

人诱导多能干细胞iPS

Cat No.:JY-Y1279



Description

种属	人
别称	Human iPS cells
组织来源	28 岁女性血液单个核细胞
疾病	诱导多能干细胞
传代比例/细胞消化	1:2传代
完全培养基配置	iPS细胞基础培养基500ML;Y276321mg;Matrigel 5ML;IPS细胞消化液500ML;ES细胞专用冻存液100ML
简介	提供的人诱导多能干细胞（iPSC-sk）是由人血液单个核细胞通过非整合的方法诱导获得。人 iPSC 在无饲养层、化学成分明确、并且无动物源成分的人多潜能干细胞培养体系中培养，适合临床级的干细胞研究和应用。人 iPSC 在人多潜能干细胞培养体系中可以长期稳定快速增殖，具有高度近似人 ES 细胞的克隆形态和基因表达，长期维持正常核型，并在体内外具有三胚层分化潜能
形态	球形克隆细胞样
生长特征	贴壁生长
倍增时间	每周2-3次
培养条件	气相：空气，95%;二氧化碳，5%。温度：37摄氏度，培养箱湿度为70%-80%。
冻存条件	ES细胞专用冻存液
保藏机构	仙台病毒
产品使用	仅限于科学研究，不可作为动物或人类疾病的治疗产品使用。

细胞接收处理流程：

- 1: 观察有无破损漏液情况，如有请拍照及时联系客服。
- 2: 酒精消毒培养瓶表面后显微镜下观察细胞状态，观察拍照后不用打开培养瓶盖放入培养箱静止2-3小时稳定细胞状态。
- 3: 请按照细胞操作指南进行第一次传代冻存处理。
- 4: 产品随货会附带细胞说明书、细胞培养操作指南、细胞鉴定、支原体检测报告。
- 5: 若产品有异常或其他疑问，可随时联系客服；转至技术支持。

1. 试剂和材料

iPS细胞完全培养基试剂盒

成分	规格	数量	储存条件
iPS细胞基础培养基	500mL	1瓶	2-8℃
iPS细胞培养基添加剂	20mL	1支	-20℃

所需的其它试剂和材料

产品	规格
Y27632	1mg
Matrigel	5mL
iPS细胞消化液	500 mL
ES细胞专用冻存液	100 mL

2. 培养流程

2.1 试剂的制备

2.1.1 完全培养基制备

2.1.1 在室温(15-25℃)或冰箱内(2-8℃)过夜解冻细胞培养基添加剂,可在无菌条件下将添加剂分装为适量的工作等份,并在-20℃下冻存。冷冻的分量须在3个月内用完。解冻后的分量应该一天内制备成完全培养基。请勿在解冻后再次冷冻。

2.1.2. 在无菌条件下将20mL的添加剂全部解冻后加入到500mL的基础培养基中,充分混匀。完全培养基在(2-8℃)下储存时刻维持稳定状态最多2-3周,或在-20℃下冷冻时刻维持稳定状态最多3个月。在室温(15-25℃)或冰箱内(2-8℃)过夜解冻冷冻的培养基,不要长时间放在37℃水浴内加热培养基。

如果在无菌条件下制备,细胞完全培养基可直接使用。

2.1.2 Matrigel工作液的配制与包被

鉴于基质胶的操作环境要求比较严格,为保证您的实验顺利,特此对以下几个方面进行温馨提示:

1. 收货时,首先确认还有干冰,Matrigel成固态,液面水平,如有异常请及时拍照取证并联系我们。

2. 整个Matrigel 只能分装一次，在分装前，要先放4℃冰箱(最好先把Matrigel 插在冰上，然后放入4℃冰箱)过夜，且分装用的枪头、EP管等都要提前-20℃预冷(基质胶在10℃以上会发成胶凝固导致基质胶报废)，整个分装过程都需在冰上进行，且以后每次试验时拿出本次用量所需的基质胶。

3. 实验人员手心不要接触基质胶，如：要手持装有Matrigel的EP管的上方，防止体温使基质胶成胶凝固。

4. Matrigel的稀释比例建议为100倍稀释。

本库建议的配制Matrigel工作液方法：

1. 稀释前将Matrigel 放入4℃冰箱过夜融化。

2. 将适量体积的稀释液(DMEM/F12 或PBS) 置4℃冰箱预冷。

3. 将融化的Matrigel 与稀释液从冰箱中取出并打开盖子，用移液管吹吸稀释液几次以冷却移液管，并吸取少量稀释液加入Matrigel 管中混匀，将Matrigel 转移到稀释液中，并吹打混匀。(因为Matrigel 遇15℃以上温度就会成凝胶粘在原装玻璃壁和移液管壁上，故Matrigel 从冰箱拿出来以后尽快打开盖子并转移到预冷的稀释液中，吸取Matrigel 的移液管一定要冷却)。

4. 立即用稀释后的Matrigel包被培养板或培养皿。对于6孔板，每个孔使用1mL 稀释后的Matrigel, 对于 6cm 的培养皿，每个孔使用2mL 稀释后的Matrigel, 晃动培养板使Matrigel溶液均匀的分布在表面上。

5. 使用前，包被的培养板应放在培养箱(37℃)下至少1h。请勿让培养板脱水。在培养板可供使用之前，请勿移除Matrigel溶液。

如果不立即使用，培养板必须密封，以防止脱水。包被后的培养板可在2-8℃下最多储存7天。

如果Matrigel 溶液并未完全覆盖表面，则无法实验最佳的细胞培养，因此，不建议使用含有溶液已蒸发区域的培养板。

如果已将培养板在2-8℃下储存，则在移除Matrigel溶液之前，将培养板在培养箱(37℃)下放置30min。

2.1.3 Y27632的配制

Y27632 粉末溶解在PBS 中，配制成浓度未10mM 的储存液，0.22 μm 滤膜过滤除菌。分装后冷冻于-20℃

Y27632 提高复苏和传代后的克隆形成率，所以只在复苏和传代步骤添加(1:1000, 即终浓度为10 μM)， 换液时不添加。

2.2. 复苏

在开始复苏前，将所有试管、预热后的培养基和培养皿准备好，已确保尽快完成复苏过程。

将冻存管从液氮中取出，快速在37℃水浴槽中解冻，轻柔持续地摇动冻存管，直到只剩下一个小冷冻团。从水浴槽取出冻存管，70%乙醇擦拭进行消毒。

使用移液管将冻存管中含有iPS细胞的冻存液轻轻转移至一个含有5-6mL 已经预热的完全培养基的15mL 离心管中，过程必须轻柔防止吹散细胞团。

室温300g离心5min。

吸出培养基，确保细胞团完整。

然后缓慢加入1mL完全培养基，用手指轻弹离心管底部，使细胞团脱离底部并分散。

轻轻的将此1mL 细胞悬液转移至已包被的培养皿/板/瓶，根据最终培养细胞的液体体积，加入ROCK inhibitor Y27632，终浓度为10 μ M。

将培养皿/板/瓶置于37℃培养箱中，每天更换培养基(换液不需要再添加Y27632，但培养基需提前预热)。

2.3. 传代

当集落变得较大、中心变得密集、明亮(对比边缘)，相邻的集落开始融合时，此时可进行传代。

传代前，准备37℃预热好的无钙镁PBS溶液及消化液，完全培养基。

吸走上清，并加入37℃预热好的PBS 溶液清洗1次。

加入适量(按6孔板每孔加1mL, 6cm 皿 加 2mL, 10cm 皿 加 3mL 的量)的37℃预热好的消化液。

37℃放置1-2min，用手指轻弹皿/板/瓶身，显微镜下观察到大部分克隆边缘开始脱离培养皿/板底，克隆内部大部分细胞成团脱落。

加入适量的完全培养基终止消化。

移入离心管，300g离心5min。

离心后重悬(重悬步骤参照复苏4-5步)。

传代比例为1:6—1:8, 根据最终培养细胞的液体体积，加入ROCK inhibitor Y27632,终浓度为10 μ M。

将培养皿/板/瓶置于37℃培养箱中，每天更换培养基(换液不需要再添加Y27632，但培养基需提前预热)。

2.4. 冻存

当集落变得较大、中心变得密集、明亮(对比边缘)，相邻的集落开始融合时，此时可进行传代。

传代前，准备37℃预热好的无钙镁PBS溶液及消化液，完全培养基。

吸走上清，并加入37℃预热好的 PBS 溶液清洗1次。

加入适量（按6孔板每孔加1mL, 6cm 皿加 2mL, 10cm 皿加 3mL 的量）的37℃预热好的消化液。

37℃放置1-2min，用手指轻弹皿/板/瓶身，显微镜下观察到大部分克隆边缘开始脱离培养皿/板底，克隆内部大部分细胞成团脱落。

加入适量的完全培养基终止消化。

移入离心管，300g离心5min。

离心后重悬（重悬步骤参照复苏4-5步）。

使用预冷的冻存液轻轻的重悬细胞团，然后将细胞悬液转移至冻存管，冻存按6孔板每孔冻1支，6cm 皿冻2-4支，10cm 皿冻6-12支。