

科研级 hiPSC 细胞株

操作使用说明

一、产品简介

科研级 hiPSC 细胞株是由人成体细胞通过染色体外非整合重编程方法制备获得，并在无饲养层、化学成分明确的 hPSC 多能干细胞培养基（NcEpic 或 NcTarget）中培养，可以稳定增殖，具有和人类胚胎干细胞（Human embryonic stem cell, hESC）一样的形态特征、细胞表型和基因表达。同时经质检保证细胞染色体核型正常、无外源基因整合、三胚层多向分化的潜能。

二、产品信息

表 1： 科研级 hiPSC 细胞株*产品说明

产品信息	货号	规格	说明
科研级hiPSC细胞株-男性	RC01001-A	> 2×10 ⁶ /管	36岁，血液来源。
科研级hiPSC细胞株-女性	RC01001-B		0岁，脐带来源。
hiPSC-EGFP	RC01004	>2×10 ⁶ /管	随机插入EGFP基因片段全细胞绿色荧光；液氮保存。
hiPSC-Luc-GFP	RC01010	>2×10 ⁶ /管	EGFP基因片段核内绿色荧光，并表达Luciferase；液氮保存。
hiPSC-mCherry	RC01016	>2×10 ⁶ /管	ROSA26位点插入mCherry基因片段全细胞红色荧光；液氮保存。
科研级 hiPSC 细胞株信息列表			
诱导方式	非整合重编程技术		
细胞代次	p10-20		
细胞表面标志物检测	流式细胞分析, SSEA4 + / TRA-1-81 +		
多能基因检测	qRT-PCR 分析, OCT4 + / NANOG +		
外源基因检测	无外源基因插入		
基因组稳定性检测	染色体核型正常		
分化潜能检测	畸胎瘤中三胚层组织检定		
供体细胞传染病原检测	无乙肝、丙肝、艾滋、梅毒感染		
微生物检测	无细菌、真菌、支原体		
内毒素检测	<2.5 EU/mL		
运输条件	干冰运输		
保存条件	-196 °C		

*本产品仅供科研使用，不可使用于诊断和治疗等医疗应用。

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
Vitronectin(VTN包被蛋白)	首宁生物	RP01002
hPSC Dissociation Buffer (EDTA传代工作液)	首宁生物	RP01007
Blebbistatin	首宁生物	RP01008
hPSC高效冻存液	首宁生物	SN-06-1210
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
10 μL/200 μL/1000 μL吸头	Rainin .	N/A
梯度程序降温盒	Thermo Sci.	1535050

四、试剂准备

(一) hPSC 完全培养基 (NcEpic 或 NcTarget) 配制 (500 mL)

1.1 NcEpic 多能干细胞完全培养基配制 (500 mL)

1.1.1 在 4℃解冻 NcEpic Supplement, 不要在 37℃条件下解冻。

1.1.2 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 Basal Medium: 496 mL

NcEpic Supplement: 4 mL

1.1.3 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 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。

1.2 NcTarget 人多能干细胞完全培养基配制 (500 mL)

1.2.1 在 4℃解冻 NcTarget Supplement A/B, 不要在 37℃条件下解冻。

1.2.2 参考表 3 在生物安全柜中, 使用无菌移液管混匀下列成份配制成完全培养基。完全培养基可置于 4℃储存, 2 周内使用。

表 3: NcTarget 人多能干细胞培养基 配置说明*

组分	500 mL 完全培养基	100 mL 完全培养基	50 mL 完全培养基
NcTarget Basal Medium	400 mL	80 mL	40 mL
NcTarget Supplement-A	20 mL	4 mL	2 mL
NcTarget Supplement-B	80 mL	16 mL	8 mL

*可根据实际用量将 NcTarget Supplement A/B 分装后冷冻保存。具体配置比例可参考表 3 的配置说明。NcTarget Supplement A/B 冻融总次数不能超过 2 次。

(二) Vitronectin 培养板包被 (以 VTN 包被蛋白 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。

3. 分装 Vitronectin: 推荐按照 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 进行包被, 6 孔板孔面积为 10 cm^2 /孔, 则 1 块 6 孔板包被需要 60 μg VTN 包被蛋白, 即 120 μL (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ; 建议将 VTN 包被蛋白分装成 120 μL (60 μg) /管, 于 -20℃或-80℃保存, 每次使用时候取 1 管 VTN 包被蛋白可包被 1 块 6 孔板。

4. 取 1 管 VTN 包被蛋白 (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℃) 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 (以包被 6 孔板为例, 操作程序同样适用于其他培养容器)

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 $\text{mg}/\text{管}$ (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。

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 μ L 无菌吸头；EP 管架，均置于-20℃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 μ L，则表明 238 μ L 可包被 4 块 6 孔板，分装数量=5 mL / 0.238 =21.01。

3. 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 μ 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℃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 μ L 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. 准备一个装满碎冰的冰盒，将解冻过的 Matrigel、预冷的 1000 μ 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℃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 Matrigel 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 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℃)。

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，移液管吸取 10 mL DMEM/F12，逐滴加入冻存细胞悬液，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 Matrigel 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)**，之后每天换液。

表 4: hPSC 传代&培养操作试剂推荐用量

培养容器	底面积	DPBS(mL)	EDTA传代工作液	hPSC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

*hiPSC 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，EDTA 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。

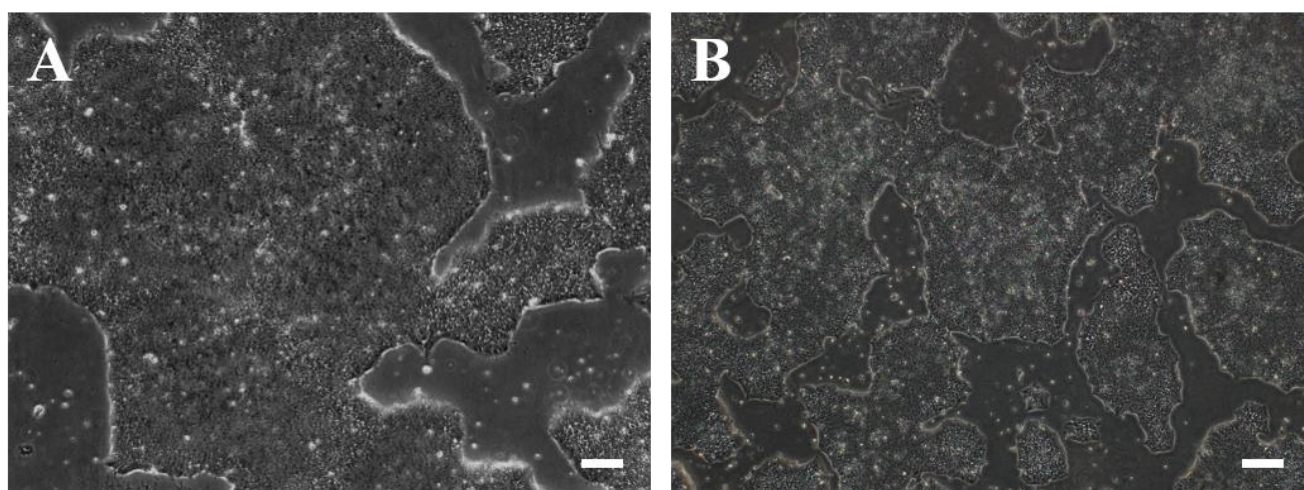


图 1: hiPSC 克隆汇合度 85%左右, A-Matrigel Plate; B-Vitronectin Plate。标尺: 200 μm

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 Matrigel 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°C)。

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

Tips: 2 mL 的 hPSC 完全培养基加入 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 EDTA 传代工作液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。

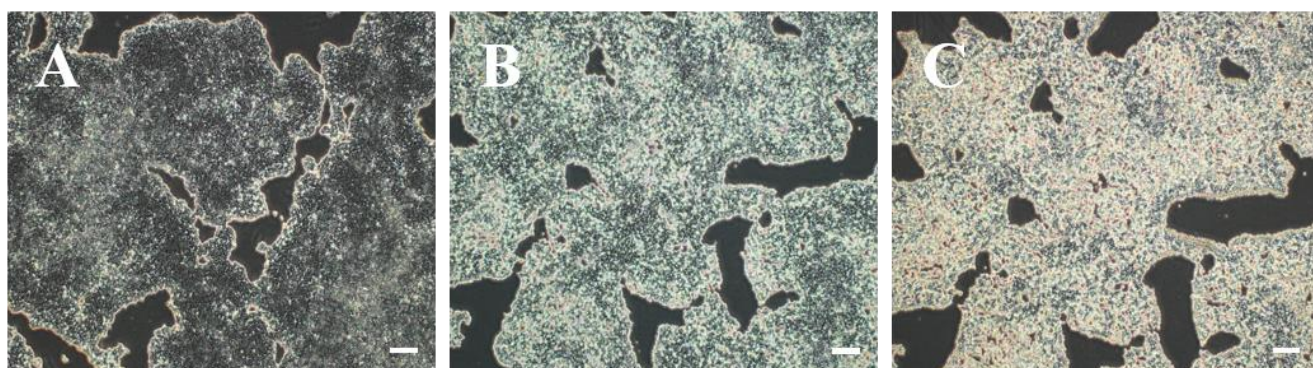


图 2: (A) EDTA 消化 4 min; (B) EDTA 消化 6 min; (C) EDTA 消化 8 min。标尺: 200 μ m

8. 消化结束后轻轻地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 EDTA 传代工作液。
9. 及时加入 2 mL/孔预温的 Blebbistatin+hPSC 完全培养基 (NcEpic 或 NcTarget)，水平十字摇晃 6 孔板使细胞脱离基质。

Tips: (1) 加入 Blebbistatin +hPSC 完全培养基 (NcEpic 或 NcTarget) 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 hPSC 完全培养基 (NcEpic 或 NcTarget) 加入后要快速吸出。EDTA 传代工作液的效果在 hPSC 完全培养基加入后会很快被终止，在 hPSC 完全培养基加入后细胞又会很快贴壁，而 hPSC 不能长时间处于 EDTA 传代工作液 (<15 min)，所以收集接种细胞时操作须快速。

10. 接种:

10.1 吸弃 6 孔板中的 Matrigel 溶液，加入预温的 Blebbistatin+ hPSC 完全培养基 (NcEpic 或 NcTarget) 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+ hPSC 完全培养基 (NcEpic 或 NcTarget) 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°C，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 **hPSC 完全培养基 (NcEpic 或 NcTarget)**，此后每天换液，4-5 天后继续传代或冻存 (图 3-4)。

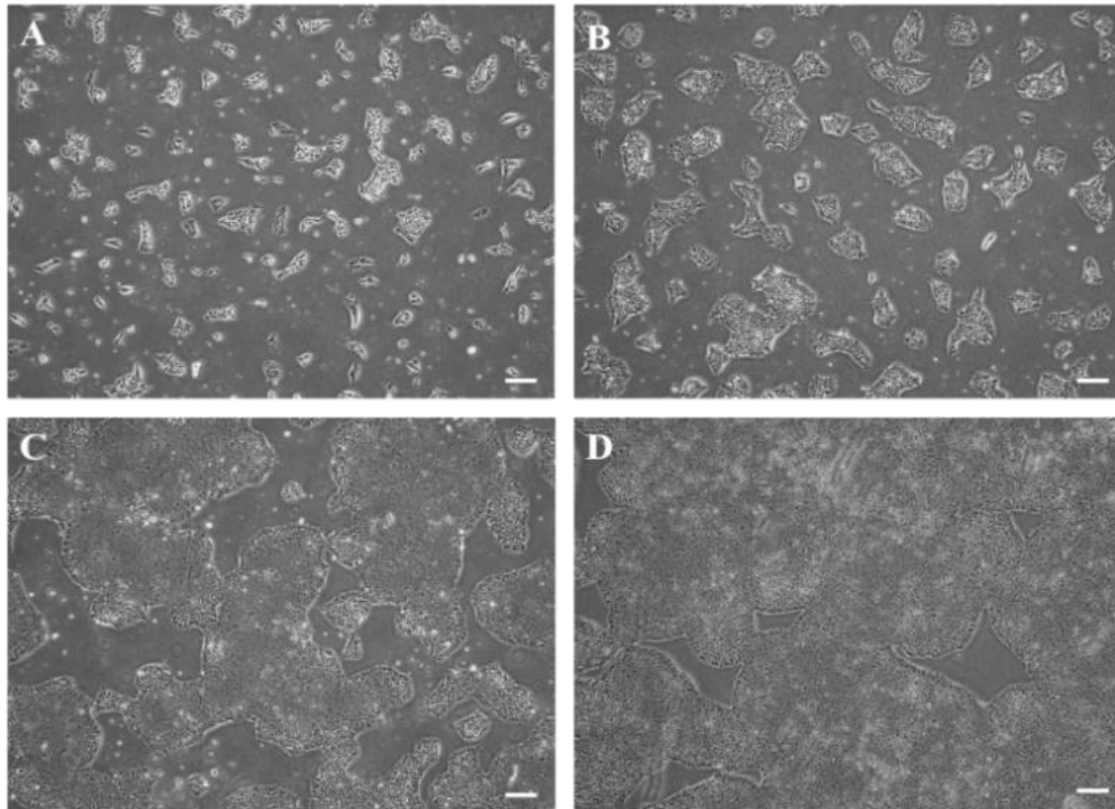


图 3: NcEpic hPSC 培养基连续培养的 hiPSC 细胞形态图示, Matrigel Plate, 标尺: 200 μm 。

A、B、C、D 分别为培养第 1、2、3、4 天时, hiPSC 的形态图示。

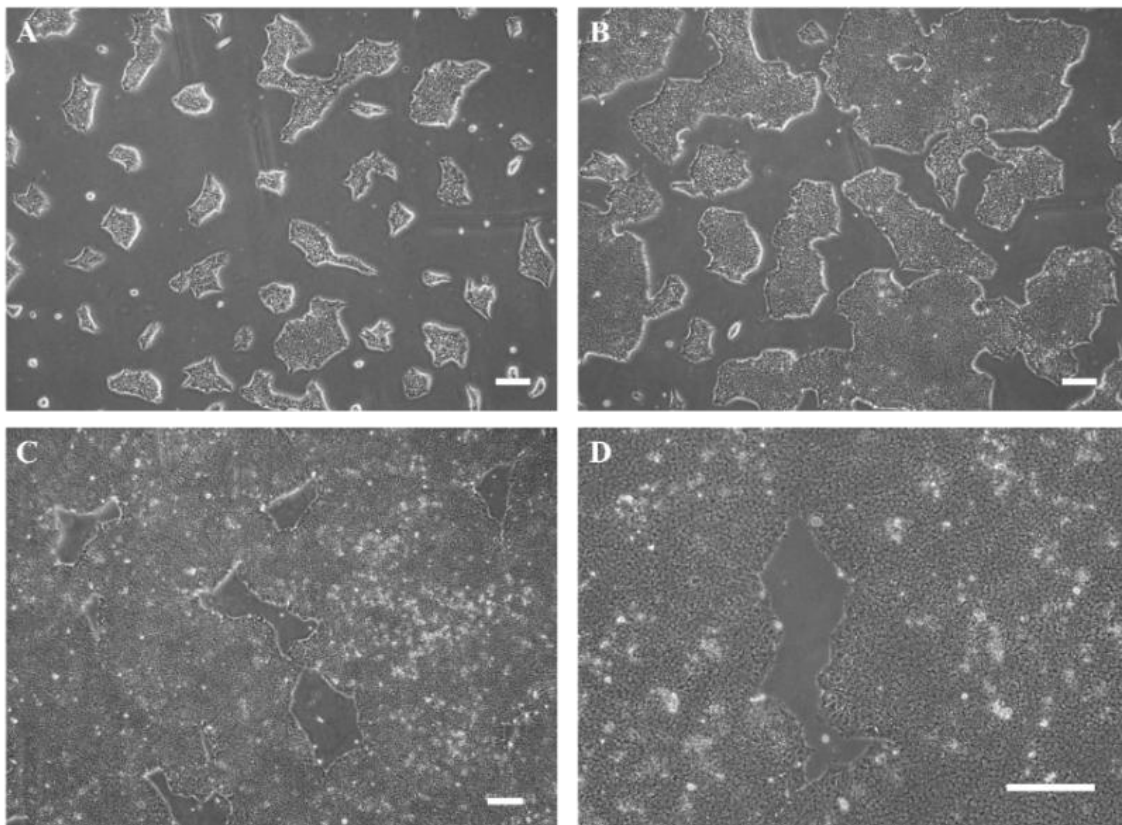


图 4: NcTarget hPSC 培养基连续培养的 hiPSC 细胞形态图示, Matrigel Plate, 标尺: 200 μm 。

A、B、C 分别为培养第 2、3、4 天时, hiPSC 的形态图示, D 为培养至第 4 天时的放大细胞图示。

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℃冰箱中的 hPSC 高效冻存液, 置于室温预温, 使用前注意摇匀。

Tips: hPSC 高效冻存液中的 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, 造成冻存细胞的不稳定。

4. 吸弃 hiPSC 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℃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 EDTA。
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。

八、问题及解决方案

➤ hiPSC培养出现分化
● 确保hPSC完全培养基（NcEpic或NcTarget）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hPSC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EDTA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5 mL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或NcTarget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。
➤ hiPSC传代后不贴壁或贴壁率低
● 传代比例不要过高（>1:20）。 ● EDTA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。
➤ 换液后细胞漂起
● 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hiPSC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。