# 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包含： | RP01001 | 1 Kit | 2℃ ~ 8℃* |
| NcEpic™ hPSC Medium Basal Medium | RP01001-1 | 496 mL | 2℃ ~ 8℃ |
| NcEpic™ hPSC Medium Supplement | RP01001-2 | 4 mL | -20℃或-80℃ |

*将基础液和添加物混匀配置成完全培养基，可在 2℃ ~ 8℃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℃解冻**NcEpic™ hPSC Medium Supplement**，**不要在 37℃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™ hPSC Medium Basal Medium：496 mL**

   **NcEpic™ hPSC Medium Supplement：4 mL**

3. 完全培养基可置于 4℃储存，2 周内使用。

**Tips：可根据实际用量将 NcEpic™ hPSC Medium 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 Vitronectin 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℃）解冻 Vitronectin。

**Tips：解冻后的 Vitronectin 在 4℃最多储存 2 周。也可以分装，储存在-20℃或-80℃，保质期内使用，避免反复冻融。**

3. 分装Vitronectin：推荐按照 1 μg/cm$^2$ 进行包被，6 孔板孔面积为 10 cm$^2$/孔，则 1 块 6 孔板包被需要 60 μg Vitronectin，即 120 μL（500 μg/mL）；建议将 Vitronectin 分装成 120 μL（60 μg）/管，于 -20℃或-80℃保存，每次使用时候取 1 管Vitronectin 可包被 1 块 6 孔板。
4. 取 1 管Vitronectin（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℃）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℃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℃）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 mg/管（足够包被 4 个六孔板）。分装体积（每管）=3 mg / 11.3 mg/mL=0.265 mL。分装数量=10 mL / 0.265 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；1000μL 无菌吸头；EP管架，均置于-20℃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 238μL，则表明 238 μL 可包被 4 块 6 孔板，分装数量=5 mL / 0.238 =21.01。**

3. 将 Matrigel 放置 4℃冰箱过夜解冻，当 Matrigel 完全解冻即可开始分装。

   **Tips：Matrigel 仅在 4℃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 μL 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℃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 ID。

2. 1000 μL 无菌吸头置于-20℃冰箱中预冷 1 h，取出一支冷冻的 Matrigel（3 mg）置于 4℃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 μL 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℃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℃。
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℃）。
3. 取4 mL **NcEpic 完全培养基**，按照1:4000 比例加入1 μL 的 **Blebbistatin**（10 mM），恢复至室温（15~30℃）。
   **Tips：不要在 37℃水浴锅中预温培养基。**
4. 取出 1 支冷冻的细胞置于 37℃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×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℃，5%$CO_2$ 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。

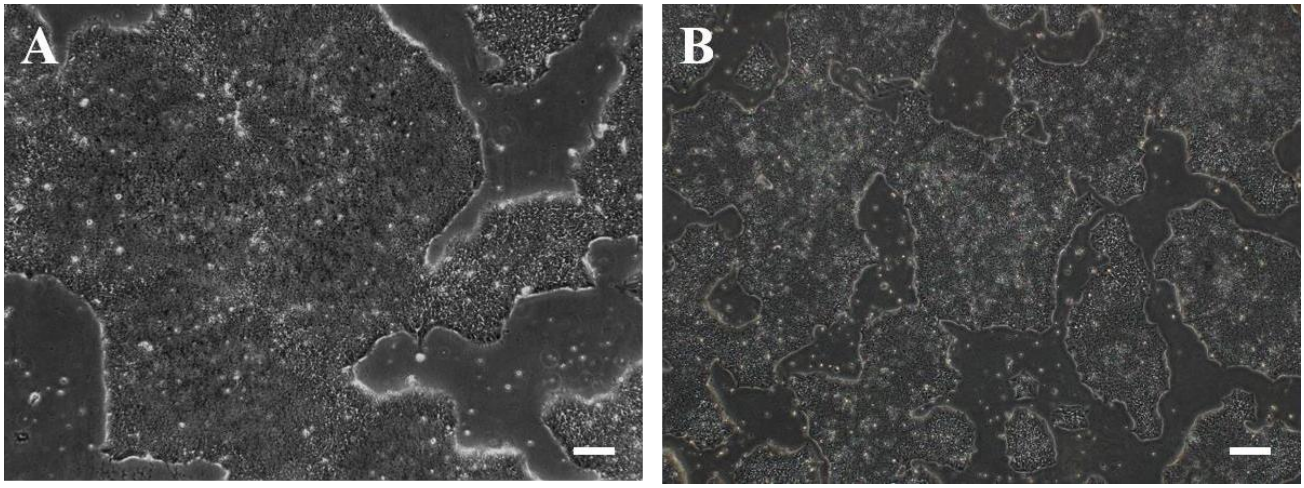


**图 1： hiPSC 克隆汇合度 85%左右，A-Matrigel Plate；B-Vitronectin Plate。标尺：200μm**

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℃）。
4. 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℃）。

**Tips：2 mL 的 NcEpic 培养基加入 0.5 μL Blebbistatin（10 mM）。**

5. 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。
6. 加入 2mL/孔的 EDTA 传代工作液使溶液完全覆盖孔底。
7. 置于 37℃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。**

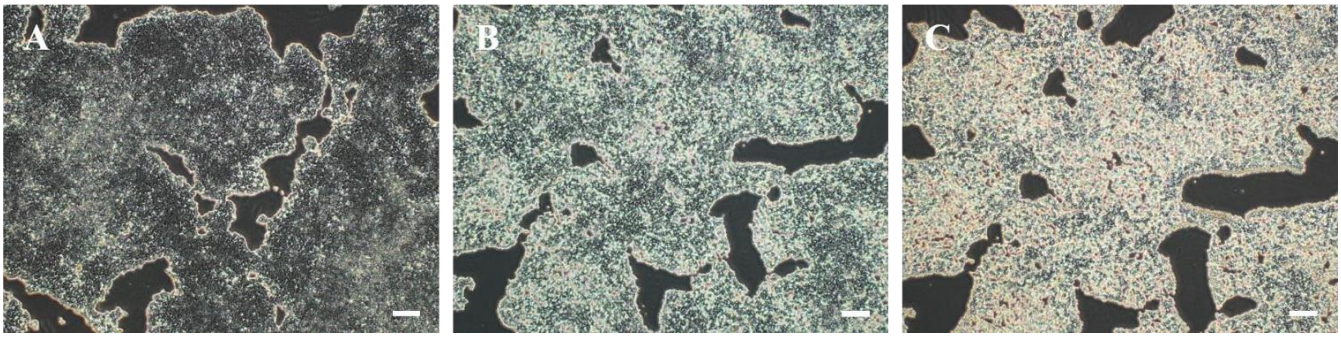


**图 2：（A）EDTA 消化 4 min；（B）EDTA 消化 6 min；（C）EDTA 消化 8 min。标尺：200 μm**

8. 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。

9. 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。**

11. 水平十字摇匀 6 孔板三次，置于 37℃，5%$CO_2$ 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。

12. 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）。

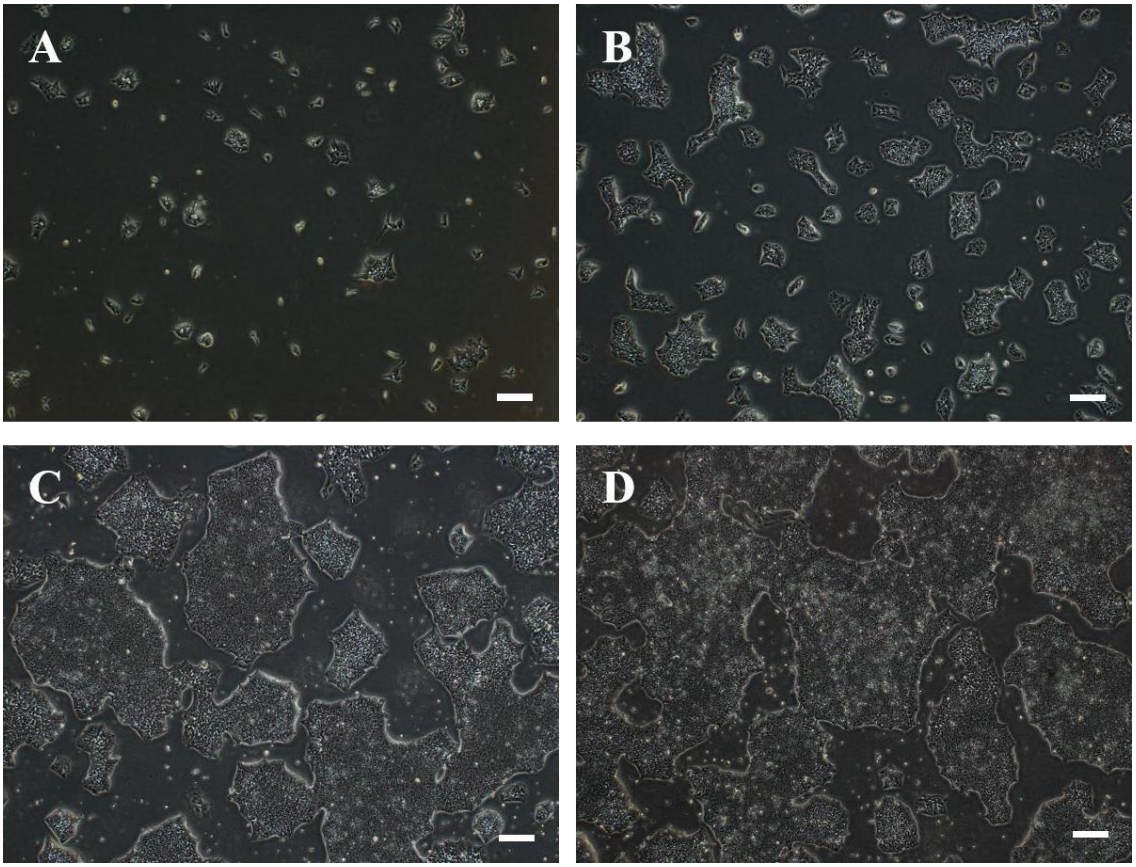


**图 3：NcEpic™ hPSC Medium连续培养的 hiPSC 细胞形态图示，Vitronectin Plate。**

**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。**

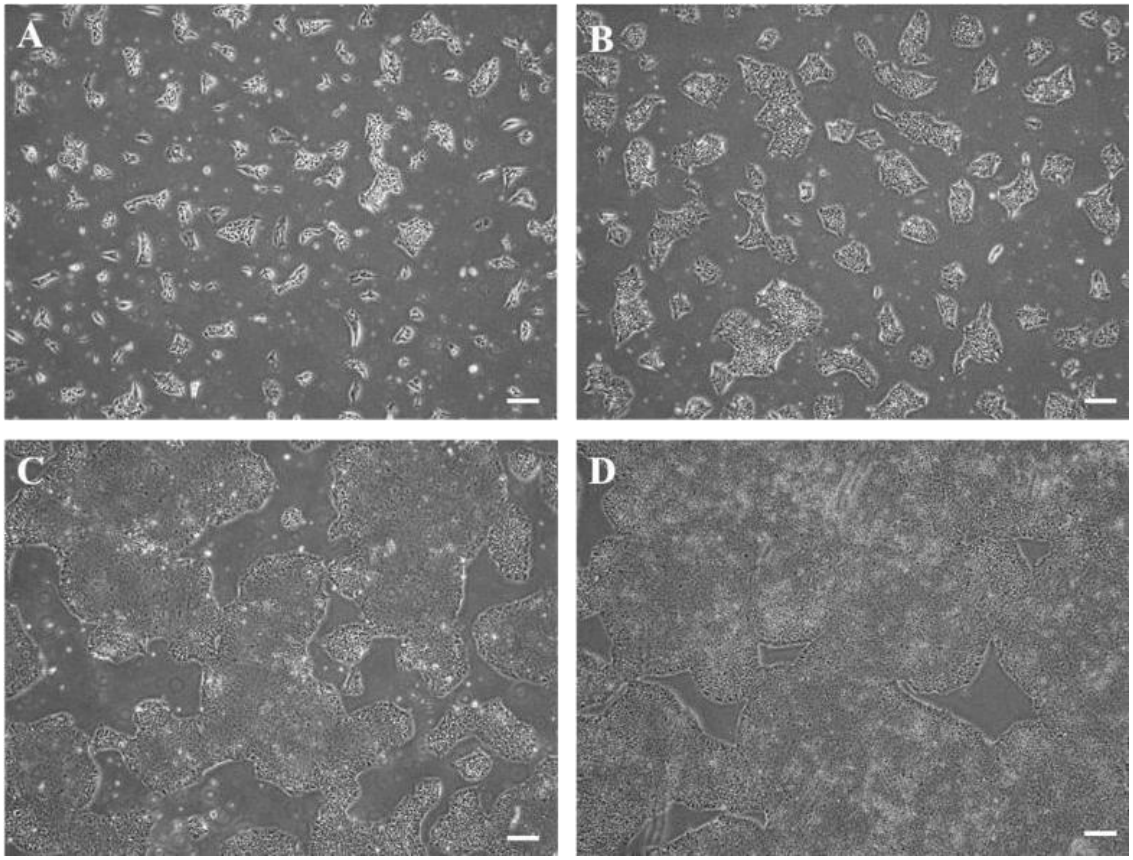


**图 4：NcEpic™ hPSC Medium连续培养的 hiPSC 细胞形态图示，Matrigel Plate。**

**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×$10^6$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℃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℃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℃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℃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™ hPSC Medium。

## 九、问题及解决方案

| ➢ **hPSC培养出现分化** |
| --- |
| ● 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。<br>● 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。<br>● 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5mL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。<br>● 每次观察时避免将细胞从培养箱中取出超过15 min。<br>● 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。 |
| ➢ **能否用Dispase或胶原酶传代hPSC** |
| ● 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。<br>● NcEpic培养体系中的hPSC建议使用用非酶的温和的消化方式传代。<br>● 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。 |
| ➢ **hPSC传代后不贴壁或贴壁率低** |
| ● 传代比例不要过高（>1:20）。<br>● 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。<br>● 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。<br>● 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。<br>● 确保培养基中加入了ROCKi。 |
| ➢ **换液后细胞漂起** |
| ● 接种后18-24小时后进行第一次换液，确保细胞已贴壁良好。<br>● 换液操作要轻柔，避免使细胞团脱离基质。<br>● 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。 |
| ➢ **孔内hPSC克隆团分布不均匀** |
| ● 确保包被的基质均匀的分布于容器底部。<br>● 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。<br>● 再把培养板放置入培养箱时，需再次水平十字摇匀。 |