

IPS Cell Serum-Free
Culture Medium Kit

IPS 细胞无血清培养基套装

/ 使用说明文件 /

— Instruction manual —



使用前请仔细阅读本操作说明

友康厚德生物制品（北京）有限公司

YOCOON 友康®

IPS细胞无血清培养基套装说明书

【产品名称】

IPS 细胞无血清培养基套装

【产品规格】

产品名称	包装规格	保存条件	保质期	产品货号
IPS 细胞无血清培养基基础	400 mL/ 瓶	2-8℃, 避光保存	12 个月	NC0401.0101
IPS 细胞无血清培养基添加剂	100 mL/ 瓶	-20℃, 避光保存	12 个月	NC0401.0101.S

【用途与描述】

本培养基用于培养经过重编程诱导成的人多能干细胞，并能够连续传代，保持其干性。

细胞株描述：细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库（SCSP-1301），细胞代数 17 代。

【产品性能】

1. 复苏后转移至此培养基中能够连续稳定传 10 代以上。
2. 细胞传代时间为 3 ~ 4 天。
3. 细胞表型：TRA-1-60 ≥ 90%，OCT4 ≥ 95%。
4. 细胞形态：
 - 形状：圆形或椭圆形，边界清晰，边缘光滑。
 - 大小：集落直径通常在 50~500 μm 之间，视培养时间和密度而定。
 - 厚度：集落呈扁平但略微隆起的二维结构，中央稍厚。
 - 外观：在显微镜下呈 "鹅卵石" 状，细胞密集排列。

【产品使用说明】

1. 试剂和材料

产品	品牌 / 货号
IPS 细胞无血清培养基套装	YOCON/NC0401.0101、NC0401.0101.S
StemPro™ Accutase™ 细胞解离试剂	Thermo/A1110501
GMP 级 IPS 细胞无血清冻存液	YOCON/SP0401.0101
DPBS(不含钙镁离子)	YOCON/BS0402

DMEM/F12	YOCON/CM0405
Y27632	MCE/HY-10583
MatriGel	Corning/354277
另需细胞培养板 / 瓶 / 皿, 15mL 离心管和移液管等细胞培养耗材。	

2. 试剂准备

培养基配制：

将培养基添加剂室温融化，按 1:4 比例加入培养基基础中即为 IPSC 完全培养基，使用前需在室温下预温 20~30min，时间不宜过长，切勿强光或紫外照射。

IPSC 完全培养基 2~8℃可避光保存 30 天，由于蛋白在溶液中易降解，所以最好能在 2 周内用完。科研小量、多次使用时，建议添加剂融化后立即分装（添加剂出厂后仅允许冻融一次）。完全培养基配制完成后，减少预温次数，根据需求可提前进行分装。

Matrigel 工作液配制和包被：

根据康宁官网的批次报告进行分装。分装后的小包装可在 -80℃下最多储存 6 个月。

取出一份基质胶加入到 36 mL 的 DMEM/F12 中，包被四个 6 孔培养板（1.5 mL / 孔）。

（1）将一份基质胶从 -80℃取出，在 4℃冰箱中的冰上解冻，直到成为液体（同时预冷移液管或枪头）。

（2）将装有 36mL 的 DMEM/F12 培养基的离心管插入冰中（包被过程中保持低温，避免因局部温度过高凝固而影响包被质量）。

（3）吸取 1mL 预冷 DMEM/F12 加入含有基质胶的小管中，移液枪吹打混匀 20 次后，吸入到预冷培养基（50mL 离心管）中，移液管吹打混匀 20 次。

（4）立即用稀释后的基质胶溶液包被 6 孔板。

（5）包被后，需在 37℃细胞培养箱中放置 1 小时，可立即使用。如果不立即使用，将 6 孔板用封口膜封好后，放入 4℃冰箱中最多储存 7 天。如果基质胶溶液并未完全覆盖表面，则无法实现最佳的 IPSC 培养；因此，不建议使用含有溶液已蒸发区域的培养板。

（6）使用时，轻轻地培养板向一个角落倾斜，吸取包被液上清，注意不要碰到底面包被好的基质胶。立即加入培养基和细胞。如果已将培养板在 4℃下储存，在使用之前，还需将培养板在培养箱（37℃）下放置 30~60 分钟。

配制 Y27632 溶液：

Y27632 粉末溶解，配成浓度为 10 mM 的储存液。分装后冷冻于 -20℃，6 个月内使用。

Y27632 提高复苏和传代后的存活率和克隆形成率，所以只在复苏步骤和传代步骤添加，推荐添加的终浓度为 10 μM，换液后不再添加且换液时长不宜超过 24 小时。

3. 复苏hiPS：（以6孔板为例）

（1）提前打开恒温水浴锅（37℃），将 DMEM/F12 放入水浴锅中预温。预温后，取一个 15 mL 离心管中加入 9 mL DMEM/F12 培养基。

（2）在 37℃ 水浴锅中解冻 IPS 细胞，轻柔持续地摇动冷冻管，直到只剩一个小冰晶（约 1~2 min 左右），用 75% 乙醇擦拭冻存管进行消毒。

（3）吸入 1 mL 预热的 DMEM/F12，慢慢滴入冻存管中（减少渗透压损伤），将冻存管中的细胞溶液转移至离心管中。

(4) 室温 (15~25°C), 160g 离心细胞 5 分钟。

(5) 弃上清, 根据实验需求加入相应体积 (2 mL/ 孔) 的 iPSC 完全培养基, 并加入 ROCK 抑制剂 Y27632, 终浓度为 10 μ M (2 μ L/ 孔), 轻轻混匀。复苏细胞推荐接种数 30 万 / 孔。

(6) 吸弃培养皿的包被液上清, 注意不要碰到底面包被好的基质胶。如果已将培养板在 2~8°C 下储存, 则在移除基质胶溶液之前, 将培养板在培养箱 (37°C) 下放置 30~60 分钟。

(7) 将含有细胞的培养悬液加到培养板中, 6 孔板的每个孔中加入 2 mL。

(8) 水平摇晃培养板, 以均匀地将细胞团分布在孔内各处 (细胞团过度集中可能导致细胞分化)。在 37°C、5% CO₂ 和 95% 湿度的条件下培养细胞。

(9) 每天更换 iPSC 完全培养基。

4. 传代hiPS: (以6孔板为例)

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 3~4 天。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) 将培养基和新包被的板子提前预温。

(2) 使用显微镜观察确定分化的区域。用毡制粗头笔或透镜标志器在培养板底部标记这些区域。如果培养物品质优异, 分化的区域不会超过培养孔的 10%。

(3) 用移液枪头刮除或抽取, 去除分化区域。

(4) 从培养板中吸出培养基, 然后加入 2 mL DPBS (不含钙镁离子) 润洗一次。

(5) 每个孔中加入 1 mL Accutase, 覆盖底面, 37°C 培养箱中静置 5 分钟。按照 1:4 的比例加入 iPSC 完全培养基, 终止消化。

(6) 将消化下来的细胞转移至一个 15 mL 离心管中, 160g 离心 5 分钟。

(7) 弃掉上清, 加入适量体积的培养基, 轻轻吹打混匀细胞。

(8) 细胞计数, 然后按照每孔 15~20 万的细胞数进行接种。将包被液吸弃后加入相应体积 iPSC 完全培养基, 并加入终浓度为 10 μ M 的 Y27632。

(9) 水平摇晃培养板, 以均匀地将细胞团分布在孔内各处。在 37°C、5% CO₂ 和 95% 湿度的条件下培养细胞。(细胞团分布不均匀有可能导致细胞过度聚集、分化。)

(10) 每天更换 iPSC 完全培养基。

5. 细胞冻存: (以6孔板为例)

(1) 使用显微镜观察确定分化的区域。用毡制粗头笔或透镜标志器在培养板底部标记这些区域。如果培养物品质优异, 分化的区域不会超过培养孔的 10%。

(2) 用移液枪头刮除或抽取, 去除分化区域。

(3) 吸弃培养基, 然后用 DPBS (不含钙镁离子) 润洗一次。

(4) 每个孔中加入 1 mL Accutase, 覆盖底面, 在 37°C 培养箱中静置 5 分钟。按照 1:4 的比例加入 iPSC 完全培养基, 终止消化。

(5) 将消化下来的细胞转移至一个 15 mL 离心管中, 160g 离心 5 分钟。

- (6) 弃掉上清，加入 1mL 冻存液，轻轻吹打混匀细胞，转移至冻存管中。
- (7) 将冻存管放入 -80℃冰箱中冷冻过夜，转移至液氮中长期保存。

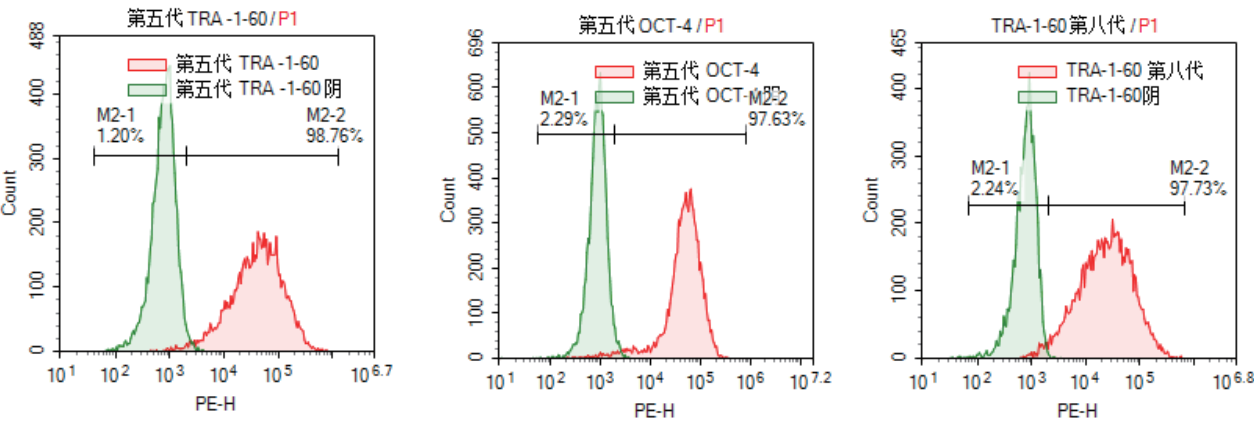
【结果展示】

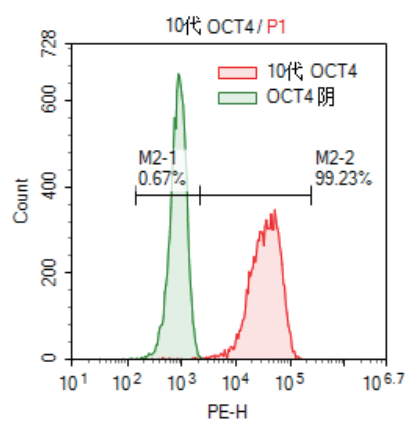
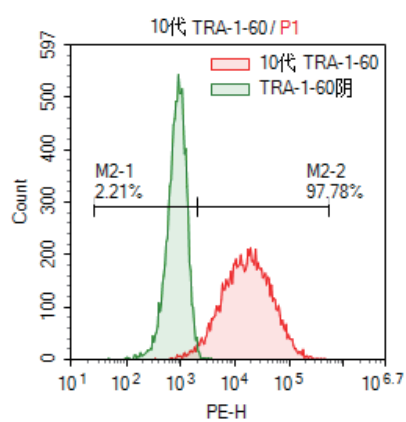
细胞扩增倍数：

代次	培养皿	接种密度 /cm ²	培养基体积 (mL)	收获细胞数	扩增倍数	生长时间 (小时)
2	6 孔板	20800	2	1.3 E6	6.5	72
3		20800		1.87 E6	9.3	72
4		20800		1.39 E6	6.9	72
5		15600		3.55 E6	23.6	96
6		15600		2 E6	13.3	96
7		13500		2 E6	15.3	96
8		20800		1.3 E6	6.5	72
9		15600		2.2 E6	14.6	96
10		20800		2.2 E6	11	72

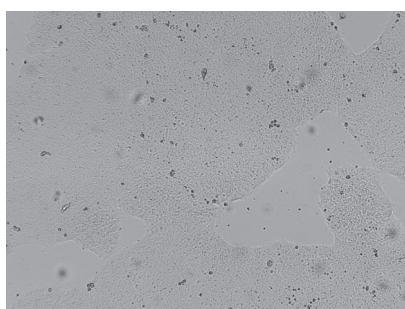
细胞表型：

分组	TRA-1-60	Oct-4
P5	98.76%	97.63%
P8	97.73%	-
P10	97.78%	99.23%

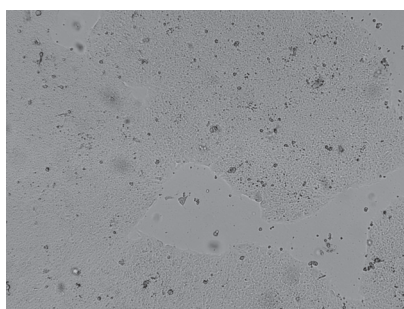




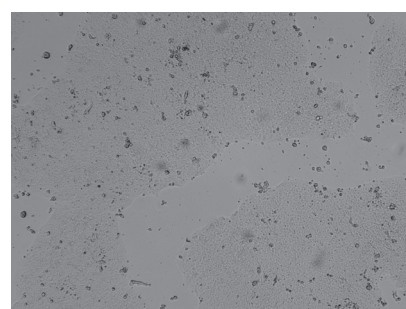
细胞镜下照片:



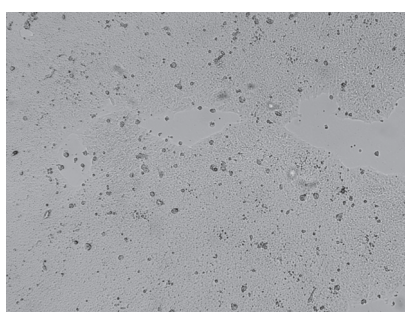
P1



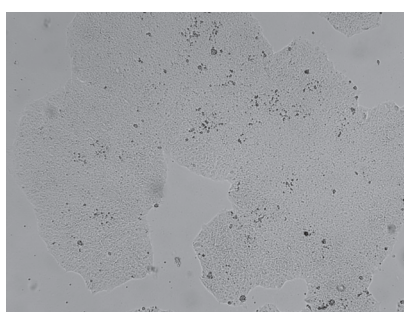
P2



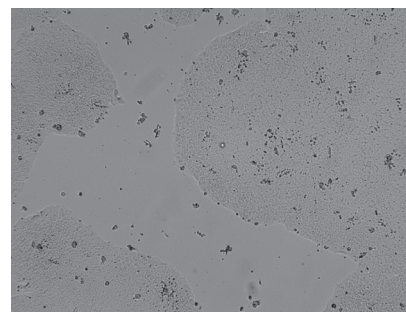
P3



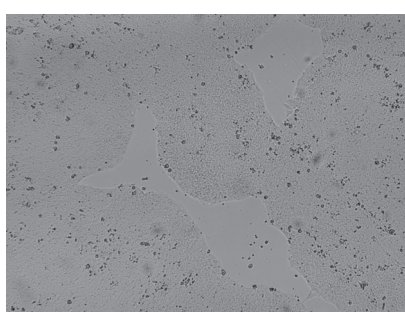
P4



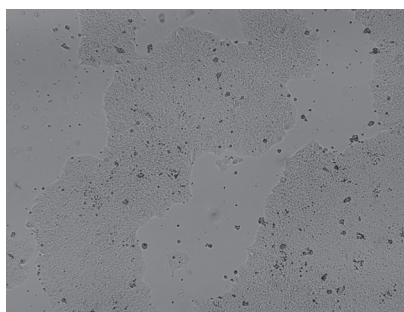
P5



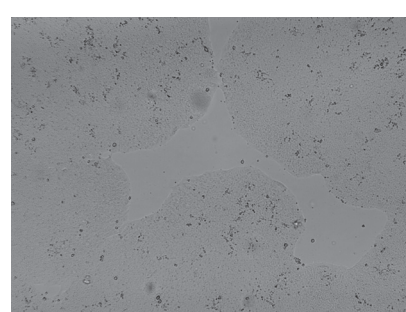
P6



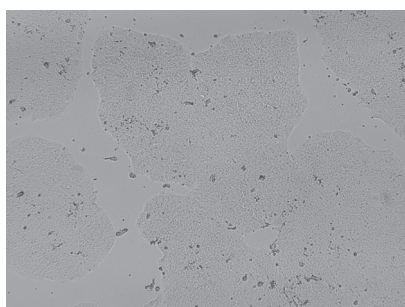
P7



P8



P9



P10

【温馨提示】

1. 基质胶分装、包被全程保持低温。
2. 若不需要完全消化成单细胞，传代时应注意 Accutase 消化时间和吹打次数，或更换其他相对温和的消化液，使细胞处于 2~4 个细胞小团的水平。
3. 传代时，细胞密度不易过高或者过低，保持每孔 10~20 万接种。
4. 完全培养基不能整瓶预温，建议分装使用体积进行预温，分装时需混匀培养基。

【说明书核准日期】 2025年5月7日

【版本号】 1.0.0



文件版本号：2025 -V1.0.0

ISO9001、ISO13485质量体系认证企业

国家高新技术企业

生产企业：友康厚德生物制品（北京）有限公司

生产地址：北京市密云区科技路6号

联系电话：400-001-1266 010-58711655

公司网址：www.yocon.cn

