iPSC 无血清培养基（rHSA）套装说明书

| 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

YOCON 友康®

iPSC无血清培养基（rHSA）套装说明书

【产品名称】

iPSC 无血清培养基（rHSA）套装

【产品规格】

产品名称	包装规格	保存条件	保质期限	产品货号
iPSC 无血清培养基基础	400 mL/ 瓶	2~8 ℃，避光保存	12 个月	NC0401
iPSC 无血清培养基添加剂（rHSA）	100 mL/ 瓶	-20 ℃，避光保存	12 个月	NC0402.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），细胞代数为 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 ~ 5 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。
   - 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
iPSC 无血清培养基（rHSA）套装	YOCON/NC0401、NC0402.S
StemPro ™ Accutase ™ 细胞解离试剂	Thermo/A1110501
iPSC 无血清冻存液	YOCON/NC0603
DPBS(不含钙镁离子)	YOCON/BS0402
DMEM/F12	YOCON/CM0405

Y27632	MCE/HY-10583
MatriGel	Corning/354277
超低吸附六孔板	Corning/3471
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 4 ℃或室温融化，不可 37 ℃融化，按 1:4 比例加入培养基基础中即为 iPSC 完全培养基（rHSA），使用前需在室温下预温 15~20 min，时间不宜过长，切勿强光或紫外照射。

iPSC 完全培养基（rHSA）2~8 ℃可避光保存一周，仅限一周内用完。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 36 mL 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 1 mL 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（50 mL 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 14 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，轻轻地将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）

平面培养

（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，直到只剩下一个小冰晶（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 ℃）160g 离心细胞 5 分钟。

（5）弃上清，加入适量完全培养基重悬细胞，计数。根据实验需求将相应体积（2 mL/ 孔）的完全培养基加入离心管中，并加入 Y27632，终浓度为 10 μM，混匀。

（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 ℃下储存，则在移除基质胶溶液之前，将培养板在培养箱（37 ℃）下放置 30~60 分钟。

（7）将含有 Y27632 的完全培养基加入 6 孔板中，每孔 2 mL，接种细胞。复苏细胞推荐接种数 20-40 万 / 孔，实际复苏接种数根据冻存细胞状态微调。

（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 ℃、5% CO_2 和 95% 湿度的条件下培养细胞。

（9）每天更换 iPSC 完全培养基。

悬浮培养：

（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，直到只剩下一个小冰晶（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 ℃）160 g 离心细胞 5 分钟。

（5）弃上清，加入适量完全培养基重悬细胞，计数。根据实验需求将相应体积（2 mL/ 孔）的完全培养基加入离心管中，并加入 Y27632，终浓度为 10 μM，混匀。

（6）将含有 Y27632 的完全培养基加入超低吸附六孔板中，每孔 2 mL，接种细胞。推荐复苏接种密度为 10 万 /mL，实际复苏接种数根据冻存细胞状态微调。

（7）在 37 ℃、5% CO_2 和 95% 湿度的条件下培养细胞，摇床转速为 75 rpm，振幅 19 mm。

（8）每天更换一半体积的 iPSC 完全培养基。（吸弃 1 mL，再加入 1 mL 新鲜的完全培养基。）更换培养基前，轻微晃动培养板使细胞在中间集中，将六孔板倾斜 45 度，静置 2-5 min，使细胞沉底，用移液枪沿侧孔壁小心吸取最上层培养基，避免抽走细胞。

4.传代hiPS：（以6孔板为例）

平面培养

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 3~5 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℃培养箱中静置 5 分钟。按照 1:2 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，160 g 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 10~20 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 μM 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 ℃、5% CO_2 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。

悬浮培养：

镜下观察细胞团，直径达到 250-300 μm 时进行传代。若直径过大，则细胞团中央可能因缺乏氧气和营养物质而坏死或分化。

（1）将含细胞的培养基抽到 15 mL 离心管中，再用 1 mL 完全培养基润洗一下六孔板，防止过多细胞残留。

（2）160 g 离心 5 分钟。

（3）弃上清，每个管中加入 1 mL Accutase，在 37 ℃水浴锅中消化 10 分钟（若细胞团未完全消化，可适当延长消化时间）。时常晃动离心管，避免细胞团沉底，使消化更彻底。

（4）按照 1:2 的比例加入 iPSC 完全培养基终止消化，160 g 离心 5 分钟。

（5）弃掉上清，加入适量体积的培养基，轻轻吹打混匀细胞，计数。

（6）在离心管中加入相应体积（2 mL/ 孔）的 iPSC 完全培养基，并加入终浓度为 10 μM 的 Y27632，混匀。

（7）将含有 Y27632 的完全培养基加入超低吸附六孔板中，每孔 2 mL。接种细胞，推荐接种密度为 10 万 /mL。

（8）在 37 ℃、5% CO_2 和 95% 湿度的条件下培养细胞，摇床转速为 75 rpm，振幅 19 mm。

（9）每天更换一半体积的 iPSC 完全培养基。（吸弃 1 mL，再加入 1 mL 新鲜的完全培养基。）更换培养基前，轻微晃动培养板使细胞在中间集中，将六孔板倾斜 45 度，静置 2-5 min，使细胞沉底，用移液枪沿侧孔壁小心吸取最上层培养基，避免抽走细胞。

5.细胞冻存：（以6孔板为例）

平面培养

（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 ℃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，160 g 离心 5 分钟。

（6）弃上清，加入冻存液（一孔细胞加入 1 mL），轻轻吹打混匀。根据冻存液说明书进行冻存。

悬浮培养：

（1）将含细胞的培养基抽到 15 mL 离心管中，再用 1 mL 完全培养基润洗一下六孔板，防止过多细胞残留。

（2）160 g 离心 5 分钟。

（3）弃上清，每个管中加入 1 mL Accutase，在 37 ℃水浴锅中消化 10 分钟（若细胞团未完全消化，可适当延长消化时间）。时常晃动离心管，避免细胞团沉底，使消化更彻底。

（4）按照 1:2 的比例加入 iPSC 完全培养基终止消化，160 g 离心 5 分钟。

（5）弃上清，加入冻存液（一孔细胞加入 1 mL），轻轻吹打混匀。根据冻存液说明书进行冻存。

【结果展示】

1.平面（2D）培养

（1）细胞形态



P1



P2



P3



P4



P5



P6



P7



P8



P9



P10

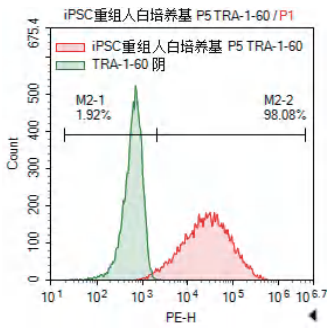
（2）细胞扩增倍数

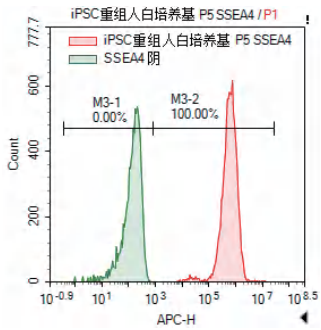
代次	接种密度	培养基体积	收获细胞数	扩增倍数	培养天数
P1	15600/cm²	2mL	3.31E+06	22.06	4 天
P2			4.07E+06	27.12	
P3			3.17E+06	21.14	

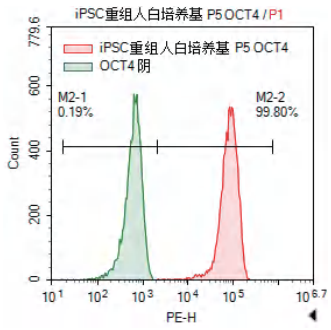
代次	接种密度	培养基体积	收获细胞数	扩增倍数	培养天数
P4	15600/cm²	2mL	4.12E+06	27.48	4 天
P5			3.95E+06	26.33	
P6			3.63E+06	24.25	
P7			3.85E+06	25.68	
P8			4.37E+06	29.14	
P9			3.73E+06	24.86	
P10			3.93E+06	26.22	

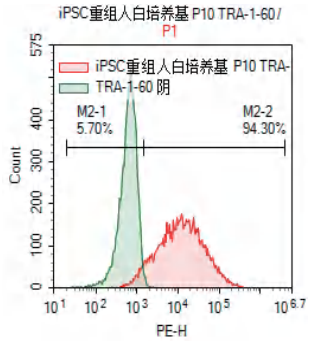
(3) 细胞表型

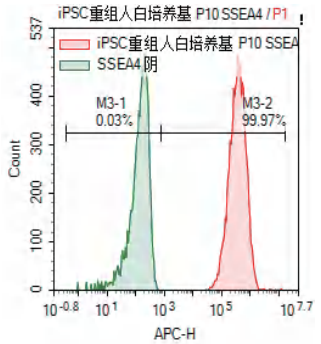
分组	TRA-1-60	SSEA4	OCT4	SOX2
P5	98.08%	100%	99.8%	-
P10	94.3%	99.97%	99.61%	99.83%

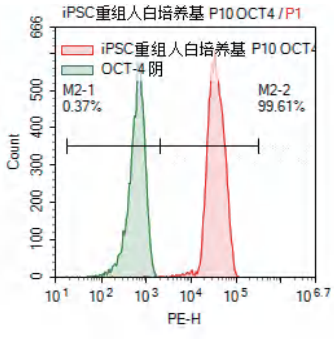


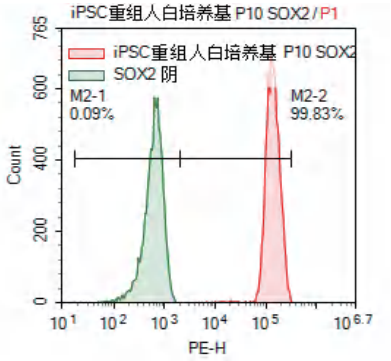






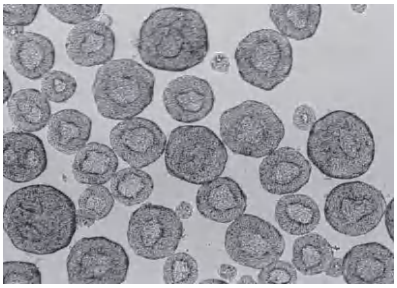




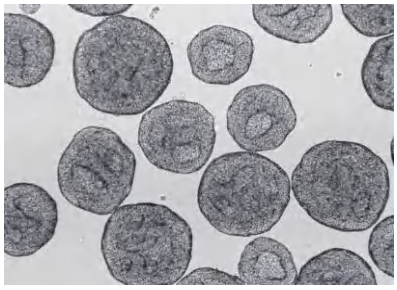


2.悬浮（3D）培养

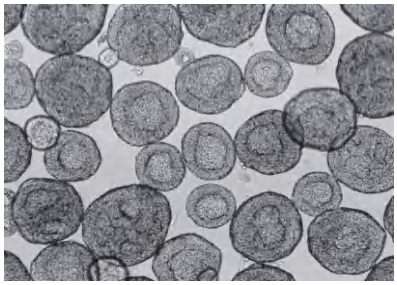
（1）细胞形态



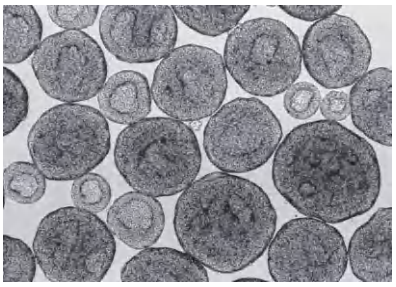
P1



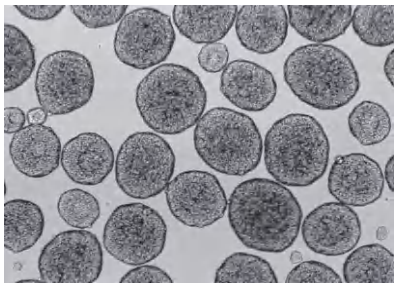
P2



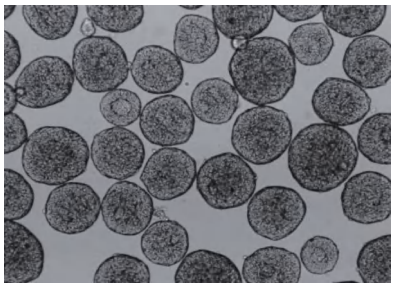
P3



P4



P5



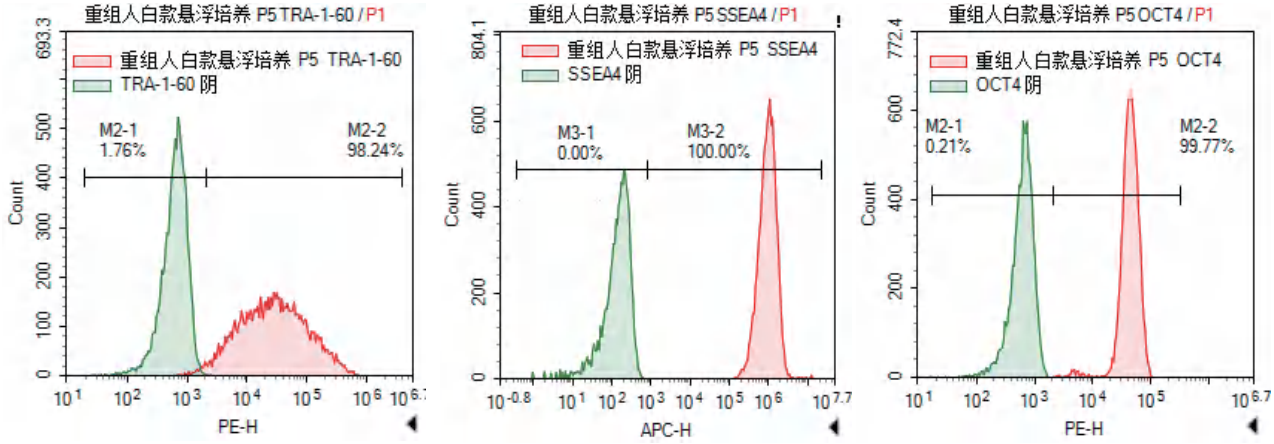
P6

（2）细胞扩增倍数

代次	接种密度	培养基体积	收获细胞数	扩增倍数	培养天数
P1（复苏）	100000/mL	2	6.33E+05	3.16	3 天
P2			1.32E+06	6.6	
P3			1.41E+06	7.05	
P4			2.05E+06	10.25	
P5			1.66E+06	8.3	
P6			1.43E+06	7.15	

（3）细胞表型

分组	TRA-1-60	SSEA4	OCT4
P5	98.24%	100%	99.77%



【注意事项】

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，使细胞处于小团块水平。

3. 传代时，细胞密度不宜过高或者过低，贴壁培养保持每孔 10-20 万接种，悬浮培养保持 5-10 万 /mL。

4. 悬浮培养时，细胞球直径最大不宜超过 350 μm。

5. 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。

6. 完全培养基仅限一周内使用。

【说明书核准日期】2026年8月7日

【版本号】1.0.0

YOCON 友康®

文件版本号：2026 -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