

hiPSC 复苏、传代换液及冻存的基本操作

一、实验试剂与耗材

名称	品牌	货号	储存温度
StemFlex™ Basal Medium	Gibco	A33493-01	4℃
StemFlex™ Supplement	Gibco	A33492-01	-20℃
DMEM-F12	Gibco	11330032	4℃
Matrigel	Corning	354230	-20℃
Y27632 (rock inhibitor)	Tocris	1254	-20℃
TrypLe Express (TrypLE)	Gibco	12605010	-20℃
DPBS (no Ca^{2+} , Mg^{2+})	thermo	14190144	4℃
DMSO	SIGMA	D2650	4℃

二、溶液配制及其他准备工作

1. matrigel 的使用方法

- 1) **Matrigel 工作液的配制:** 用 DMEM/F12 对 Matrigel 原液按 1/80-1/100 的比例在冰上 进行稀释操作，即得到 Matrigel 工作液。（Matrigel 原液应在冰上进行分装，避免 反复冻融）。
- 2) **用 Matrigel 包被六孔板:** 将 Matrigel 工作液置于冰上，向六孔板中按 1ml/孔的量 加入 Matrigel 工作液，轻晃六孔板使工作液完全覆盖孔板底部。37℃ 下包被 30min。包被后的孔板如果暂时不用，可用封口膜封口后于 2-8℃ 储存，并在 1 周内使用。

保存期间 Matrigel 工作液需始终保持完全覆盖孔板底部。

注：操作时需要将 Matrigel 始终置于冰上，正常状态下 Matrigel 应该是清亮均一的， 若因操作不当导致 Matrigel 变粘稠或呈胶状，则不宜继续使用。

2. stemflex 培养基的配制

将 StemFlex™ Basal Medium 与 StemFlex™ Supplement medium 在 500ml 真空过滤系 统中混合并过滤后，分装至 50ml 离心管中，在 -20℃ 下可长期保存，使用时将培养基从

4℃ 转移至室温即可。避免反复冻融。

三、操作步骤

（一）hiPSC 的复苏（以一管数量为 1M 的细胞复苏到六孔板的两个孔中为例）

1. 提前 30min 把 stemflex 培养基在室温状态复温，打开水浴锅，准备好用 matrigel 包 被的六孔板。

上海葵赛生物科技有限公司

中国（上海）自由贸易试验区巴圣路 160 号 8 号楼 3 单元 6005 电话：13636346891

2. 把冻存管从干冰/液氮中取出，拧紧管盖后立刻放入 37 摄氏度水浴锅中，当管中剩余 一小块浮冰（原体积 1/4 左右）时对冻存管喷酒精，并将其转移至生物安全柜中。
3. 立刻将冻存管中的细胞悬液转移至 15ml 离心管中，右手向管中缓慢加入 9ml DMEM- F12，与此过程中左手晃动离心管；最后用移液管轻柔吹打 3-5 次，保证液体混匀。
4. 200g，5min 常温离心。
5. 在等待离心的过程中将孔板从培养箱中取出，弃去孔板中的 matrigel，并快速向每个 已包被好的孔中加入 1.5ml stemflex 培养基、20 μ l Pen strep 双抗、2 μ l Y27632
（终浓度 10 μ M），备用。
6. 取出离心管，弃掉上清，并向管中加入 1ml stemflex 培养基，用 1ml 移液枪头轻轻吹 打混匀 5-7 次，将肉眼可见的细胞团块打散。取 10 μ l 细胞悬液进行计数。
7. 在六孔板每孔中加入 0.5ml 已混匀的细胞悬液，保证每孔培养基终体积为 2ml。
8. 将六孔板放回细胞培养箱，并十字晃动孔板以使细胞均匀分布在孔板底部，24h 后对细 胞进行 100%换液。
9. 通常情况下数量为 1M 的一管细胞可以在六孔板 2-3 个孔中进行复苏，若是将一管细胞 复苏在三个孔中，则需按 2ml/孔的量对 stemflex 培养基的体积进行调整。

（二）hiPSC 的换液

提前 30min 把 stemflex 培养基在室温状态复温，对 hiPSC 每天 100%换液。如果孔板 中死细胞数量过多，可用 1ml/孔的 DPBS 轻轻冲洗细胞后再进行换液。对细胞每天的状态 做好观察与记录。

（三）hiPSC 的传代

当 hiPSC 的融合度达到 80%左右时需要对其传代（若细胞融合度大于 80%则会开始分 化），传代比例一般为 1: 6。

1. 提前 30min 把 stemflex、DPBS、TrypLE 在室温状态复温，准备好用 matrigel 包被的 六孔板。
2. 弃去孔板中的培养基，并向其中加入 1ml/孔 DPBS 轻轻冲洗后弃去 DPBS。
3. 按 1ml/孔的用量向孔板中加入 TrypLE，37℃ 孵育 5min。当镜下观察到大多数细胞变为 圆球形时即可停止消化。
4. 按 2ml/孔的用量向孔板中加入 DPBS，随即用移液管冲洗孔板底部，并将细胞悬液收集 到 15ml 离心管中。
5. 按 1ml/孔的用量向孔板中加入 DPBS 冲洗孔板底部，并将细胞收集到 15ml 离心管中。
6. 200g，5min 离心。

上海葵赛生物科技有限公司

7. 取出离心管，弃掉上清，并根据收集细胞的量向管中加入若干毫升 stemflex 培养基，用 1ml 移液枪头轻轻吹打混匀 5-7 次，直至肉眼可见的细胞团块消失。取 10 μ l 细胞悬液进行计数，以确定细胞密度。
8. 将孔板从培养箱中取出，弃去孔板中的 matrigel，并快速向每个已包被好的孔中加入 适量 stemflex 培养基、20 μ l Pen strep 双抗、2 μ l Y27632，备用。
9. 在六孔板每孔中加入适量体积已混匀的细胞悬液，保证每孔培养基终体积为 2ml。
10. 将六孔板放回细胞培养箱，并十字晃动孔板以使细胞均匀分布在孔板底部，24h 后对细胞进行 100%换液。

（四）hiPSC 的冻存

- 1-7. 前 7 步的实验操作见（三）hiPSC 的传代 部分。
8. 按照每管预计冻存细胞的数量对加入 stemflex 培养基与 DMSO 的体积进行计算，使
DMSO 体积占冻存液总体积的 1/10，并保证每管冻存液体积为 1 ml。准备好所需数量的 冻存管并预先在管壁写好名称、代数、细胞数量、冻存日期等基本信息。
9. 先补加适量体积的 stemflex 培养基，再加入 DMSO。DMSO 加入后快速地用移液管轻轻 混匀，并快速地将液体转移到每个冻存管中，最后拧紧管盖。
10. 将冻存管放入梯度冻存盒，于 -80℃ 冰箱过夜。次日将细胞转移到液氮中长期保存。