



BiozellenCM[®] 人多能干细胞培养基 (BiozellenCM[®] Human Pluripotent Stem Cell Medium)

Catalog No B-SM-00002-500

Specification 500ml

Storage 2-8°C, 12个月

一、产品介绍

BiozellenCM[®] 人多能干细胞培养基是一款配方优化、化学成分明确、专用于无饲养层培养体系下的人类诱导多能干细胞 (Induced pluripotent stem cells, iPSCs) 或人类胚胎干细胞 (Human embryonic stem cell) 的无血清培养液。本产品有助于干细胞克隆的快速形成和扩展 (Colony formation and expansion), 并且连续传代 50 次后其自我更新能力和未分化状态无改变。

二、产品信息

名称	货号	规格	储存温度&质保期
BiozellenCM [®] 人多能干细胞基础培养基	B-SM-00002-500	500 mL	2-8°C, 避光保存12个月
BiozellenCM [®] 人多能干细胞培养基添加剂 (50×)	B-SM-00002-A	10 mL	-20°C, 避光保存12个月

三、用前须知

- 初次使用时, 37°C水浴解冻人多能干细胞培养基添加剂 (B-SM-00002-A), 解冻后的各组分试剂或一次性配置并使用, 或分装于-20°C冻存 (不超过12个月);
- 人多能干细胞培养基配置: 按照2%的比例, 将解冻后的人多能干细胞培养基添加剂 (B-SM-00002-A) 添加至人多能干细胞基础培养基中, 混匀后置于 2-8 °C避光保存, 建议 1个月内使用。如规定时间内不能用尽, 建议分装于-20°C冻存 (不超过12个月)。

四、iPSC 培养方法步骤

一、基质胶包被细胞孔板

- 提前一天将基质胶 (B-P-00011) 至于4°C冰箱中解冻。解冻后的基质胶凝胶始终置于冰上, 并使用预先冷却的培养基和移液器, 以避免产品凝胶化。
- 用冷的DMEM/F12 基础培养基稀释基质胶 (稀释比例为1:50), 以 1mL/孔加入预冷的 6孔板中, 轻轻摇动板子以确保混合液均匀地覆盖在板上。
- 将 6孔板转移到37°C的培养箱中过夜孵育 (孵育1-2小时后即可使用板子, 但过夜孵育更适合细胞培养。涂层的板子可在4°C保存, 并在涂层后的一周内使用。使用板子前应将涂层液吸去);
- 使用前吸去涂层上方的液体。

*重要提示: 请勿使孔板干燥。

二、iPSC 细胞复苏

- 将iPSC冻存管放在 37 °C 的水浴中快速融化细胞, 并在水浴时不停摇晃冷冻管, 以确保快速解冻。

- 2、开盖前用 75%乙醇或等效消毒剂对冷冻管进行消毒。
- 3、用无菌移液管将冷冻保护剂 / 细胞混合物转移到15 mL离心管中。在室温下缓慢地逐滴向离心管中加入10 mL 适当的培养基。（可最大限度地减小对细胞的渗透冲击压，并且有助于确保尽可能温和地处理细胞）
- 4、将细胞以300 x g 离心 3 分钟，小心吸弃上清液。
- 5、用含有ROCK 抑制剂的培养基（终浓度10 μ M）轻轻重悬 iPSC，然后将其转移到铺好的 6 孔板中。轻轻摇动板子以均匀分布细胞（每孔细胞密度调整为1 \times 10⁶个细胞）；
- 6、将 6 孔板放回 37 $^{\circ}$ C 的培养箱中培养；
- 7、第二天吸弃培养液，添加不含 ROCK 抑制剂的培养基继续培养细胞。

*提示：不推荐在细胞培养中使用抗生素，因为它们可能干扰细胞及其分化潜能；ROCK抑制剂的加入有利于提高复苏细胞活性。

三、iPSC细胞传代

- 1、将无菌DPBS、温和型细胞消化液（B-SM-00003-100）和人多能干细胞培养基温热至 37 $^{\circ}$ C。
 - 2、吸弃培养基，加入 DPBS 漂洗细胞两次。
 - 3、向每孔加入1 mL 温和型细胞消化液。将板在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 4 min。
 - 4、拍打板底部并在显微镜下观察大部分细胞变圆、脱落时，小心加入 5mL 人多能干细胞培养基中和。
 - 5、（如大部分细胞仍贴壁）将平板放回 37 $^{\circ}$ C 培养箱中再孵育 4min。
 - 6、将细胞以300 x g 离心 3 分钟，小心吸弃上清液。
 - 7、将细胞重悬于 1mL 含有10 μ M ROCK 抑制剂的新鲜培养基中，取10 μ L细胞悬液计数。
 - 8、根据实验需要加入适量的含有10 μ M ROCK 抑制剂的新鲜培养基，重悬细胞后加入已包被的 6孔中
- *提示：6 板每孔 5 \times 10⁴ - 1 \times 10⁵个细胞。
- 9、第二天吸弃培养液，添加不含 ROCK 抑制剂的培养基继续培养细胞。此后每 2 天更换一次培养基。细胞一般5-7天传代一次。

四、iPSC细胞冻存

- 1、准备无菌细胞冻存管、程序性冻存盒；DPBS、温和型细胞消化液（B-SM-00003-100）、无血清细胞冻存液和人多能干细胞培养基提前预热。
 - 2、为提高冻存活率，建议对处于对数生长期（汇合度70-80%）的人多能干细胞培养基进行冻存操作。
 - 3、取出细胞培养孔板，吸弃培养基后加入 DPBS 漂洗细胞两次。
 - 4、向每孔加入1 mL 无酶消化液。将板在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 4 min。
 - 5、拍打板底部并在显微镜下观察大部分细胞变圆、脱落时，小心加入 5mL 人多能干细胞培养基中和。
 - 6、（如大部分细胞仍贴壁）将平板放回 37 $^{\circ}$ C 培养箱中再孵育 4min。
 - 7、将细胞以300 x g 离心 3 分钟，小心吸弃上清液。
 - 8、将细胞重悬于 1mL 含有10 μ M ROCK 抑制剂的新鲜培养基中，取10 μ L细胞悬液计数。
 - 9、根据细胞总数加入适量的含有10 μ M ROCK 抑制剂的细胞冻存液，重悬后以 1mL分装至细胞冻存管中。
- *提示：一般 6 孔板的单孔产生约1-2 \times 10⁶个细胞。建议每个冷冻管冷冻约1-2 \times 10⁶个细胞。
- 10、将细胞冻存管放入程序性冻存盒中，并转移到-80 $^{\circ}$ C的超低温冰箱中过夜。将细胞再转移至液氮罐中。

五、声明

仅供研究使用