

**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℃ , 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℃, 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℃, 避光保存12 个月 |

## 三、用前须知

- 初次使用时, 37℃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℃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℃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℃冻存 ( 不超过12个月 )。

## 四、iPSC 培养方法步骤

### 1、基质胶分装与孔板包被

- 应分装和冷冻保存 BiozellenGel 干细胞基质胶 ( B-P-00011-10 ), 分装后的小包装可在-20℃ 下最多储存24 个月。
- 提前一天将分装的基质胶至于4℃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。
- 用预冷的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℃的培养箱中至少孵育1h。在培养板可供使用之前, 请勿移除包被液。如不立即使用, 可将包被孔板密封, 放置于2-8℃最多储存7 天。
- 使用前吸弃包被液。如已将培养板在 2 - 8℃下储存, 则在移除包被液之前, 将培养板在培养箱 (37℃) 下放置 30 min。

### 2、iPSC 细胞复苏

- 将 iPSC冻存管放在 37℃ 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。
- 开盖前用 75%乙醇或等效消毒剂对冷冻管进行消毒。
- 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。再吸6 mL 预温的人多能干细胞培养基, 并轻柔混匀。
- 将细胞以300 x g 离心 3 min, 小心吸弃上清液。

(5) 用含有Y27632的培养基(终浓度10 $\mu$ 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;

(6) 将 6 孔板放回 37°C 的培养箱中培养;

(7) 每天更换培养基(不含Y27632)。在解冻后大约 5 - 7 天内检查可进行传代的未分化集落(有密集的中心)。

### 3、iPSC细胞传代

当细胞集落变得较大、中心变得密集和明亮(对比其边缘)而相邻的集落开始融合时,这时可进行传代。根据接种的细胞团的大小和密度,传代周期为 5 天左右。如果太早对集落进行传代或传代太过频繁,则细胞可能吸附不好、产量将会减少且细胞可能分化。如果太晚对集落进行传代,培养物将开始显示分化迹象(特点是细胞类型出现不同的形态)。

(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室温。

(2) 吸弃培养基,小心加入 2 mL DPBS 缓冲液漂洗细胞,稍晃匀后即吸弃漂洗液。

(3) 向每孔加入1 mL 温和型细胞消化液。将板在 37°C 下孵育 3-5 min。

(4) 当显微镜下观察大部分细胞变圆、脱落时,小心加入 5 mL DMEM/F-12或人多能干细胞培养基终止。

(5) 使用移液枪小心吹打打孔底细胞,并将细胞悬液吸取至15 mL离心管中,300 x g 离心 3 min,小心吸弃上清液。

(6) 根据传代比例,吸取适量的含有10  $\mu$ M Y27632的人多能干细胞培养基重悬细胞,并接种至新的包被孔板中。

备注:一般传代周期为 5 天左右,传代比例为 1:3-1:6。如果集落过于密集或过于稀疏,则下一次传代时相应地调整传代比例。

(7) 每天更换培养基(不含Y27632)。

### 4、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温热至室温。

(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 漂洗细胞一次。

(4) 向每孔加入1 mL 温和型细胞消化液。将板在 37°C 下孵育 3-5 min。

(5) 当显微镜下观察大部分细胞变圆、脱落时,小心加入 5 mL DMEM/F-12或人多能干细胞培养基中和。

(6) 使用移液枪小心吹打打孔底细胞,并将细胞悬液吸取至15 mL离心管中,300 x g 离心 3 min,小心吸弃上清液。

(7) 将细胞重悬于 1mL 含有10  $\mu$ M Y27632的人多能干细胞培养基中,取10 $\mu$ L细胞悬液计数。

(8) 300 x g 离心 3 min,小心吸弃上清液。根据细胞总数加入适量预冷的无血清细胞冻存液(含10  $\mu$ M Y27632),重悬后以 1mL分装至细胞冻存管中。

备注:建议冻存比例为1-2  $\times$  10<sup>6</sup> /管。

5、将细胞冻存管放入程序性冻存盒中,并转移到-80°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