

hPSC 高效冻存液
操作使用说明

一、产品简介

hPSC高效冻存液是一款无血清、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分明确，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	规格	货号	存储条件
hPSC高效冻存液	50 mL	SN-06-1210	2-8 °C

三、保存条件

- 1. 保存温度：4℃。
- 2. 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）

- 1. 当细胞汇合度达 85% 左右可以收获冻存，一般 6 孔板可收集 $2-4\times10^6$ 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℃冰箱中的 hPSC高效冻存液，置于室温预温，使用前注意摇匀。
- 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 Dissociation Buffer，将细胞置于 37°C培养箱中，计时 7-8 min。
6. 消化结束，轻轻取出培养板，吸弃 hPSC Dissociation Buffer。
7. 摇匀预温的 hPSC高效冻存液，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。

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 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 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 + 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。