 mL
NcTarget™ hPSC Medium Supplement B	80 mL	16 mL	8 mL

*可根据实际用量将 NcTarget Supplement A/B 分装后冷冻保存。具体配置比例可参考表 3 的配置说明。

NcTarget Supplement A/B 冻融总次数不能超过 2 次。

(二) Matrigel 培养板包被 (以 Corning® Matrigel® 包被 6 孔板为例，操作程序同样适用于其他培养容器)

A. 分装 Matrigel

1. 根据收到的 Matrigel 批号查询此批号 Matrigel 的浓度；根据使用浓度和包被面积计算分装体积和数量。

示例：用于 hPSC 培养，Matrigel 推荐包被浓度为 0.013 mg/cm²，即 0.75 mg 包被一个六孔板。如 Matrigel 浓度为 11.3 mg/mL (10 mL)，分装 3mg/管 (足够包被 4 个六孔板)。分装体积 (每管) = 3 mg / 11.3 mg/mL = 0.265 mL。分装数量 = 10 mL / 0.265 mL = 37.74。

2. 准备 38 个无菌 1.5 mL EP 管，标记 Matrigel 批号、浓度、日期、操作人 ID；1000μL 无菌吸头；EP 管架，均置于 -20 °C 冰箱中预冷 1 h。

Tips: 货号 354277 的 Matrigel (hESC-Qualified Matrigel)，操作说明中不标注蛋白浓度，而是以 **Dilution Factor** 表示，如某批次的推荐 Dilution Factor 为 238μL，则表明 238 μL 可包被 4 块 6 孔板，分装数量 = 5 mL / 0.238 = 21.01。

3. 将 Matrigel 放置 4 °C 冰箱过夜解冻，当 Matrigel 完全解冻即可开始分装。
Tips: Matrigel 仅在 4 °C 条件下呈液态，如果冰箱温度波动频繁，Matrigel 可能不呈液态。
4. 准备一个装满碎冰的冰盒，将解冻过的 Matrigel、预冷的 1.5 mL EP 管及 EP 管架、1000 μL 吸头放置于冰盒上。
5. 混匀 Matrigel，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 Matrigel 置于 -20 °C 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 Matrigel、批号、日期和操作人 ID。
2. 1000 μ L 无菌吸头置于-20 $^{\circ}$ C冰箱中预冷 1 h，取出一支冷冻的 Matrigel (3 mg) 置于 4 $^{\circ}$ C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 Matrigel、预冷的 1000 μ L 吸头放置于冰盒上。
4. 用预冷的吸头将解冻过的Matrigel (3 mg) ，加入 1 mL 的 DMEM/F12 反复吹打解冻并混匀。
5. 吸出已解冻混匀的Matrigel 加入离心管中剩余的 DMEM/F12，使用 10 mL 移液管再次反复吹打混匀。
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 $^{\circ}$ C冷藏过夜，两周内使用。

五、复苏 hPSC (以 6 孔板操作为例，操作程序同样适用于其他培养容器)

1. 将水浴锅预热至 37 $^{\circ}$ C。
2. 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 $^{\circ}$ C) 。
3. 取 4 mL **NcTarget 完全培养基**，按照 1:4000 比例加入 1 μ L 的 **Blebbistatin (10 mM)**，恢复至室温 (15-30 $^{\circ}$ C) 。

Tips: 不要在 37 $^{\circ}$ C水浴锅中预温培养基。

4. 取出 1 支冷冻的细胞置于 37 $^{\circ}$ C水浴锅手持轻轻摇晃，1 min 内解冻，肉眼观察细胞悬液内冰晶即将完全消失时取出。
5. 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，随后逐滴加入 10mL DMEM/F12，过程中轻柔晃动混匀细胞，160 \times g 离心 5 min。
6. 吸弃上清，加入预温的 4 mL 的 **Blebbistatin+ NcTarget 完全培养基**混匀细胞，尽量避免吹打。
7. 吸弃 6 孔板中 2 孔的Matrigel 包被液，将混匀的细胞按照 2 mL/孔接种到 2 孔中。
8. 水平十字摇匀三次，置于 37 $^{\circ}$ 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。
9. 18-24 小时后换新的 **NcTarget 完全培养基**，之后每天更换培养基。

表 4: hPSC 传代&培养操作试剂推荐用量

培养容器	底面积	DPBS(mL)	EDTA传代工作液	hPSC培养基*
6 孔板	9.6 cm ² /孔	2 mL/孔	2 mL/孔	2 mL/孔
12孔板	4.5 cm ² /孔	1 mL/孔	1 mL/孔	1 mL/孔
24孔板	2 cm ² /孔	0.5 mL/孔	0.5 mL/孔	0.5 mL/孔
35mm培养皿	8 cm ²	2 mL	2 mL	2 mL

*hPSC 常规培养时，当细胞汇合度超过 50%，建议换液时可额外添加 50%的培养基；以 6 孔板为例，换液时每孔可添加 3 mL 的培养基，以此类推。

六、传代 hPSC（以 6 孔板，EDTA 消化为例，操作程序同样适用于其他培养容器）

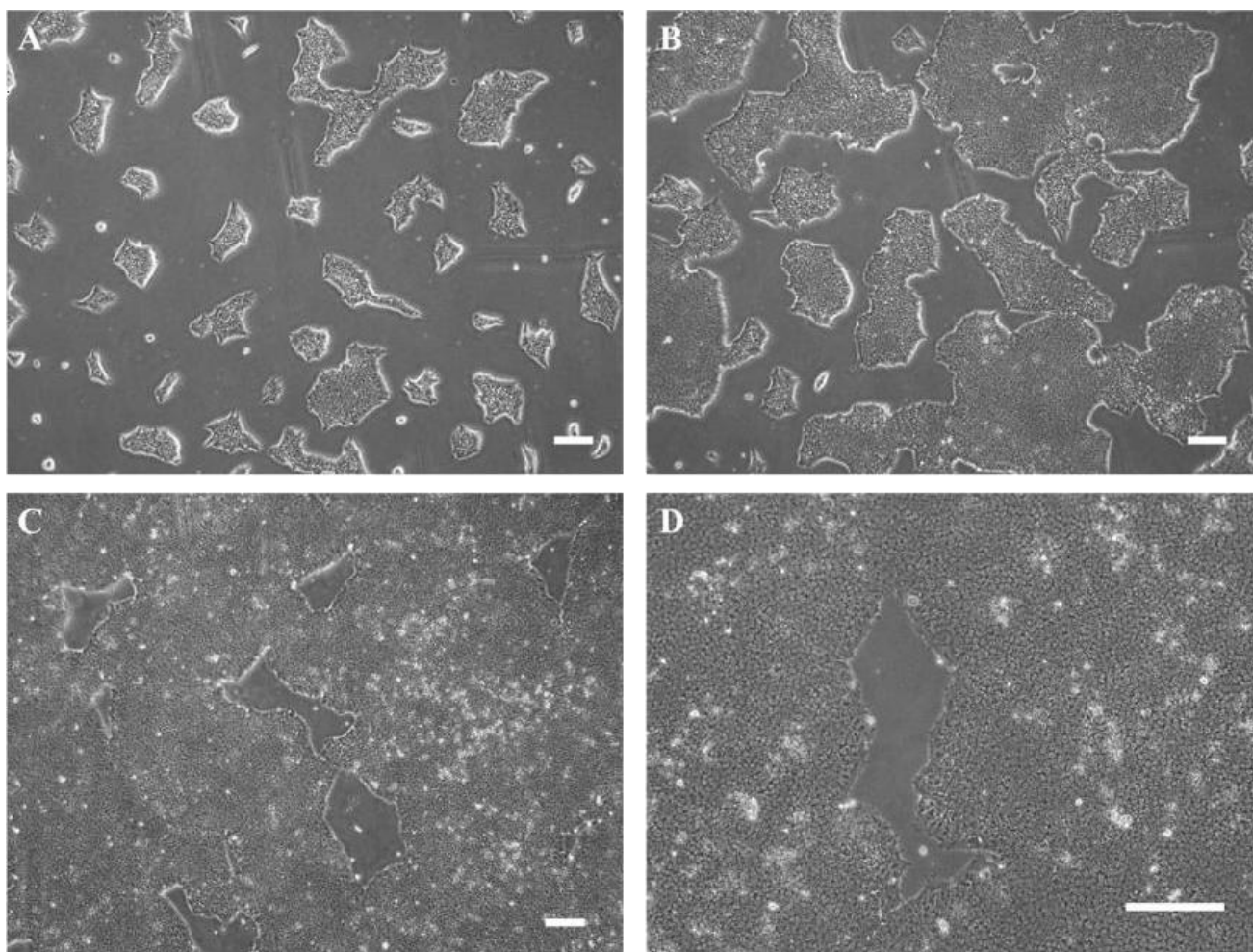


图 1: NcTarget™ hPSC Medium连续培养 hiPSC 细胞形态图示，Matrigel Plate，标尺：200 μm。

A、B、C 分别为培养第 2、3、4 天时，hiPSC 的形态图示，D 为培养至第 4 天时的放大细胞图示。

1. 传代时机的选择:

1.1、细胞汇合度达 85%左右 (**如图 1-C/D 所示**)，一般情况下每 4 天传代一次，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。

1.2、细胞汇合度较低，但干细胞集落过大，中央细胞生长不良。

1.3、满足以上条件之一即需对 iPSC 进行传代。

2. 传代比例：可根据细胞生长状态和实验需要按 1:5~1:20 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-C/D 所示**)，建议按照 1:10 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。

3. 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 (~25 °C)。

4. 根据传代接种的孔数准备 2 mL/孔的 **NcTarget 完全培养基**，并按 1: 4000 比例加入 **Blebbistatin (10 mM)**，恢复至室温 (~25 °C)。

Tips: 2 mL 的 NcTarget 完全培养基加入 0.5 μL Blebbistatin (10 mM)。

5. 将 iPSC 孔内培养基吸弃，加入 2 mL/孔的 DPBS (不含钙镁)，轻轻摇晃并吸弃。

6. 加入 2 mL/孔的 **EDTA 传代工作液**使溶液完全覆盖孔底。

7. 置于 37 °C 培养箱中孵育 7-8 min。

Tips: (1) 消化 7-8 分钟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 (图 2C)，若大部分细胞仍未变亮，则需要延长消化时间 (图 2A&B)。

(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。

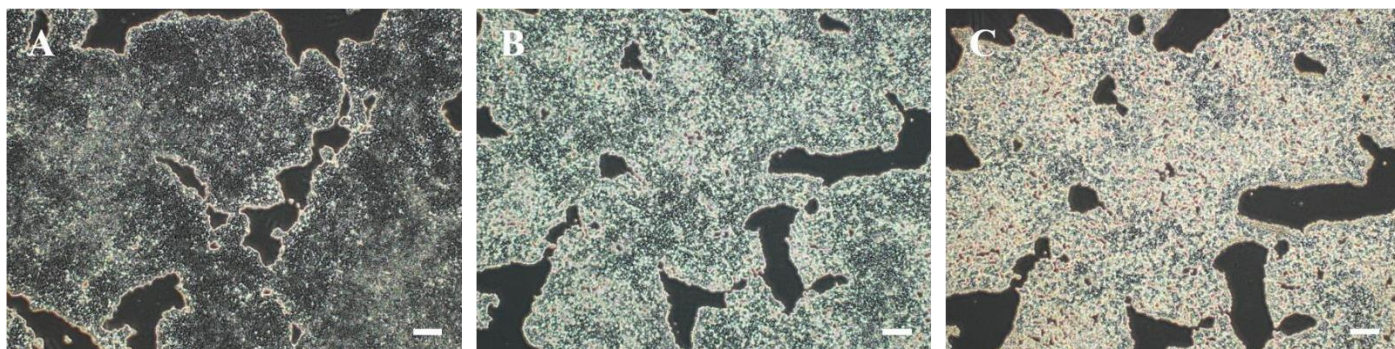


图 2: (A) EDTA 消化 4 min; (B) EDTA 消化 6 min; (C) EDTA 消化 8 min。标尺: 200 μm。

8. 消化结束后轻轻的将培养板拿回生物安全柜，避免震荡摇晃细胞，倾斜吸弃 **EDTA 传代工作液**。

9. 及时加入 2 mL/孔预温的 **Blebbistatin+NcTarget 完全培养基**，水平十字摇晃 6 孔板使细胞脱离基质。

Tips (1) 加入 Blebbistatin +NcTarget 完全培养基时，可轻柔吹打细胞 1-2 次，不能超过 2 次，避免反复吹打。

(2) 避免刮擦细胞，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。

(3) 一次操作不要超过 1 个 6 孔板，当 NcTarget 培养基加入后要快速吸出。EDTA 传代工作液的效果在 NcTarget 培养基加入后会很快被终止，在 NcTarget 培养基加入后细胞又会很快贴壁，而 hPSC 不能长时间处于 EDTA 传代工作液 (<15 min)，所以收集接种细胞时操作必须快速。

10. 接种:

10.1 吸弃 6 孔板中的 Matrigel 溶液, 加入预温的 **Blebbistatin + NcTarget 完全培养基** 2 mL/孔。

10.2 在 6 孔板上标记细胞名称、代次、传代比例、日期、操作人 ID。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。

Tips: 也可将每板传代所需细胞量计得出后, 转移至 15 mL 离心管中与预温的 Blebbistatin+NcTarget 完全培养基中悬浮定容到 12 mL, 再均匀分配到吸弃包被液的 Matrigel 包被 6 孔板中, 以此类推。

11. 水平十字摇匀 6 孔板三次, 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 6 孔板三次, 培养过夜。

12. 18-24 小时后更换新 **NcTarget 完全培养基**, 此后每天换液, 4-5 天后继续传代或冻存 (图 1)。

七、冻存hPSC

1. 当细胞汇合度达 85%左右 (**如图 1-C/D 所示**) 可以收获冻存, 一般 6 孔板可收集 $2-4 \times 10^6$ 个活细胞/孔, 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 ID。

3. 取出 4 °C 冰箱中的 **hPSC 冻存液**, 置于室温预温, **使用前注意摇匀。**

Tips: 冻存液中的 DMSO 易沉积在溶液下部, 如未摇匀可能造成开始用时 DMSO 浓度不够, 后面用的 DMSO 浓度过高, 造成冻存细胞的不稳定。

4. 吸弃 hPSC 培养上清, 加入 2 mL/孔的 DPBS (不含钙镁), 轻轻摇晃数次, 再吸弃。

5. 加入 2 mL/孔的 hPSC 传代工作液, 将细胞置于 37 °C 培养箱中, 计时 7-8 min (参考“六、传代 hPSC, 第 7 条”)。

6. 消化结束, 轻轻取出培养板, 吸弃 EDTA。

7. 摇匀预温的 **hPSC 冻存液**, 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 °C 冰箱中过夜, 次日转入液氮罐中长期保存; 或使用程控降温设备将细胞降至 -80 °C 以下后直接转入液氮储存。

八、其它培养体系中hPSC更换为NcTarget培养条件的适应

其他无饲养层条件培养的 hPSC 可以在细胞状态良好时, 使用原培养基进行细胞传代, 24 小时后更换成混合培养基 (**原培养基与 NcTarget 培养基按照 1:1 混合**) 培养, **培养 2 代后完全换成 NcTarget 培养基培养, 培养 2 - 3 代后可完全适应新的培养体系**, 此时可进行细胞冻存处理。

九、问题及解决方案

➤ hiPSC培养出现分化

- 确保NcTarget完全培养基储存于4℃，并在2周内用完，每次只预温当次实验所需的培养基，减少NcTarget完全培养基的温度变化，避免培养基中的因子效价下降。
- 如hPSC克隆整体形态良好，零星分化细胞（<1%）出现于克隆周边，可以通过EDTA传代去除。
- 确保传代hPSC的细胞团大小均匀，约20个细胞左右的团块为佳；若细胞团较大，可用5mL移液管轻柔吹打不超过3次，力度要轻且均匀，否则细胞受压过大易产生破损、分化。
- 每次观察时避免将细胞从培养箱中取出超过15 min。
- 若hPSC克隆表现为内部松散，边缘不平滑，分化比例超过20%，则建议废弃。

➤ 能否用Dispase或胶原酶传代hPSC

- 可以用Dispase或胶原酶传代，但细胞消化不会太好，影响传代后细胞的存活率，也容易积存分化的细胞。
- NcTarget培养体系中的hPSC建议使用用非酶的温和的消化方式传代。
- 如果实验需要将hPSC消化成单细胞，建议使用Accutase酶消化5-10分钟。

➤ hPSC传代后不贴壁或贴壁率低

- 传代比例不要过高（>1:20）。
- EDTA消化时间不宜过长，部分细胞系可能需要延长消化时间超过8 min，不要超过15 min。
- 避免过度吹打细胞（<3次），以免细胞团被吹散，或对细胞造成损伤。
- 确保培养板已包被Matrigel或其他适合多能干细胞生长的基质成份。
- 确保培养基中加入了ROCKi。

➤ 换液后细胞漂起

- 接种后18-24小时后进行第一次换液，确保细胞已贴壁良好。
- 换液操作要轻柔，避免使细胞团脱离基质。
- 如接种细胞密度很低，e.g.细胞克隆实验，可连续2-3天不换液，保证培养基中含ROCKi。

➤ 孔内hiPSC克隆团分布不均匀

- 确保包被的基质均匀的分布于容器底部。
- 传代接种时确保细胞分散均匀，水平十字摇匀后避免晃动培养板导致细胞聚集于孔的中间部分。
- 再把培养板放置入培养箱时，需再次水平十字摇匀。