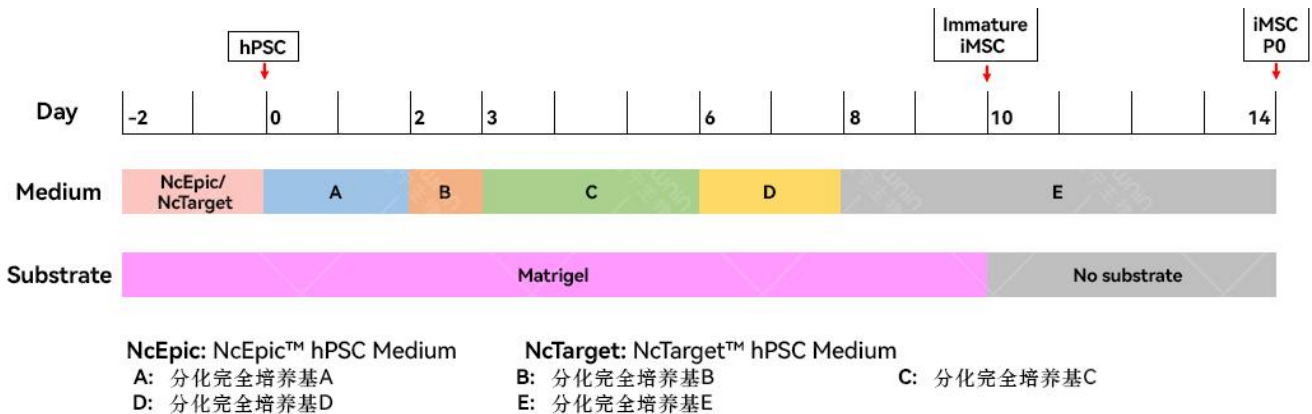


hPSC-间充质干细胞分化试剂盒

使用说明书

一、产品简介

hPSC-间充质干细胞分化试剂盒适用于从人类多能干细胞 (hPSC) 分化为 MSC 使用, 使用该产品能够从 hPSC 有效分化为高纯度的 MSC。MSC 可以稳定增殖, 细胞染色体核型正常、细胞表面因子表达正常 (CD73+/ CD90+/ CD105+, CD14-/ CD34-/ CD45-/ CD79α-/ HLA-DR-), 三系分化潜能 (成骨分化、软骨分化、脂肪分化) 完备等特性。人类多能干细胞来源的 MSC 适用于各种体外实验、药物筛选和安全性评估、以及疾病动物模型细胞移植医疗等方面的研究和应用。



二、产品信息

表 1: hPSC-间充质干细胞分化试剂盒 产品说明

产品信息	货号	规格	储存条件
hPSC-间充质干细胞分化试剂盒*包含:	RP01013	1 Kit	
MSC Differentiation Supplement A (10×)	RP01013-A	0.5 mL	-80℃ 或 -20℃
MSC Differentiation Supplement B (10×)	RP01013-B	0.5 mL	
MSC Differentiation Supplement C (10×)	RP01013-C	1 mL	
MSC Differentiation Supplement D (10×)	RP01013-D	0.5 mL	
MSC Differentiation Supplement E (30×)	RP01013-E	1 mL	
MSC Differentiation Basal Medium F	RP01013-F	55 mL	2-8 °C

*每个试剂盒可获得约 2×10^7 的 P0 代 MSC 细胞。

*将基础培养基和添加物混匀配置成分化完全培养基, 可在 2-8 °C 中存储, 2 周内用完。

三、试剂材料

表 2: 推荐试剂&材料

试剂&材料	品牌 (e.g.)	货号 (e.g.)
NcEpic™ hPSC Medium	首宁生物	RP01001
NcTarget™ hPSC Medium	首宁生物	RP01020
hPSC高效冻存液	首宁生物	SN-06-1210
hPSC Dissociation Buffer	首宁生物	RP01007
Blebbistatin	首宁生物	RP01008
NcMission™ hMSC Medium V3.0	首宁生物	RP02010
hMSC高效冻存液	首宁生物	SN-06-1310
Solase细胞消化液	首宁生物	RP01021
Corning® Matrigel® Matrix	Corning	354277
DMEM/F12培养基	Thermo Sci.	11330
DPBS, no calcium, no magnesium	Thermo Sci.	14190144
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
10 µL/200 µL/1000 µL吸头	Rainin .	N/A
梯度程序降温盒	Thermo Sci.	5100-0001

四、试剂准备

➤ hPSC-间充质干细胞分化完全培养基的配制

1. 在 4℃解冻 MSC Differentiation Supplement A、B、C、D、E，**不要在 37℃条件下解冻**。
2. 在生物安全柜中，参照表 3，使用无菌移液管及枪头混匀配制成**分化完全培养基 A/B/C/D/E**：
3. 分化完全培养基可于使用当天配置，置于 4℃储存，2 周内使用。

Tips: 可根据实际用量将 MSC Differentiation Supplement A、B、C、D、E 分装后冷冻保存。冻融总次数不能超过 2 次。

表 3：人类多能干细胞来源间充质干细胞（MSC）分化 完全培养基配制比例

种类	组分	终浓度
分化完全培养基-A	MSC Differentiation Basal Medium F	1×
	MSC Differentiation Supplement A (10×	
分化完全培养基-B	MSC Differentiation Basal Medium F	1×
	MSC Differentiation Supplement B (10×	
分化完全培养基-C	MSC Differentiation Basal Medium F	1×
	MSC Differentiation Supplement C (10×	
分化完全培养基-D	MSC Differentiation Basal Medium F	1×
	MSC Differentiation Supplement D (10×	
分化完全培养基-E	MSC Differentiation Basal Medium F	1×
	MSC Differentiation Supplement E (30×	

五、人类多能干细胞来源间充质干细胞（MSC）分化

5.1 hPSC 的培养和准备：详见 hPSC 培养基使用说明书

(<https://www.shownin.com/download/8.html?page=1> 操作说明书)

以 6 孔板为例，hPSC 的接种密度为 4×10^5 /孔，培养两天。

Tips: 推荐用于定向分化的 hPSC 细胞复苏后至少传 5 代；操作程序同样适用于其他培养容器：hPSC 的接种密度为 4×10^4 /cm²，培养基用量 200 μL/cm²。

- 5.2 Day-1，按照 5.1 描述方法将 hPSC 细胞接种到新的 6 孔板中，培养。
- 5.3 Day 0（24~36 小时后），将 hPSC 完全培养基（NcEpic 或 NcTarget）吸除，用 DMEM/F12 洗 2 次，然后直接加入**分化完全培养基 A**，每孔 2 mL。
- 5.4 Day 2（换分化完全培养基 A 的 40 个小时后），将**分化完全培养基 A** 吸除，用 DMEM/F12 洗 1 次，随后加入**分化完全培养基 B**，每孔 2 mL。

- 5.5 Day 3 (24 小时后), 将分化完全培养基 B 吸除后直接加入分化完全培养基 C, 每孔 2 mL (不需要用 DMEM/F12 清洗)。
- Tips:** 步骤 5.2~5.5 对换液时间要求严格, 推荐操作时间: 步骤 5.2. 早上 11: 00 传代; 步骤 5.3. 传代后 30 小时-第二天 17:00, 换分化完全培养基 A; 步骤 5.4. 第四天 09:00 换分化完全培养基 B。此时间安排可避免凌晨换液!
- 5.6 Day 4, 使用分化完全培养基 C 换液, 每孔 2 mL (不需要用 DMEM/F12 清洗)。
- 5.7 Day 6, 将分化完全培养基 C 吸除后直接加入分化完全培养基 D, 2 mL 每孔 (不需要用 DMEM/F12 清洗)。
- 5.8 Day 8, 将分化完全培养基 D 吸除后直接加入分化完全培养基 E, 2 mL 每孔 (不需要用 DMEM/F12 清洗)。
- 5.9 Day 10, 弃去上清, 每孔加入 2 mL 1 × DPBS 洗一遍后加入 2 mL Solase 置于 37°C, 5% CO₂ 浓度, 饱和湿度的培养箱中孵育 3-5 分钟, 200 × g 离心 5 分钟, 去除上清, 使用分化完全培养基 E 重悬细胞, 随后按照 1:4 的比例传代, 使用分化完全培养基 E 维持培养。
- 5.10 Day 11, 使用分化完全培养基 E 换液 2 mL/孔。
- 5.11 Day13-14, 细胞长满, 此时细胞为 P0 代的 hPSC 定向分化 MSC。
- Tips:** P0 代的 hiMSC 细胞可以冻存。
- 5.12 P1 代细胞开始可以按照 5000 cells/cm² 细胞的比例进行传代培养。
- 5.13 P2 代获得的 hiMSC 细胞可用于各项科学研究试验。
- Tips:** 如需要冻存, 则继续下述消化步骤。
- 5.14 弃去上清, 每孔加入 2 mL 1 × DPBS 洗一遍后加入 2 mL Solase 置于 37 °C, 5% CO₂ 浓度, 饱和湿度的培养箱中孵育 3-5 分钟。当 hiMSC 脱离培养皿底部时, 收集细胞于 15 mL 离心管中, 200 g 离心 5 分钟。
- 5.15 弃除上清, 加入 1 mL/孔 hMSC 无血清培养基重悬 hiMSC, 取适量细胞悬液用于计数。根据计数结果, 按 2 × 10⁶ /mL 细胞密度重悬于 hMSC 冻存液中, 液氮保存。

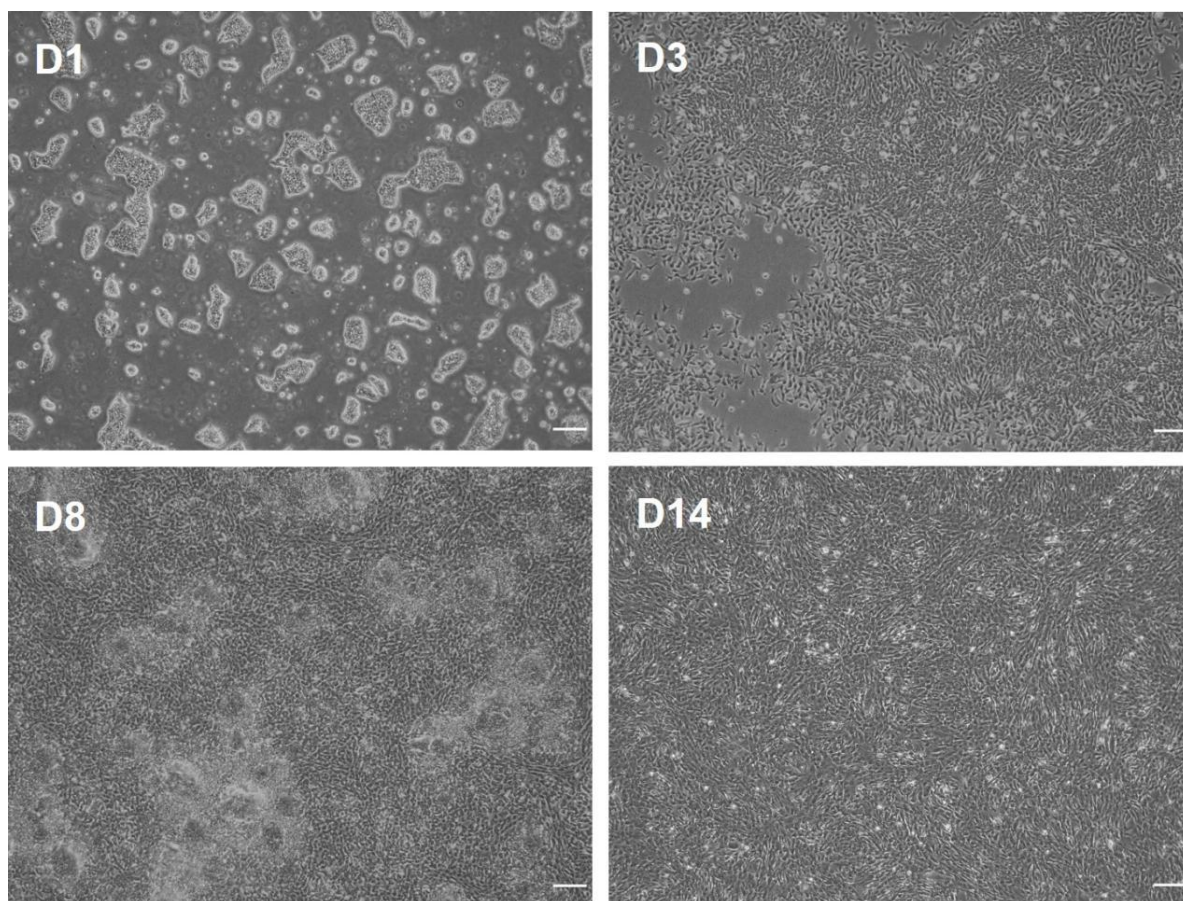


图 1: hPSC-MSC 分化试剂盒分化的 MSC 细胞形态图示。

图示分别为分化过程中 Day 1、3、8、14 时的细胞形态。标尺: 200 µm。

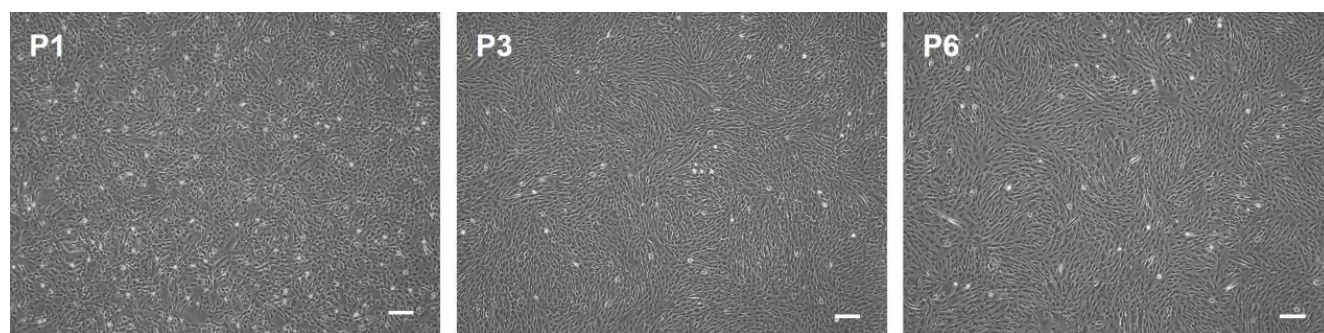


图 2: 分化得到的 hPSC-MSC 细胞连续培养形态图示

图示分别为 hPSC-MSC 生长到 P1、P3、P6 代的细胞形态 (汇合度 80-85%)。标尺: 200 µm。