hPSC Dissociation Buffer
使用说明书

一、产品简介

hPSC Dissociation Buffer 含 0.5 mM 的 EDTA，该消化液经过过滤除菌，可以直接用于多能干细胞的消化。本消化液具有方便快捷，通常 37 ℃ 消化 8 分钟左右就可以消化下大部分多能干细胞。

二、产品信息

表 1：hPSC Dissociation Buffer 产品说明*

产品	货号	规格	浓度
hPSC Dissociation Buffer	RP01007	500 mL	0.5 mM EDTA

*该产品使用前，请恢复至室温。

三、保存条件

1. 保存温度：2-8 ℃ 。
2. 有效期：12 个月。

四、使用说明

1. 将 hPSC 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。
2. 加入 2 mL/孔的 hPSC Dissociation Buffer 使溶液完全覆盖孔底。
3. 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 1C），若大部分细胞仍未变亮，则需要延长消化时间（图 1A&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。

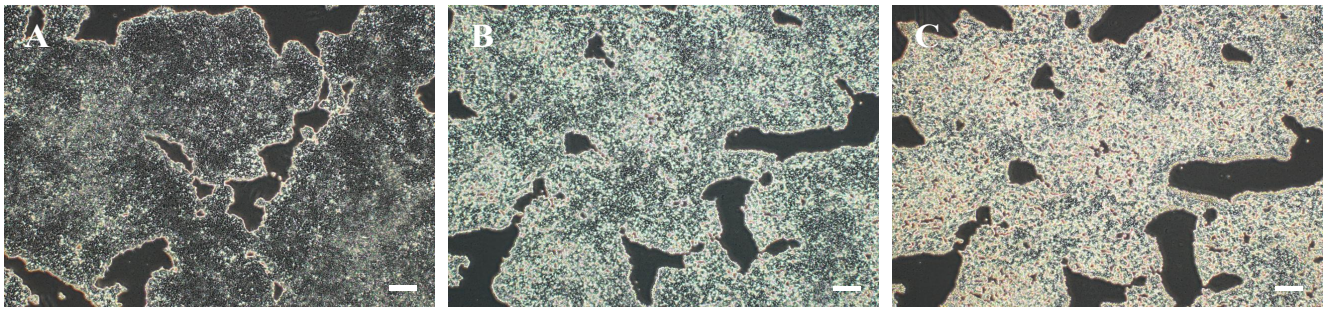

图 1： hPSC Dissociation Buffer 消化 hPSC 示例图片

（A）EDTA 消化 4 min；（B）EDTA 消化 6 min；（C）EDTA 消化 8 min。标尺：200 μm

4. 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。

5. 及时加入 2 mL/孔预温的含 ROCK 抑制剂的 hPSC 完全培养基（NcEpic 或 NcTarget，Blebbistatin 2.5μM 或 Y27632-2HCL 10μM），水平十字摇晃 6 孔板使细胞脱离基质。

Tips：（1）加入含 ROCK 抑制剂的 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。hPSC Dissociation Buffer 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 hPSC Dissociation Buffer（<15min）中，所以收集接种细胞时操作必须快速。

6. 接种：

6.1 吸弃 Matrigel 或 Vitronectin 包被 6 孔板中的包被液，加入预温的含 ROCK 抑制剂的完全培养基 2 mL/孔（Blebbistatin 2.5μM 或 Y27632-2HCL 10μM）。

6.2 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 5 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 6 孔板中。

Tips：也可将每板传代所需细胞量计算得出后，转移至 15 mL 离心管中与预温的含 ROCK 抑制剂的完全培养基（Blebbistatin 2.5μM 或 Y27632-2HCL 10 μM）中悬浮定容到 12 mL，再均匀分配到吸弃包被液的 6 孔板中，以此类推。

7. 水平十字摇匀 6 孔板三次，置于 37 ℃ 、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。
8. 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。