

hiPSC/hESC 培养基-NcEpic

使用说明书

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	*
NcEpic™ hPSC Medium Basal Medium	RP01001-1	496 mL	2-8 °C
NcEpic™ hPSC Medium Supplement	RP01001-2	4 mL	-80°C 或 -20°C

*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)

1. 在 4 °C 解冻 **NcEpic™ hPSC Medium Supplement**，不要在 37 °C 条件下解冻。
2. 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 °C 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 °C) 解冻 Vitronectin。

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

3. 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 °C 或 -80 °C 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。
6. 室温 (15-25 °C) 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 °C 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 °C) 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/cm^2 , 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) $= 3 \text{ mg} / 11.3 \text{ mg/mL} = 0.265 \text{ mL}$ 。分装数量 $= 10 \text{ mL} / 0.265 \text{ mL} = 37.74$ 。

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; $1000 \mu\text{L}$ 无菌吸头; EP 管架, 均置于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 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 $238 \mu\text{L}$, 则表明 $238 \mu\text{L}$ 可包被 4 块 6 孔板, 分装数量 $= 5 \text{ mL} / 0.238 = 21.01$ 。

3. 将 Matrigel 放置 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱过夜解冻, 当 Matrigel 完全解冻即可开始分装。

Tips: Matrigel 仅在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 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、 $1000 \mu\text{L}$ 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 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 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. $1000 \mu\text{L}$ 无菌吸头置于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中预冷 1 h , 取出一支冷冻的 Matrigel (3 mg) 置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 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 $1000 \mu\text{L}$ 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 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 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 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 °C 。
 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 °C) 。
 3. 取 4 mL **NcEpic 完全培养基**, 按照 1:4000 比例加入 1 μL 的 **Blebbistatin** (10 mM), 恢复至室温 (15-30 °C) 。
- Tips: 不要在 37 °C 水浴锅中预温培养基。**
4. 取出 1 支冷冻的细胞置于 37°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 10 mL DMEM/F12, 过程中轻柔晃动混匀细胞, 160 × g 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 °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 **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 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
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。

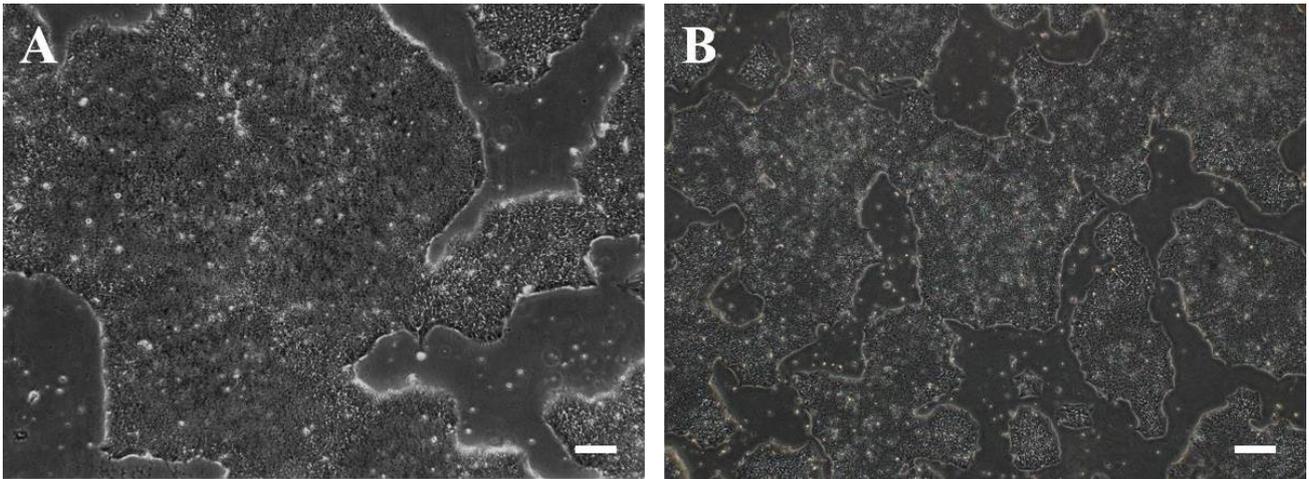


图 1: hiPSC 克隆汇合度 85%左右, A-Matrigel Plate; B-Vitronectin Plate。标尺: 200 μ m

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 ($\sim 25^{\circ}\text{C}$)。
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 (10 mM), 恢复至室温 ($\sim 25^{\circ}\text{C}$)。

Tips: 2 mL 的 NcEpic 培养基加入 0.5 μ L 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 hPSC Dissociation Buffer 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 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。

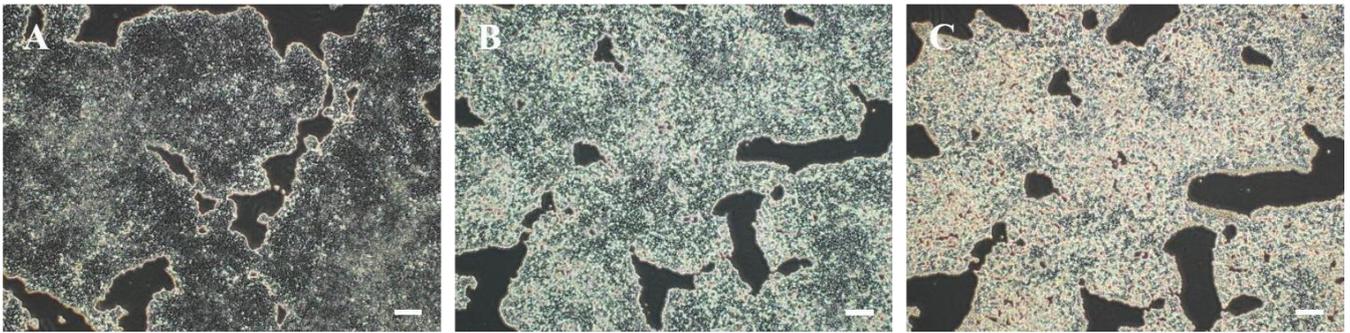


图 2: (A) hPSC Dissociation Buffer 消化 4 min; (B) hPSC Dissociation Buffer 消化 6 min; (C) hPSC Dissociation Buffer 消化 8 min。标尺: 200 μm

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 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 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)。

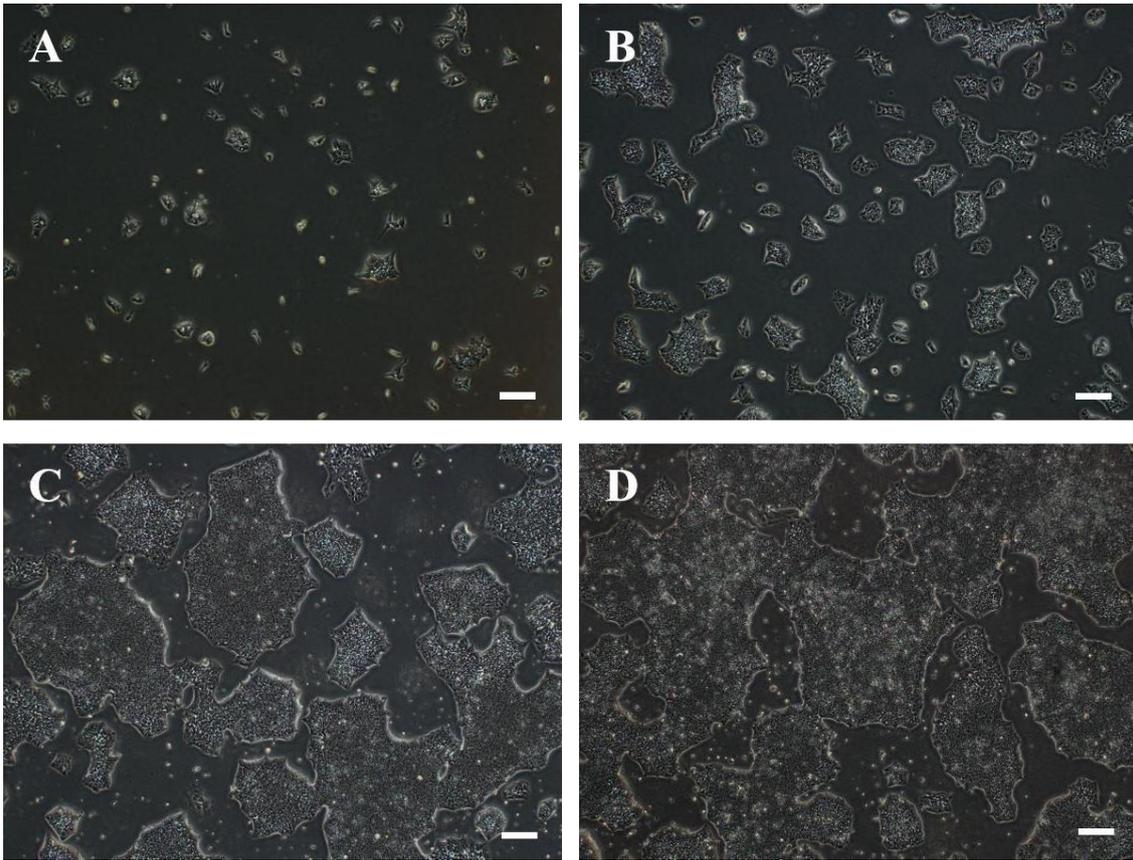


图 3: NcEpic™ hPSC Medium连续培养的 hiPSC 细胞形态图示, Vitronectin Plate。

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。

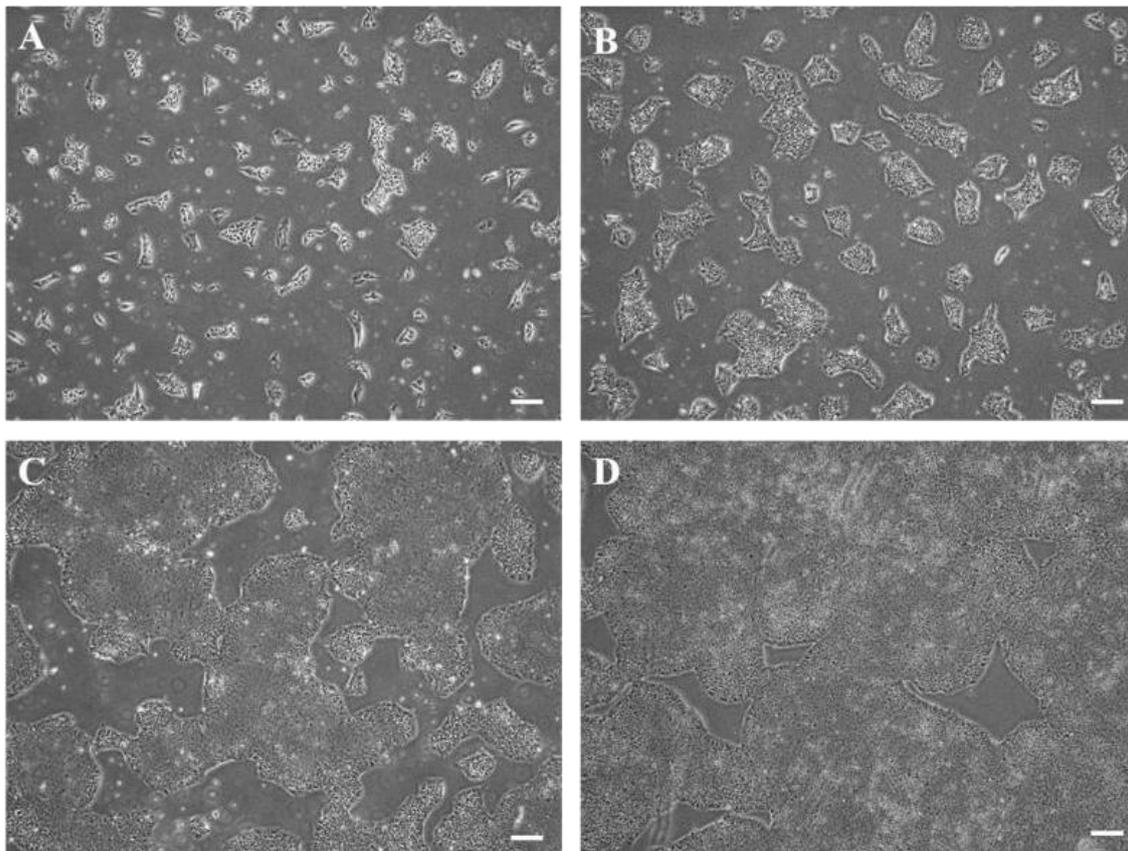


图 4: NcEpic™ hPSC Medium连续培养的 hiPSC 细胞形态图示, Matrigel Plate。

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 $2-4 \times 10^6$ 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: 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。
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 hPSC Dissociation Buffer。
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 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

<p>➤ hPSC培养出现分化</p>
<ul style="list-style-type: none"> ● 确保NcEpic完全培养基储存于4°C，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。
<p>➤ 能否用Dispase或胶原酶传代hPSC</p>
<ul style="list-style-type: none"> ● 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。
<p>➤ hPSC传代后不贴壁或贴壁率低</p>
<ul style="list-style-type: none"> ● 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。
<p>➤ 换液后细胞漂起</p>
<ul style="list-style-type: none"> ● 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。
<p>➤ 孔内hPSC克隆团分布不均匀</p>
<ul style="list-style-type: none"> ● 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。