

hiPSC/hESC 高效冻存液

使用说明书

一、产品简介

生产的 hPSC 冻存保护液是一款无血清、无外源蛋白、化学成分明确的人类多能干细胞 (hPSC) 冻存液产品。此产品是针对 hPSC 冻存的特殊配方，能大大降低细胞在冻存过程中的损伤，提高细胞复苏后的存活率，能够长期有效维持 hPSC 的多向分化潜能。同时因冻存液化学成份明确，无外源蛋白成分，批间质量稳定，适用于科研级细胞保存。

二、产品信息

表 1: hPSC 冻存保护液产品说明

产品信息	货号	规格
hPSC Cryopreservation Medium	RP01003	50 ml

三、保存条件

- 保存温度: 4°C。
- 有效期: 12 个月。

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

- 当细胞汇合度达 85%左右可以收获冻存, 一般 6 孔板可收集 $2-4 \times 10^6$ 个活细胞/孔, 冻存 1 管。
- 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。
- 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。**
- 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°C 培养箱中, 计时 7-8 min。
- 消化结束, 轻轻取出培养板, 吸弃 EDTA。
- 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。
- 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。

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)

- 将水浴锅预热至 37°C。
- 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 hPSC 完全培养基 (ncEpic 或 ncTarget), 按照 1:4000 比例加入 1 μ l 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 \times g 离心 5 min。
 6. 吸弃上清, 加入预温的 4 mL 的 Blebbistatin+ hPSC 完全培养基 (ncEpic 或 ncTarget) 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 hPSC 完全培养基 (ncEpic 或 ncTarget), 之后每天更换培养基。