

## 多能干细胞无血清培养基 NutriStem® hPSC XF Medium

**1 目的：**利用多能干细胞无血清培养基，长时间培养人类多能干细胞 (hPSC) 支持细胞增生并且维持细胞多能性。

\* 人类多能干细胞 (hPSC) 包含人类胚胎干细胞 (hESC) 及人类诱导多能干细胞 (hiPSC)。

**2 材料：**人类多能干细胞 (hPSC)。

**3 主要仪器：**生物安全柜，CO<sub>2</sub> 培养箱，6 孔培养板。

**4 试剂：**

**表 1：建议选用试剂**

品牌	货号	名称	规格	保存条件
Biological Industries	05-100-1A	NutriStem® hPSC XF Medium 多能干细胞无血清培养基	500ml	-20°C
Biological Industries	05-753-1F	LaminStem™ 521 重组层粘连蛋白	1ml	-20°C
Biological Industries	03-048-1C	SBTI Solution (50x) 大豆胰酶抑制剂 (50 倍浓缩液)	20ml	-20°C
Biological Industries	03-079-1B	Recombinant Trypsin-EDTA solution 重组胰酶	100ml	常温
Biological Industries	02-020-1A	DPBS, with Ca <sup>2+</sup> and Mg <sup>2+</sup> 含钙/镁离子 DPBS 缓冲液	500ml	4°C
Biological Industries	01-862-1B	0.5M EDTA Solution 0.5M EDTA 溶液	100ml	常温
Biological Industries	05-710-1B	CryoStem™ hPSC Freezing Medium hPSC 无血清冻存液	100ml	4°C

### 技术支持

电话：4008203979 干细胞应用专家 QQ：3007271691

BI 中国市场部：上海道鹏生物科技有限公司

电话：021-58785545 www.xpbiomed.com



Biological Industries	02-023-1A	DPBS (w/o Ca & Mg) DPBS缓冲液	500ml	常温
Biological Industries	01-172-1A	DMEM/F-12 (1:1) DMEM/F-12 培养基	500ml	4°C

## 5 NutriStem® hPSC XF Medium 准备

- 5.1 在 2-8°C 或室温下解冻 NutriStem® hPSC XF Medium, 即可使用。
- 5.2 将 NutriStem® hPSC XF Medium 储存在 2-8°C, 2 周内使用完毕。
- 5.3 使用前, 请将 NutriStem® hPSC XF Medium 加热至室温 (15-30°C), 为了确保介质的稳定性, 只需加热所需的量。
- 5.4 如需分次使用, 请分装成单次使用体积, 并避光保存, 避免反复冻融。

## 6 用基质胶 (Matrigel) 培养 hPSC 细胞

### 6.1 准备基质胶

- 6.1.1 冻存的基质胶需在冰上过夜解冻, 避免成胶。
- 6.1.2 利用预冷的 DMEM:F12 (1:1) 培养基 1:1 稀释基质胶, 并以预冷的无菌移液管混合均匀。
- 6.1.3 混合液需保持在冰上, 分装到预冷的 15ml 离心管, 再保存至-70°C。

### 6.2 制备基质胶预包被培养盘

- 6.2.1 缓慢地在冰上解冻基质胶分装液, 避免成胶。
- 6.2.2 利用预冷的 DMEM:F12 (1:1) 培养基 1:20 稀释基质胶。
- 6.2.3 将 1ml 稀释的基质胶溶液, 加入到 6 孔盘的每个孔盘中, 在室温孵育 1 小时或 2-8°C 孵育过夜。须确保基质胶完全覆盖孔盘表层。

### 技术支持





### 6.3 酵素消化法细胞传代操作程序

建议使用胶原酶 IV (1mg/ml); 若使用其他酵素, 如分散酶 (Dispase) 或重组胰酶, 请自行调整最佳条件。

- 6.3.1 移除培养盘中的培养基, 用已预热 DMEM: F12 (1:1) 培养基轻轻润洗 1 次。
- 6.3.2 每个板孔中加入 1ml 已预热胶原酶 IV (1mg/ml)。
- 6.3.3 在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 5-10 min (孵育时间切勿过长), 并在显微镜下观察细胞形态, 细胞边缘会开始卷曲。
- 6.3.4 吸弃胶原酶溶液, 小心用 DMEM: F12 (1:1) 至少润洗 1 次。
- 6.3.5 每孔加入适量已预热 NutriStem® hPSC XF Medium。
- 6.3.6 用 5ml 玻璃移液管, 轻轻将 hPSC 群落刮下并收集, 重复 3-4 次, 直到所有的 hPSC 悬浮在 NutriStem® hPSC XF Medium。脱落的 hPSC 团块谨慎吸出并移到离心管内。利用细孔径的移液管轻轻吹打 hPSC 细胞, 使细胞形成小团块 (请避免团块太小, 使存活率降低)。
- 6.3.7 准备新基质胶包被 6 孔盘, 小心地用 DMEM: F12 (1:1) 至少润洗 1 次, 每孔加入 3ml NutriStem® hPSC XF Medium。用 5ml 移液管轻轻地将 1ml 细胞接种至每个孔, 使细胞均匀分布在孔盘中, 并放入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。
- 6.3.8 48 小时后, 每天更换一次 2.5-3ml 新的 NutriStem® hPSC XF Medium, 直到 hPSC 细胞形成大细胞群落。

\* 最佳的培养密度: 用 1:6-1:8 传代率, 细胞可分裂 3-4 天 (6 孔盘中的单孔, 可传代一个新 6-8 孔盘); 如果细胞太密集或太稀疏, 请调整细胞接种比率。

#### 技术支持

电话: 4008203979 干细胞应用专家 QQ: 3007271691

BI 中国市场部: 上海道鹏生物科技有限公司

电话: 021-58785545 www.xpbiomed.com



## 6.4 非酵素消化法细胞传代操作程序

### 6.4.1 0.5mM EDTA 分离溶液配置:

50 $\mu$ L 的 0.5M EDTA 与 50ml 无钙/镁离子 DPBS (BI Cat # 02-023-1) 混匀后无菌过滤即可使用; 室温可储存 6 个月。

### 6.4.2 用 2ml 无钙/镁离子 DPBS 润洗传代细胞 6 孔盘 2 次。

### 6.4.3 加入 1ml 0.5mM EDTA 溶液, 旋转孔盘以覆盖整个细胞表面, 并迅速吸出 (此步骤为移除培养环境中的钙和镁离子, 避免影响后续 EDTA 分离细胞效果)。

### 6.4.4 加入 1ml 0.5mM EDTA, 在室温或 37 $^{\circ}$ C 孵育 4-5 分钟 (孵化时间和温度, 不同细胞株会有所不同; hPSC 细胞株, 3-4 分钟室温即可)。

### 6.4.5 以 1ml 枪头吹打细胞 3-4 次, 让细胞集落形成小团块, 谨慎将细胞团块重悬在适量 NutriStem<sup>®</sup> hPSC XF Medium (不要刮或过多的吹打细胞, 避免形成单颗细胞悬浮)。

### 6.4.6 将小的细胞团块按照不同细胞株所需比例 (1:8-1:20), 转移至含 3ml NutriStem<sup>®</sup> hPSC XF Medium 的玻璃粘连蛋白包被孔中。

### 6.4.7 将培养盘放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。

### 6.4.8 48 小时后, 每天更换一次 2.5-3.0ml 新的 NutriStem<sup>®</sup> hPSC XF Medium, 直到 hPSC 细胞形成大细胞集落。(48 小时内不要移动盘子, 可能会使细胞分化)。

## 7 用层粘连蛋白 (Laminin) 培养 hPSC 细胞

层粘连蛋白包被建议浓度为: 0.5-1 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>, 详细说明请参阅该产品说明书。

### 技术支持

电话: 4008203979 干细胞应用专家 QQ: 3007271691

BI 中国市场部: 上海道鹏生物科技有限公司

电话: 021-58785545 www.xpbiomed.com

