

hiPSC/hESC 培养基-NcEpic 操作使用说明

一、产品简介

NcEpic™ hPSC Medium 是一种适用于**无饲养层培养**、**化学成分明确**、并且**不含动物源蛋白**的人多能干细胞(hESC/hiPSC)完全培养基。hESC/hiPSC 在 NcEpic™ 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

表一: NcEpic 人多能干细胞培养基产品说明

产品信息	货号	规格	储存条件
NcEpic™ hPSC Medium包含:	RP01001	1 Kit	2°C ~ 8°C*
NcEpic™ hPSC Medium Basal Medium	RP01001-1	496 mL	2℃~8℃
NcEpic™ hPSC Medium Supplement	RP01001-2	4 mL	-20℃或-80℃

^{*}将基础液和添加物混匀配置成完全培养基,可在 2℃~8℃中存储,2 周内用完。

三、试剂材料

表二: 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
Vitronectin	首宁生物	RP01002
hPSC Cryopreservation Medium	首宁生物	SN-06-1210
hPSC Dissociation Buffer	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) NcEpic hPSC 完全培养基配制(500 mL)

- 在 4℃解冻NcEpic™ hPSC Medium Supplement, 不要在 37℃条件下解冻。
- 在生物安全柜中,使用无菌移液管混匀下列两种成份配制 500 mL 完全培养基。

NcEpic[™] hPSC Medium Basal Medium: 496 mL NcEpic[™] hPSC Medium Supplement: 4 mL

3. 完全培养基可置于 4℃储存, 2 周内使用。

Tips: 可根据实际用量将 NcEpic™ hPSC Medium Supplement 分装后冷冻保存。每次配制 100 mL 完全培养基,则将 Supplement 分装 0.8 mL×5 支。使用前解冻 0.8 mL Supplement 与 99.2 mL Basal Medium 混合。 Supplement 冻融总次数不能超过 2 次。

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

- 1. 用 Vitronectin 包被培养皿,保持完全无菌状态。
- 2. 室温(15 25℃)解冻 Vitronectin。

Tips: 解冻后的 Vitronectin 在 4℃最多储存 2 周。也可以分装,储存在-20℃或-80℃,保质期内使用,避免反复冻融。

- 分装Vitronectin: 推荐按照 1 μg/cm² 进行包被, 6 孔板孔面积为 10 cm²/孔,则 1 块 6 孔板包被需要 60 μg Vitronectin,即 120 μL (500 μg/mL);建议将 Vitronectin 分装成 120 μL (60 μg)/管, 于 -20℃或-80℃保存,每次使用时候取 1 管Vitronectin 可包被 1 块 6 孔板。
- 4. 取 1 管Vitronectin (120 μL、60 μg) ,加入 9 mL 的DMEM/F12 轻柔混匀稀释,不要涡旋震荡。
- 5. 分装 1.5 mL/孔于 1 个六孔板中、轻轻摇晃混匀。使稀释后的 Vitronectin 溶液均匀地铺在皿底表面。
- 室温(15-25℃)静置至少1小时后使用。使用时,将培养皿倾斜,用移液管或枪头吸尽包被液即可。
 确保包被后的培养皿底部表面无划痕,也无需额外加相关溶液洗涤。

Tips: 如不立即使用,密封培养皿以防止 Vitronectin 溶液蒸发。建议 4℃条件保存包被后的培养皿,1 周内使用。使用时将培养皿置于室温(15 - 25℃)环境,复温 10-30 分钟,才可用于下一步实验。如Vitronectin 溶液蒸发造成培养皿表面干燥,会严重影响 hESC 和 hiPSC 贴壁。



(三) Matrigel 培养板包被(以Corning® Matrigel®包被 6 孔板为例)

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 3 mg/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。

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℃冰箱中预冷 1 h。

Tips: 货号 <u>354277</u> 的 Matrigel (hESC-Qualified Matrigel) ,操作说明中不标注蛋白浓度,而是以 <u>Dilution Factor</u> 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。

- 将 Matrigel 放置 4℃冰箱过夜解冻,当 Matrigel 完全解冻即可开始分装。
 Tips: Matrigel 仅在 4℃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℃冰箱中保存。

B. 铺板

- 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 μL 无菌吸头置于-20℃冰箱中预冷 1 h,取出一支冷冻的 Matrigel(3 mg)置于 4℃冰箱解冻至 完全化冻。
- 3. 准备装满碎冰的冰盒、将解冻过的 Matrigel、预冷的 1000 μL 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 冷的 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℃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℃。
- 2. 将 Vitronectin 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℃)。
- 3. 取4 mL <u>NcEpic 完全培养基</u>,按照1:4000 比例加入1 μL 的 <u>Blebbistatin(</u>10 mM),恢复至室温(15~30℃)。

Tips:不要在37℃水浴锅中预温培养基。

- 4. 取出 1 支冷冻的细胞置于 37℃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 10 mL DMEM/F12,过程中轻柔晃动混匀细胞,160×q 离心 5 min。
- 6. 吸弃上清,加入预温的 4 mL 的Blebbistatin+ NcEpic 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Vitronectin 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℃, 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 NcEpic 完全培养基,之后每天更换培养基。

表 3: hPSC 传代&培养操作试剂推荐用量

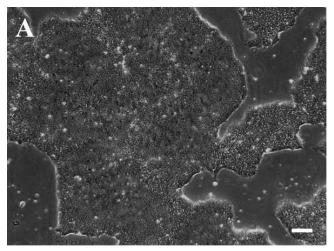
培养容器	底面积	DPBS(mL)	hPSC Dissociation Buffer	NcEpic 完全培养基*		
6 孔板	9.6 cm²/孔	2 mL/孔	2 mL/孔	2 mL/孔		
12孔板	4.5 cm²/孔	1 mL/孔	1 mL/孔	1 mL/孔		
24孔板	2 cm²/孔	0.5 mL/孔	0.5 mL/孔	0.5 mL/孔		
35mm培养皿	8 cm ²	2 mL	2 mL	2 mL		
60mm培养皿	21 cm ²	4 mL	4 mL	4 mL		
100mm培养皿	55 cm ²	10 mL	10 mL	10 mL		

^{*}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, hPSC Dissociation Buffer 消化为例,操作程序同样适用于其他培养容器)

- 1. 传代时机的选择:
 - 1.1、细胞汇合度达 85%左右(图 1),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。



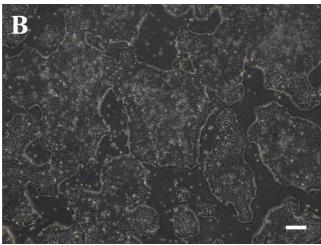


图 1: hiPSC 克隆汇合度 85%左右,A-Matrigel Plate; B-Vitronectin Plate。标尺: 200μm

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

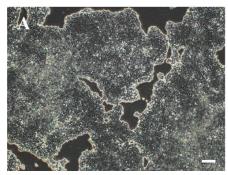
Tips: 2 mL 的 NcEpic 培养基加入 0.5 μL Blebbistatin (10 mM) 。

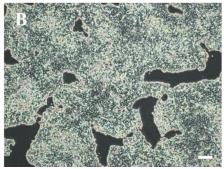
- 5. 将 iPSC 孔内培养基吸弃,加入 2 mL/孔的DPBS (不含钙镁),轻轻摇晃并吸弃。
- 6. 加入 2mL/孔的 hPSC Dissociation Buffer使溶液完全覆盖孔底。
- 7. 置于 37℃培养箱中孵育 7-8 min。

Tips: (1) 消化 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。







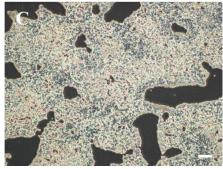


图 2: (A)hPSC Dissociation Buffer 消化 4 min; (B)hPSC Dissociation Buffer 消化 6 min; (C)hPSC Dissociation Buffer 消化 8 min。标尺: 200 μm

- 8. 消化结束后轻轻的将细胞培养板拿回生物安全柜,避免震荡摇晃细胞,倾斜吸弃 hPSC Dissociation Buffer。
- 9. 及时加入 2 mL/孔预温的Blebbistatin+NcEpic 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 +NcEpic 完全培养基时,可轻柔吹打细胞 1-2 次,不能超过 2 次,避免将细胞吹打成单细胞状态。
 - (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 NcEpic 培养基加入后要快速吸出。hPSC Dissociation Buffer的效果在 NcEpic 培养基加入后会很快被终止,在 NcEpic 培养基加入后细胞又会很快贴壁,而 hPSC 不能长时间处于 hPSC Dissociation Buffer(<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 Vitronectin 溶液,加入预温的 Blebbistatin+NcEpic 完全培养基 2 mL/孔。
- 10.2 在 6 孔板上标记细胞名称、代次(P#)、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细胞于孔板中。

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+NcEpic 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 Vitronectin 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℃,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 **NcEpic 完全培养基**,此后每天换液,4-5 天后继续传代或冻存(图 3-4)。

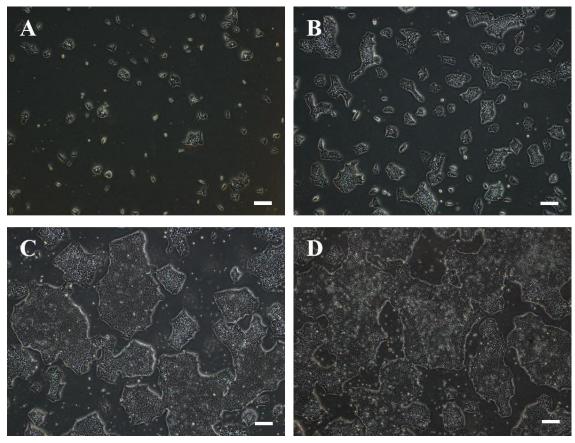


图 3: NcEpic™ hPSC Medium连续培养的 hiPSC 细胞形态图示,Vitronectin Plate。 A、B、C、D 分别为培养第 1、2、3、4 天时,hiPSC 的形态图示。标尺:200 μm。

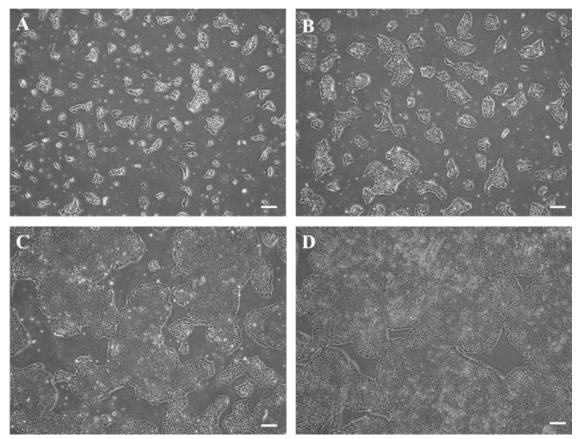


图 4: NcEpic™ hPSC Medium连续培养的 hiPSC 细胞形态图示,Matrigel Plate。 A、B、C、D 分别为培养第 1、2、3、4 天时,hiPSC 的形态图示。标尺:200 μm。



七、冻存 hPSC

- 1. 当细胞汇合度达 85%左右(图 1)可以收获冻存,一般 6 孔板可收集 2-4×10⁶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℃冰箱中的 hPSC 冻存液,置于室温预温,使用前注意摇匀。

Tips: hPSC 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。
- 加入 2 mL/孔的hPSC 传代工作液,将细胞置于 37℃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 hPSC Dissociation Buffer。
- 7. 摇匀预温的 <u>hPSC 冻存液</u>,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℃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℃以下后直接转入液氮储存。

八、其它培养体系中hPSC更换为NcEpic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,按照原培养基与NcEpic 完全培养基的比例为 1: 1 进行换液培养,2 次换液后,用 NcEpic 完全培养基培养 2 ~ 3 代后,可适应NcEpic™ hPSC Medium。



九、问题及解决方案

▶ hPSC培养出现分化

- 确保NcEpic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NcEpic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hPSC Dissociation Buffer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。
- NcEpic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)。
- hPSC Dissociation Buffer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Vitronectin/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。

þ 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hPSC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。