

hiPSC/hESC 培养基-ncEpic

使用说明书

一、产品简介

ncEpic hPSC Medium 是一种适用于无饲养层培养、化学成分明确、并且不含动物源蛋白的人多能干细胞 (hESC/hiPSC) 完全培养基。hESC/hiPSC 在 ncEpic hPSC Medium 中可以快速增殖，而分化的细胞则在该培养基中生长较慢，从而选择性扩增并获得高纯度人多能干细胞。

二、产品信息

表一：ncEpic 人多能干细胞培养基产品说明

产品信息	货号	规格	储存条件
ncEpic hPSC Medium 套装包含:	RP01001	1 Kit	2°C ~ 8°C*
ncEpic hPSC Basal Medium	RP01001-1	496 mL	2°C ~ 8°C
ncEpic hPSC Supplement (125×)	RP01001-2	4 mL	-20°C或-80°C

*将基础液和添加物混匀配置成完全培养基，可在 2°C ~ 8°C 中存储，2 周内用完。

三、试剂材料

表二：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
Vitronectin	首宁生物	RP01002
hPSC Cryopreservation Medium	首宁生物	RP01003
hPSC Dissociation buffer	首宁生物	RP01007
Blebbistatin (10mM)	首宁生物	RP01008
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
梯度程序降温盒	Thermo Sci.	5100-0001

四、试剂准备

(一) ncEpic hPSC 完全培养基配制 (500 mL)

1. 在 4°C 解冻 ncEpic Supplement, **不要在 37°C 条件下解冻。**
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

3. 完全培养基可置于 4°C 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。

(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°C) 解冻 Vitronectin。

TIPS: 解冻后的 Vitronectin 在 4°C 最多储存 2 周。也可以分装, 储存在 -20°C 或 -80°C, 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 $\text{cm}^2/\text{孔}$, 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°C 或 -80°C 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°C) 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°C 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°C) 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 Corning® Matrigel® 包被 6 孔板为例)

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 $\text{mg} / 11.3 \text{ mg}/\text{mL} = 0.265 \text{ mL}$ 。分装数量 = 10 $\text{mL} / 0.265 \text{ mL} = 37.74$ 。

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 μL 无菌吸头; EP 管架, 均置于 -20°C 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°C 冰箱过夜解冻, 当 Matrigel 完全解冻即可开始分装。
TIPS: Matrigel 仅在 4°C 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°C 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、日期和操作人员 ID。
2. 1000 μ l 无菌吸头置于 -20°C 冰箱中预冷 1 h, 取出一支冷冻的 Matrigel (3 mg) 置于 4°C 冰箱解冻至完全化冻。
3. 准备装满碎冰的冰盒, 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°C 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°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 ncEpic 完全培养基, 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+ ncEpic 完全培养基 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 ncEpic 完全培养基, 之后每天更换培养基。

表 3: 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	ncEpic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

*hPSC 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。

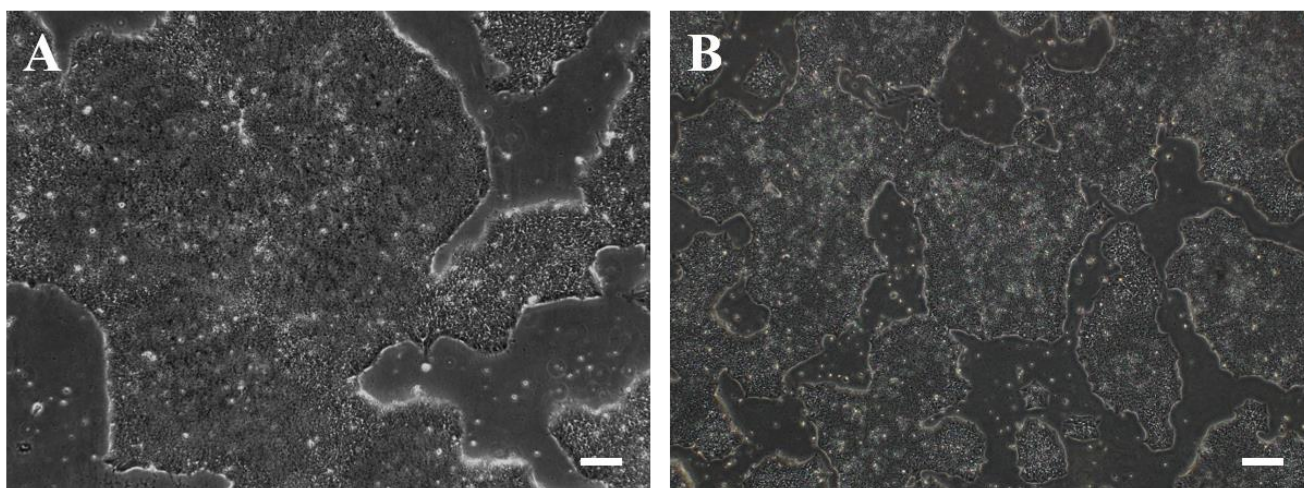


图 1: hiPSC 克隆汇合度 85%左右, A-Matrigel Plate; B-Vitronectin Plate。标尺: 200μm

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 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 (~25°C)。

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

TIPS: 2 mL 的 ncEpic 培养基加入 0.5 μ l Blebbistatin (10 mM)。

- 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。
- 加入 2mL/孔的 EDTA 传代工作液使溶液完全覆盖孔底。
- 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。

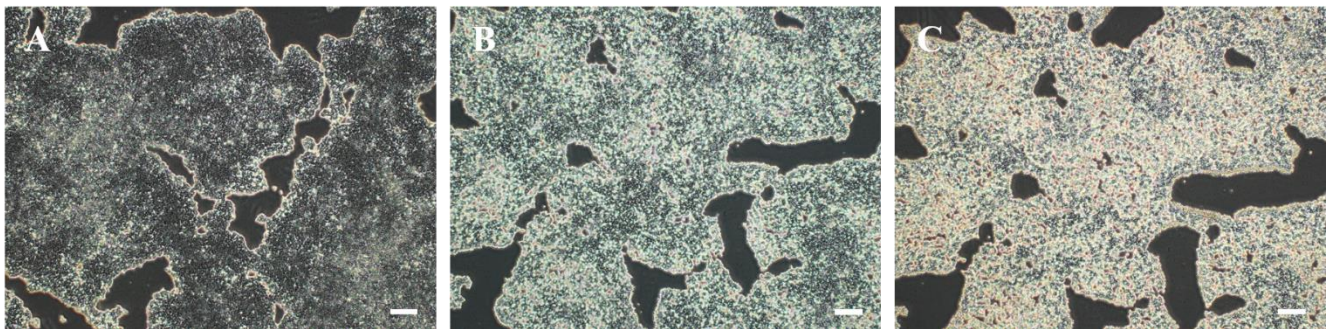


图 2: (A) EDTA 消化 4 min; (B) EDTA 消化 6 min; (C) EDTA 消化 8 min。标尺: 200 μ m

- 消化结束后轻轻的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。
- 及时加入 2 mL/孔预温的 Blebbistatin+ncEpic 完全培养基，水平十字摇晃 6 孔板使细胞脱离基质。

TIPS: (1) 加入 Blebbistatin +ncEpic 完全培养基时，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 ncEpic 培养基加入后要快速吸出。EDTA 传代工作液的效果在 ncEpic 培养基加入后会很快被终止，在 ncEpic 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必须快速。

10. 接种:

10.1 吸弃 6 孔板中的 Vitronectin 溶液，加入预温的 Blebbistatin+ncEpic 完全培养基 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+ncEpic 完全培养基中悬浮定容到 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。

- 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。
- 18-24 小时后更换新 **ncEpic 完全培养基**，此后每天换液，4-5 天后继续传代或冻存 (图 3-4)。

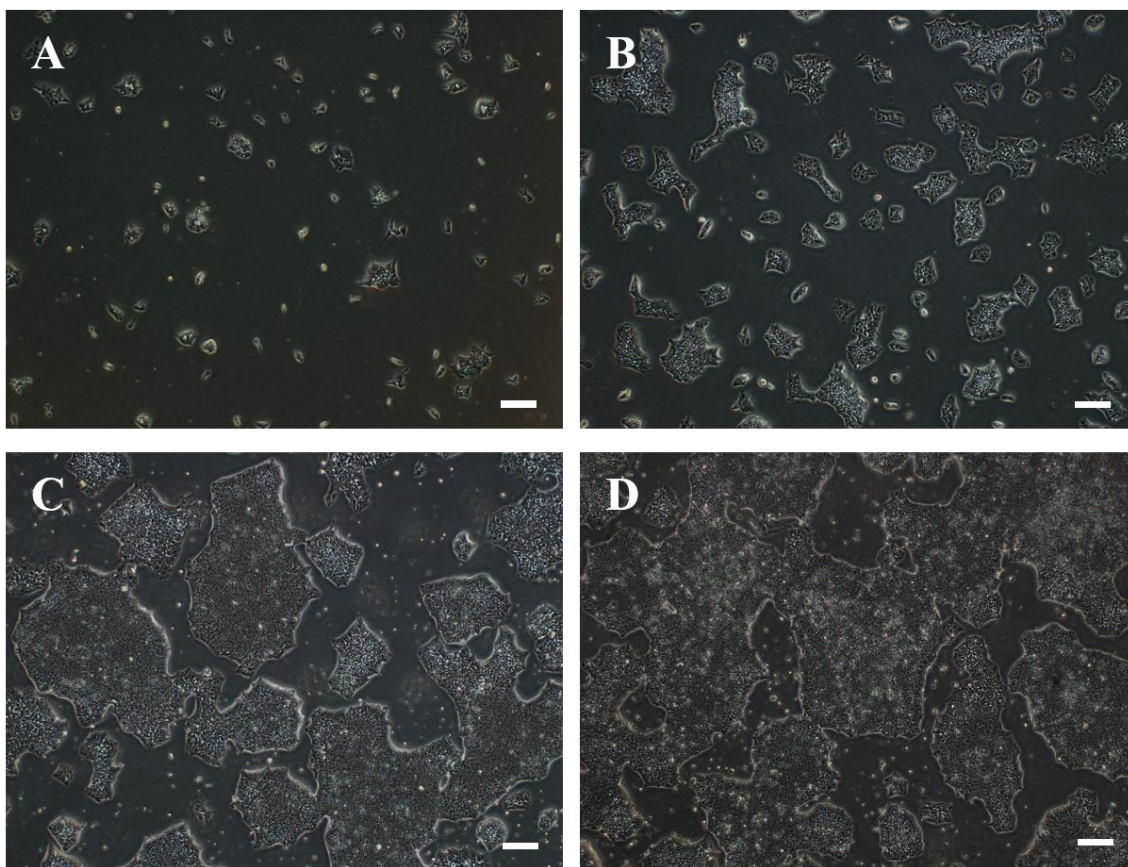


图 3: ncEpic 人多能干细胞培养基连续培养的 hiPSC 细胞形态图示, Vitronectin Plate。

A、B、C、D 分别为培养第 1、2、3、4 天时, hiPSC 的形态图示。标尺: 200 μm 。

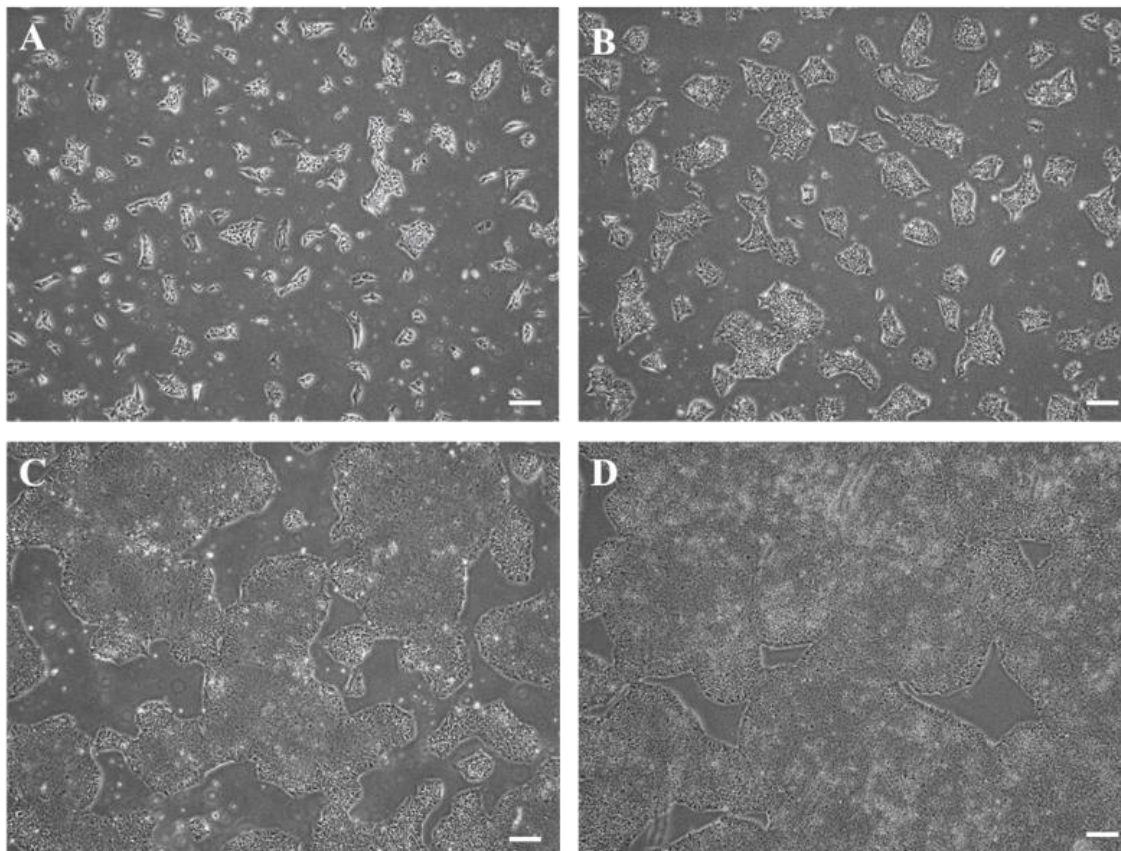


图 4: ncEpic 人多能干细胞培养基连续培养的 hiPSC 细胞形态图示, Matrigel Plate。

A、B、C、D 分别为培养第 1、2、3、4 天时, hiPSC 的形态图示。标尺: 200 μm 。

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°C 冰箱中的 hPSC 冻存液, 置于室温预温, 使用前注意摇匀。

TIPS: hPSC 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, 造成冻存细胞不稳定。

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 传代工作液, 将细胞置于 37°C 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 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、其它培养体系中 hPSC 更换为 ncEpic 培养条件的适应

其他无饲养层条件培养的 hPSC 可以在细胞状态良好时, 按照原培养基与 ncEpic 完全培养基的比例为 1: 1 进行换液培养, 2 次换液后, 用 ncEpic 完全培养基培养 2 ~ 3 代后, 可适应 ncEpic 多能干细胞培养基。

九、问题及解决方案

<p>➤ hPSC培养出现分化</p>
<ul style="list-style-type: none"> ● 确保ncEpic完全培养基储存于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ncEpic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。
<p>➤ 能否用Dispase或胶原酶传代hPSC</p>
<ul style="list-style-type: none"> ● 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。
<p>➤ hPSC传代后不贴壁或贴壁率低</p>
<ul style="list-style-type: none"> ● 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/Matrigel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。
<p>➤ 换液后细胞漂起</p>
<ul style="list-style-type: none"> ● 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。
<p>➤ 孔内hPSC克隆团分布不均匀</p>
<ul style="list-style-type: none"> ● 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。