

赛业 OriCell®

细胞产品手册

OriCell®人诱导多能干细胞完全培养基

产品货号：HUIPS-90011



We help you discover life

产品介绍

随着科学研究的发展，人诱导多能干细胞（Induced pluripotent stem cells, iPSCs）细胞凭借其在多能性、低伦理风险及个性化治疗的潜力等特征，已经成为再生医学中不可或缺的实验工具。随着基因编辑技术的深度融合，iPSC 有望重塑癌症、神经退行性疾病等重大疾病的治疗格局。在此条件下，iPSC 细胞在具体应用前的维持培养就成了科研人员的关键一环。

由赛业 OriCell®研发团队精心研制的 OriCell®人诱导多能干细胞完全培养基套装，包含适合人诱导多能干细胞生长的基础培养基及细胞生长所需的其他添加物。本产品化学成分明确，不含血清，不含任何动物源成分；适用于人各种体细胞来源 iPSC 的增殖培养。

本产品专为维持人诱导多能干细胞的体外生长而设计，能够长期保持细胞的优良生长状态。即使经过多次传代，依然能够确保高细胞质量，并稳定地保持定向分化潜能。

注意：本产品仅提供给进一步科研使用，不可用于临床治疗等其他用途。

使用本试剂产品发表的文献请注明：

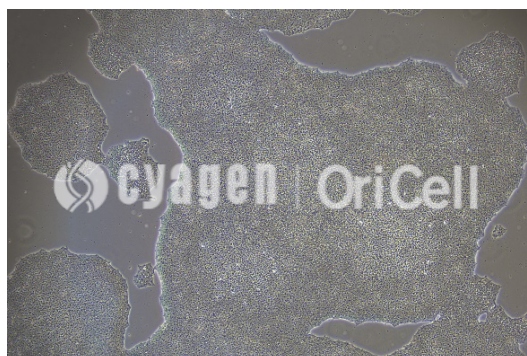
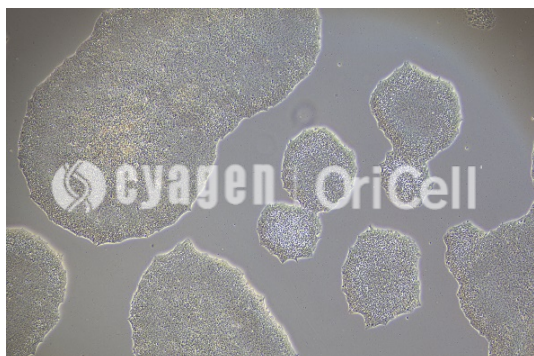
OriCell®Complete Medium for Human Induced Pluripotent Stem Cells + Cat. NO. HUIPS-90011, from Cyagen Biosciences (Guangzhou) Inc.

套装成分

套装成分	货号	正装	试用装
OriCell®Basal Medium For Cell Culture OriCell®细胞基础培养基	BDMF-03011	495 mL	99 mL
OriCell®Supplements A (For Human Induced Pluripotent Stem Cells) OriCell®人诱导多能干细胞培养添加物 A	HUIPS-04011	5 mL	1 mL
OriCell®Supplements B (For Human Induced Pluripotent Stem Cells) OriCell®人诱导多能干细胞培养添加物 B	HUIPS-04012	200 µL	40 µL



人诱导多能干细胞使用本产品后在显微镜下的形态



质量控制

1. 通过细菌、真菌、支原体、内毒素检测。
2. 通过渗透压、pH 检测。
3. 通过产品性能检测。

详情见《产品检测报告》。

处理原则

1. 严格的无菌环境。务必保证实验室整体和操作区域的清洁。
2. 规范的操作方式。请按照产品说明书描述的方式操作，严格控制变量，做好对照实验。
3. 各成分需按照保存条件妥善存放，并尽快使用。
4. 若短期内无法用完整套培养基，应按套装内各成分体积比例分批配制并分装保存。

产品稳定性及保存条件

1. 套装内所有成分均需避光保存。
2. 套装内基础培养基需置于 4℃ 冰箱保存，保质期为 1 年；其他成分需置于 -20℃ 保存，保质期为 2 年。
3. 配制后的完全培养基，需放置 4℃ 避光保存，保质期为 2 周。
4. 配制后的完全培养基，在恢复室温的过程中需注意避光。
5. 所有产品请于保质期内使用；过期的成分可能严重影响培养效果。

完全培养基的配制

所需材料

- OriCell®人诱导多能干细胞完全培养基（货号：HUIPS-90011）
- 清洁、无菌、质量稳定的一次性耗材（移液管、移液器吸头、离心管等）
- 洁净的封口膜
- 铝箔纸等避光材料

培养基配制

1. 配制前至少 1 h，将套装中的-20℃组分 Supplements A、Supplements B 放置于 4℃冰箱内完全融化。

注意：Supplements B 可使用水浴短暂加热，直至呈透明状即可使用。

2. 上下颠倒或轻弹试剂管以混匀试剂。
3. 用 75%医用酒精仔细擦拭所有成分外包装。在超净台内打开包装。
4. 将 Supplements A、Supplements B 全部加入到细胞基础培养基中。
5. 取少量基础培养基，洗涤各瓶、管，尽可能将所有成分全部加入基础培养基中。
6. 拧紧基础培养基瓶盖，轻柔并充分摇匀。

注意：1) 配制好的完全培养基 4℃避光可保存 2 周；

2) 若短期内无法用完全部培养基，建议分批配制，请按照套装内各成分比例，配制所需量；

3) 建议根据实际用量，将-20℃组分一次性分装成小份妥善保存，避免多次冻融。

7. 用封口膜密封瓶口，用铝箔纸包裹瓶身，并标注名称、配制日期等信息。

注意：OriCell®人诱导多能干细胞完全培养基套装内的所有成分都严格控制无菌，一般情况下我们不建议再次除菌。若配制过程有污染风险，可将完全培养基过滤除菌。

培养基的使用

所需材料

- OriCell®人诱导多能干细胞完全培养基（货号：HUIPS-90011）
- OriCell®Phosphate-Buffered Saline Solution (1X)（货号：PBS-10001）
- EDTA 传代工作液
- Vitronectin 溶液（下称 VTN）
- Blebbistatin 溶液
- 清洁、无菌、质量稳定的一次性耗材（移液管、移液器吸头、离心管等）
- 洁净的封口膜、铝箔纸等避光材料

注意: 以下实验均以 6 孔板为例进行，使用过程中请根据实际情况等比例扩大或缩小试剂用量。

VTN 包被

1. 取适量 VTN 溶液，置于 4℃冰箱解冻。
2. 准备 1 个 15 mL 离心管，向其中加入 3 mL 1×PBS，将解冻的 VTN 加入到 1×PBS 中，轻柔混匀稀释的 VTN，不要涡旋振荡。

注意: 推荐 VTN 的包被浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

3. 立即将稀释后的 VTN 溶液加入到 6 孔板中，每孔加入 1.5 mL VTN 稀释液。
4. 将 6 孔板置于 37℃培养箱中，至少在放置 1 h 后使用。
5. 使用时，将 6 孔板倾斜，用移液管或枪头吸尽包被液即可。确保包被后的孔板底部表面无划痕，也无需额外加溶液洗涤。

注意: 如短期内不使用，可使用封口膜密封孔板后置于 4℃保存，建议在一周内完成使用。使用前需将 6 孔板置于 37℃培养箱中预热 10-30 min，方可用于后续实验。

细胞复苏

1. 水浴锅 37°C 预热。
2. 复苏前 10 min 从液氮中取出细胞，置于 -80°C 冰箱，让管中液氮挥发。
3. 按照 4000 : 1 的比例，取 4 mL 完全培养基，向其中加入 1 μ L 浓度为 10 mM 的 Blebbistatin，轻柔并充分摇匀后置于室内（需避光），待恢复至室温后即可使用。

注意: 请根据用量配制含 Blebbistatin 的完全培养基（以下简称 Bleb 培养基），配制好的培养基达到室温（下称复温）即可使用。

4. 从 -80°C 冰箱中取出细胞，放入 37°C 水浴锅中，快速晃动，使冻存液迅速融化。

注意: 融化过程必须晃动冻存管，保证冻存液融化迅速、均匀；晃动时应避免水没过管盖造成污染；管内冻存液融化至只剩一个约 2 mm 直径的冰晶时，停止水浴。继续晃动冻存管，至冰晶融化。

5. 用 75% 医用酒精擦拭冻存管外表面。
6. 在超净台中打开冻存管，用巴氏吸管或移液枪吸取细胞冻存悬液，转移至先前准备的离心管中，随后逐滴加入 9 mL 复温的完全培养基，过程中轻柔晃动摇匀细胞。
7. 细胞悬液以 160 $\times$ g 离心 4 min。
8. 离心后去上清。加入 4 mL Bleb 培养基，轻弹离心管底部混匀细胞，尽量避免吹打。
9. 吸弃 6 孔板中的 VTN 包被液，将混匀的细胞（约 5×10^5 个活细胞）按照 2 mL/孔接种到 2 个孔中。
10. 水平十字摇匀三次，放入 37°C、5%CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中，再次水平十字摇匀三次，培养。
11. 18-24 h 后换新的完全培养基，之后每天更换一次完全培养基。

细胞传代

1. 水浴锅 37°C 预热 EDTA 传代工作液、PBS。
2. 实验前 1 h，将 VTN 包被的 6 孔板放入培养箱预热。
3. 实验前 1 h，根据传代接种的孔数，按照 2 mL/孔的量准备 Bleb 培养基，待恢复至室温后即可使用。
4. 从培养箱中取出细胞，吸去 6 孔板内的培养基，向每孔中加入 2 mL PBS，洗涤细胞，注意动作轻柔，清洗全面。
5. 吸去 PBS，向每孔中加入 1 mL EDTA 传代工作液，迅速铺匀，保证工作液充分接触细胞表面。
6. 将细胞置于 37°C 培养箱中孵育 3-5 min，显微镜下观察，当大部分细胞变圆变亮，且细胞尚未漂起时终止消化。
7. 倾斜 6 孔板，吸弃 EDTA 传代工作液。
8. 若需要大克隆团进行传代则向每孔中加入 1 mL 复温的 Bleb 培养基，拍打 6 孔板侧壁，使细胞脱离培养表面。若需要小克隆团进行传代则用移液器向每孔中加入 2 mL 复温的 Bleb 培养基，扇形吹打 6 孔板底部，使 6 孔板底部的干细胞集落脱落。

注意：采用大克隆传代方案时，加入完全培养基时可轻柔吹打细胞 1-2 次，不能超过 2 次，避免反复吹打。避免刮擦细胞，有少部分细胞未脱离基质是正常现象，若大量细胞未脱离则需要延长消化时间。当采用小克隆传代方案时，吹吸的力度要轻柔，总次数不能超过 5 次，吹吸过度会出现大量单细胞从而造成分化或死亡。无论哪种方案，一次操作不要超过一个 6 孔板，当完全培养基加入后要迅速吸出，细胞在完全培养基中会很快贴壁，所以接种细胞时操作要迅速。

9. 从培养箱中取出预热的 6 孔板，吸弃 VTN 包被溶液，向每孔中加入 2 mL 复温的 Bleb 培养基。
10. 将细胞悬液轻轻摇匀，按预先设定的传代比例均匀分配于 6 孔板中。

注意：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，建议按照 1:10 进行传代，如果密度偏低，则可提高传代比例；密度偏高，则降低传代比例。

11. 水平十字摇匀 6 孔板三次，放入 37°C、5%CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中，再次水平十字摇匀 6 孔板三次，培养过夜。
12. 18-24 h 后更换新的完全培养基，此后每天换液，3-5 天后继续传代或冻存。

注意：细胞汇合度达 85% 左右即可传代，一般情况下每 4 天传代一次，即使克隆团较小，汇合度不足，也不要连续培养超过 6 天。细胞汇合度较低，但干细胞集落较大，中央细胞生长不良时也应进行传代。

细胞冻存

1. 在操作前将程序降温盒放入 4°C 冰箱内预冷。
2. 当细胞汇合度达 85% 左右即可收获冻存，一般 6 孔板可收集约 $2-4 \times 10^6$ 个活细胞/孔，可冻存 2-4 管。
3. 取出 4°C 冰箱的冻存液，置于室温复温，使用前注意摇匀。
4. 吸取细胞培养上清，向每孔中加入 2 mL 的 PBS，洗涤细胞，注意动作轻柔，清洗全面。
5. 吸去 PBS，向每孔中加入 1 mL EDTA 传代工作液，迅速铺匀，保证充分接触细胞表面。
6. 置于 37°C 培养箱中孵育 3-5 min，显微镜下观察，当大部分细胞变圆变亮，且细胞尚未漂起时终止消化。
7. 消化结束，轻轻取出 6 孔板，吸弃 EDTA 传代工作液。
8. 向每孔中加入 1 mL Bleb 培养基，拍打 6 孔板侧壁，使细胞脱离培养表面，吸取细胞悬液转移至 15 mL 离心管中，160×g 离心 4 min。
9. 吸弃上清，摇匀复温的冻存液，每管加入 2-4 mL 冻存液，轻弹离心管底部，使细胞分散，随后吸取细胞悬液加入冻存管中。

注意：细胞冻存时一般采用大克隆传代方案，以提高冻存后复苏成功率。

10. 将冻存管放入预冷的程序降温盒中，再将程序降温盒放入 -80°C 冰箱中。
11. 8 h 后即可将细胞转移入液氮长期保存。

注意：细胞不可长期保存在 -80°C 冰箱中。建议在 -80°C 冰箱中的保存时间不超过 48 h。

赛业（广州）生物科技有限公司保留 OriCell® 细胞培养产品技术文件的所有权利。

没有赛业（广州）生物科技有限公司的书面许可，本文件的任何部分，

不得改编或转载用作其他商业用途。