

iPSC Serum-Free  
Culture Medium Kit

# iPSC 无血清培养基套装

## 使用说明文件

— Instruction manual —



YOCON

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<sup>®</sup>**

## iPSC无血清培养基套装说明书

### 【产品名称】

iPSC 无血清培养基套装

### 【产品规格】

产品名称	包装规格	保存条件	保质期限	产品货号
iPSC 无血清培养基基础	400 mL/ 瓶	2-8°C, 避光保存	12 个月	NC0401
iPSC 无血清培养基添加剂	100 mL/ 瓶	-20°C, 避光保存	12 个月	NC0401.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 35 代以上。
2. 细胞传代时间为 3 ~ 5 天。
3. 细胞表型：TRA-1-60  $\geq$  90%，OcT4  $\geq$  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 无血清培养基套装	YOCON/NC0401、NC0401.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/NC0406
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 4°C 或室温融化，不可 37°C 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°C 可避光保存半个月，由于蛋白在溶液中易降解，所以最好 1 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°C 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°C 取出，在 4°C 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°C 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°C 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°C 下储存，在使用之前，还需将培养板在培养箱（37°C）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°C，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°C），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°C 水浴锅中解冻 iPSC 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°C），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（2mL/孔）的完全培养基加入离心管中，并加入 Y27632，终浓度为 10 $\mu$ M，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 $^{\circ}$ C 下储存，则在移除基质胶溶液之前，将培养板在培养箱（37 $^{\circ}$ C）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 2mL，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 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 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 3~5 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 1mL Accutase，覆盖底面，37 $^{\circ}$ C 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，将未完全脱离的细胞轻轻吹打下来。

(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 10~20 万的细胞数进行接种。在离心管中加入相应体积 iPSC 完全培养基，并加入终浓度为 10 $\mu$ M 的 Y27632。吸弃包被液，加入相应含 Y27632 的 iPSC 完全培养基。

(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 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 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 1mL Accutase，覆盖底面，在 37 $^{\circ}$ C 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。

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

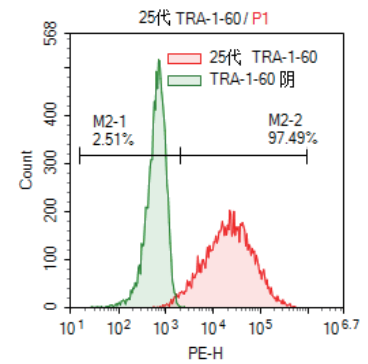
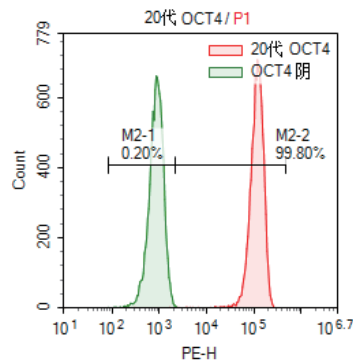
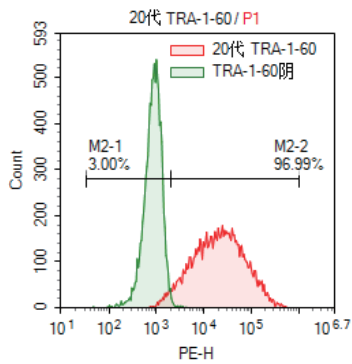
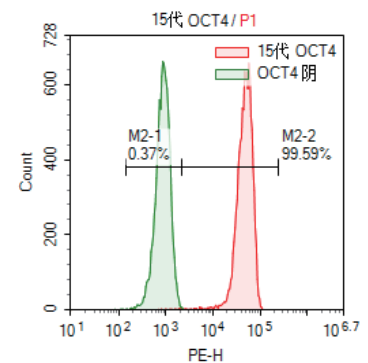
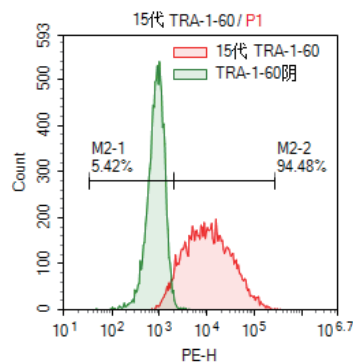
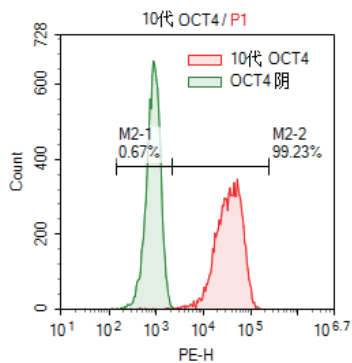
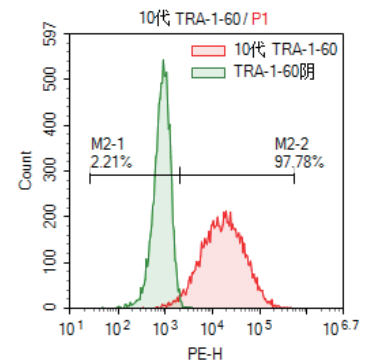
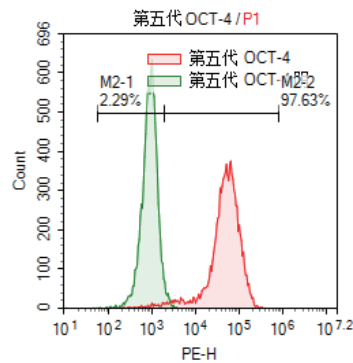
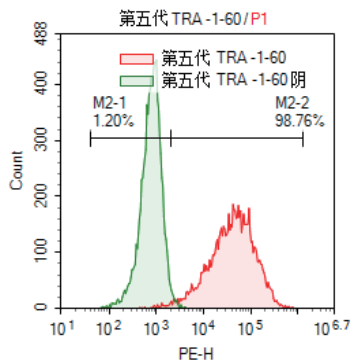
【结果展示】

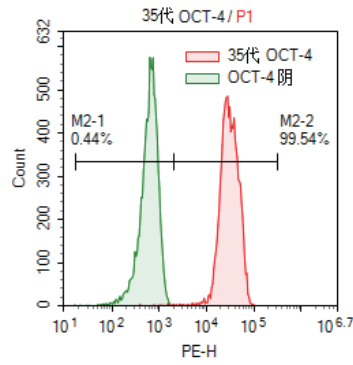
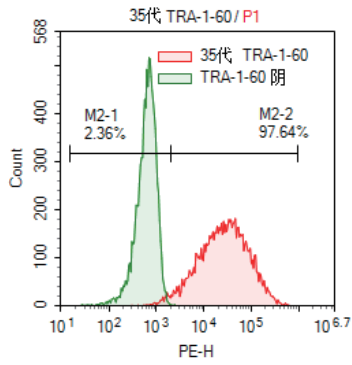
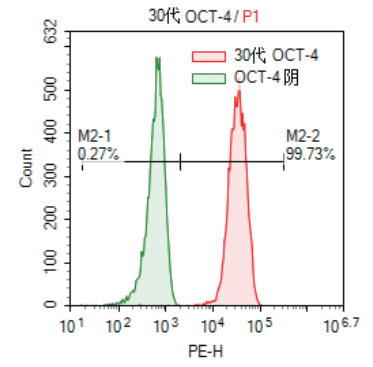
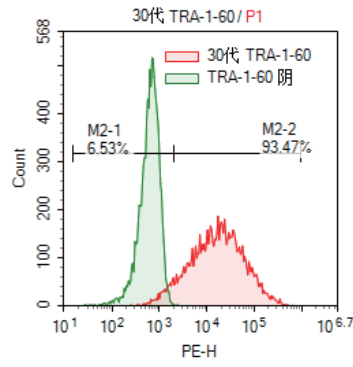
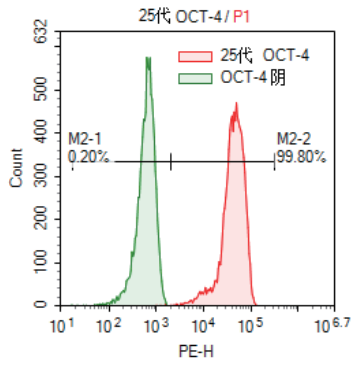
细胞扩增倍数：

代次	培养皿	接种密度 /cm <sup>2</sup>	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
11		15600		1.07 E6	7.1	72
12		20800		1.53 E6	7.7	72
13		20800		1.37 E6	6.9	72
14		15600		2.78 E6	18.5	96
15		15600		1.07 E6	7.1	72
16		20800		1.44 E6	7.2	72
17		20800		3.9 E6	19.5	96
18		15600		2.8 E6	18.9	96
19		15600		2.41 E6	16.1	96
20		15600		4.07 E6	27.1	96
21		15600		1.7 E6	11.9	96
22		15600		3.6 E6	24.6	96
23		15600		2.9 E6	19.9	96
24		15600		4.6 E6	30.8	96
25		15600		2.4 E6	16.3	96
26		15600		4.2 E6	28.0	96
27		15600		2.3 E6	15.5	96
28		15600		3.7 E6	24.8	96
29		15600		3.9 E6	26.2	96
30		15600		4.1 E6	27.8	96
31		15600		3.8 E6	25.3	96
32		15600		3.0 E6	20.2	96
33		15600		4.0 E6	26.8	96
34		15600		3.6 E6	24.2	96
35		15600		4.3 E6	29.0	96

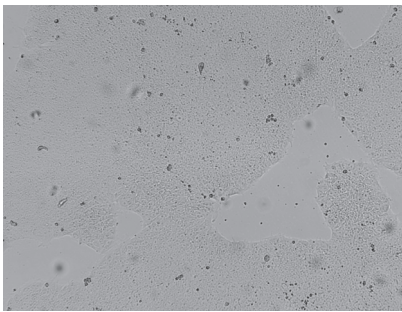
细胞表型:

分组	TRA-1-60	Oct4
P5	98.72%	97.63%
P10	97.78%	99.23%
P15	94.48%	99.59%
P20	96.99%	99.80%
P25	97.49%	99.80%
P30	93.47%	99.73%
P35	97.64%	99.54%

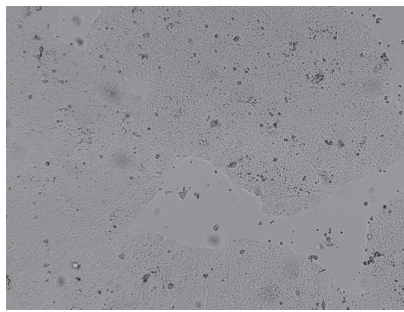




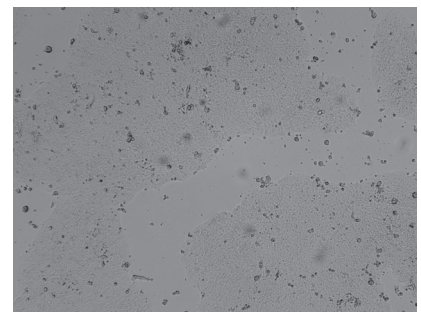
细胞镜下照片:



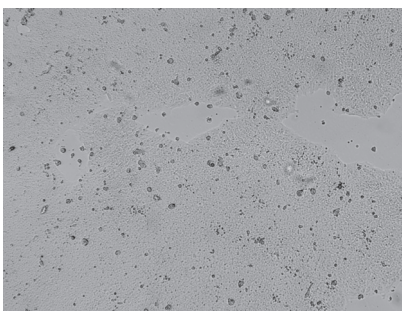
P1



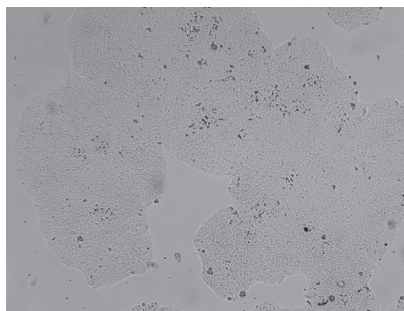
P2



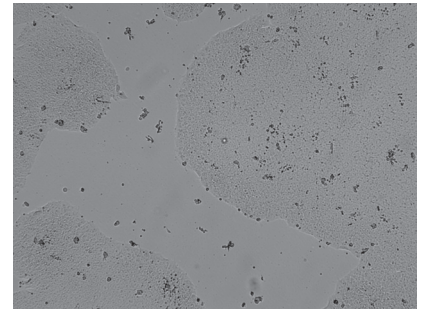
P3



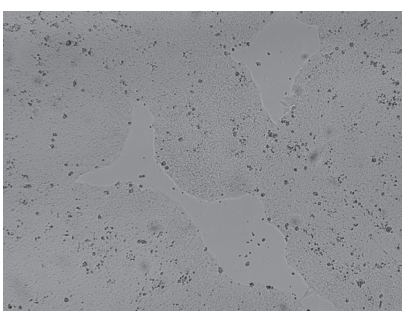
P4



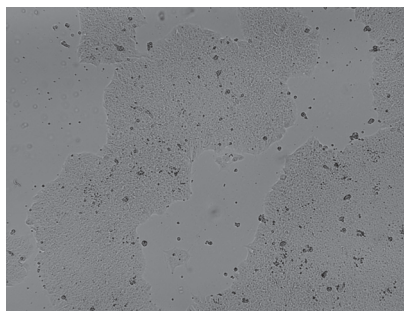
P5



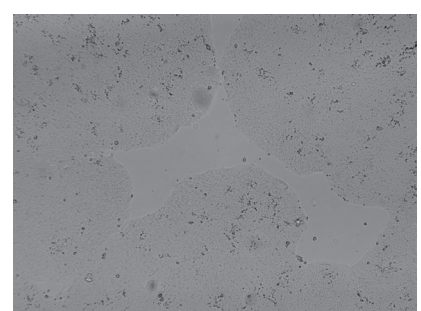
P6



P7

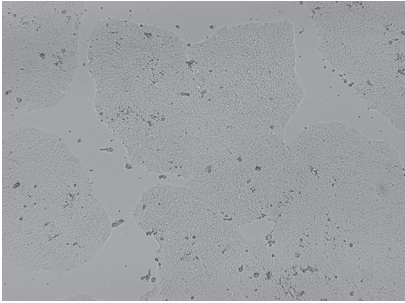


P8

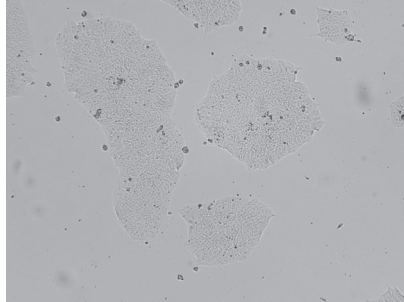


P9

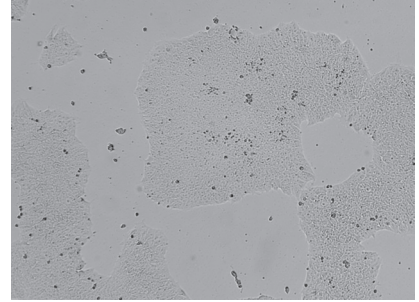




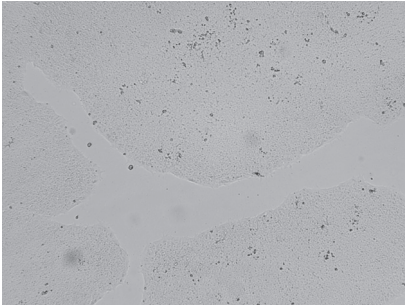
P10



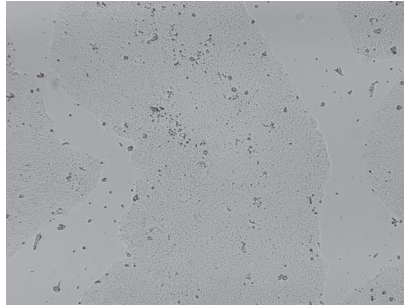
P11



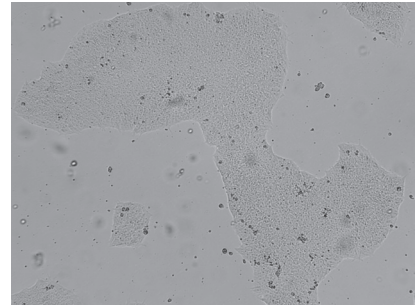
P12



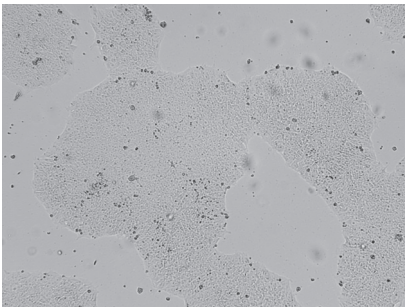
P13



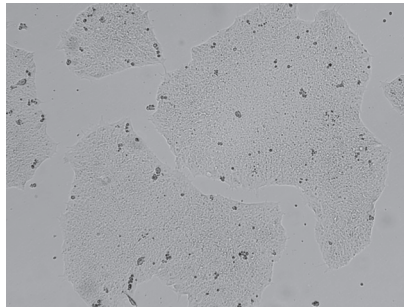
P14



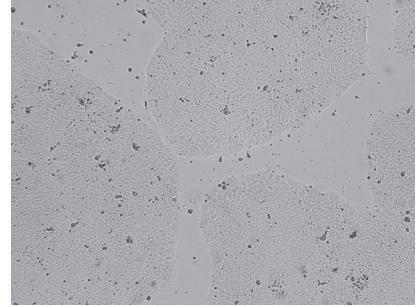
P15



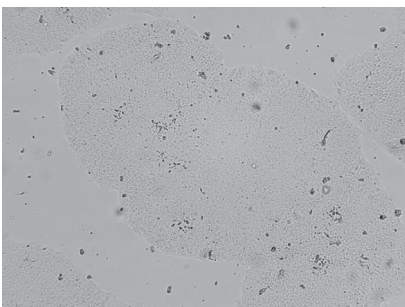
P16



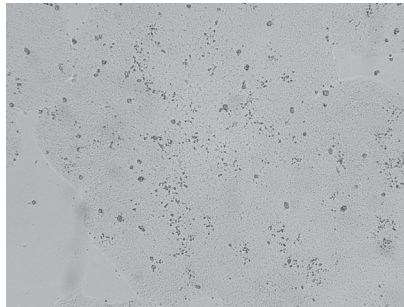
P17



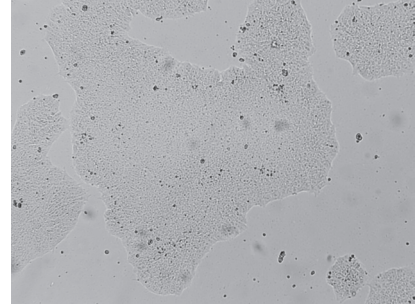
P18



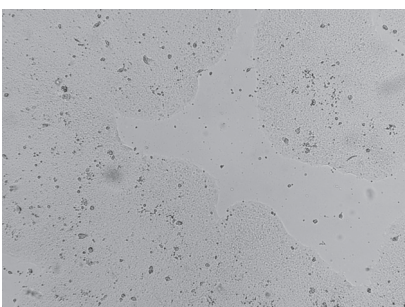
P19



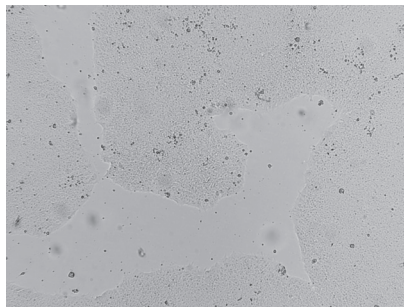
P20



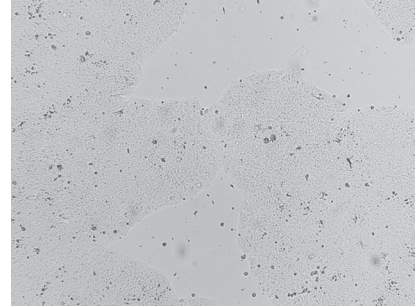
P21



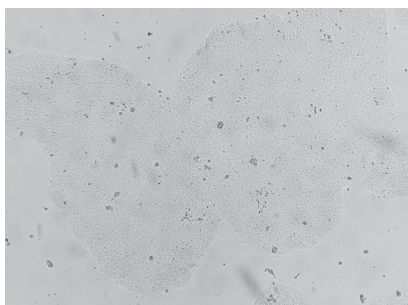
P22



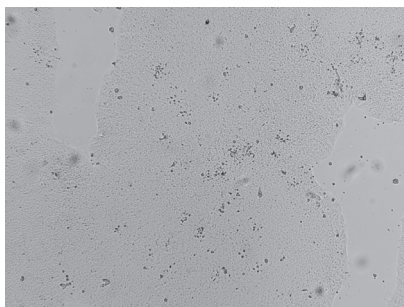
P23



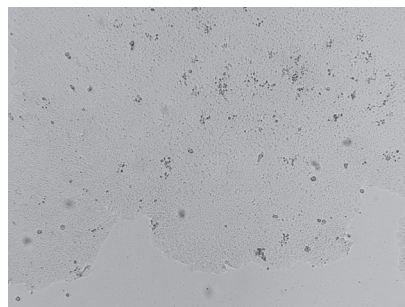
P24



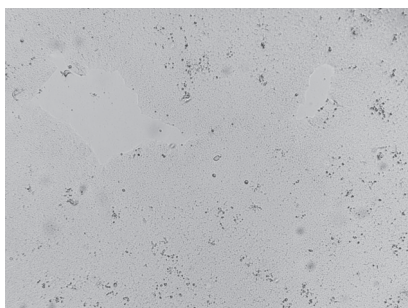
P25



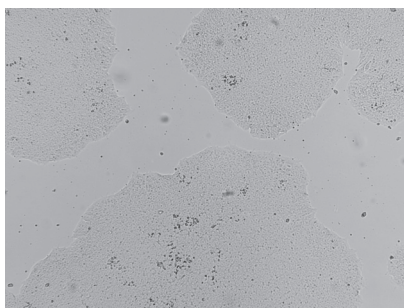
P26



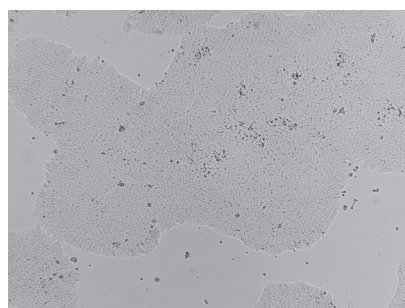
P27



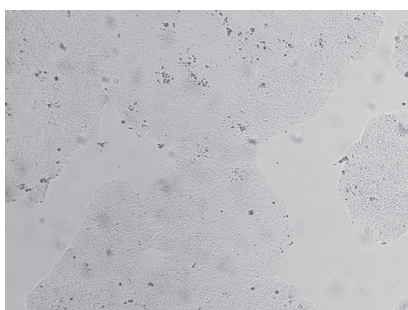
P28



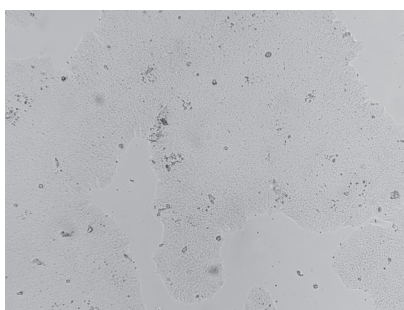
P29



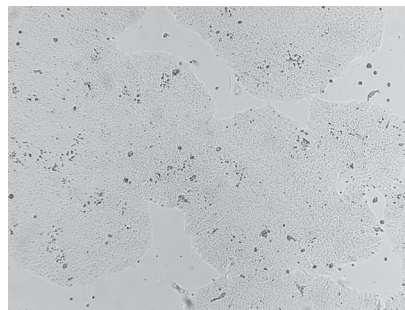
P30



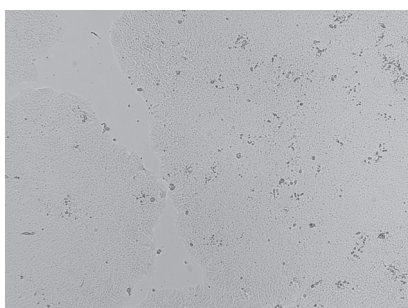
P31



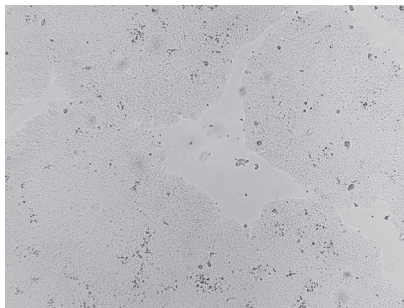
P32



P33



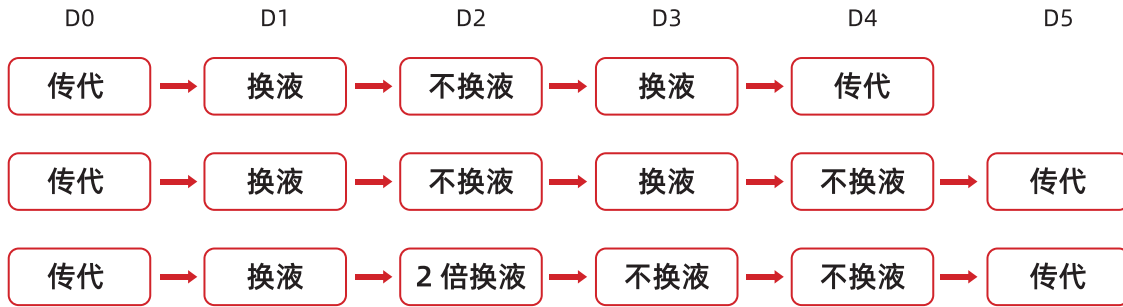
P34



P35

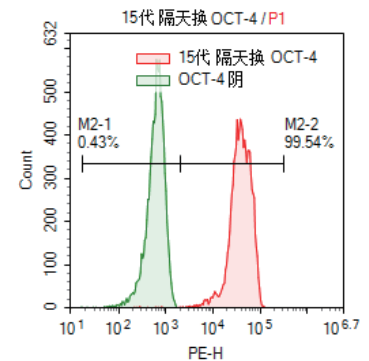
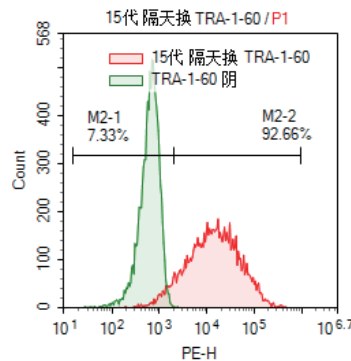
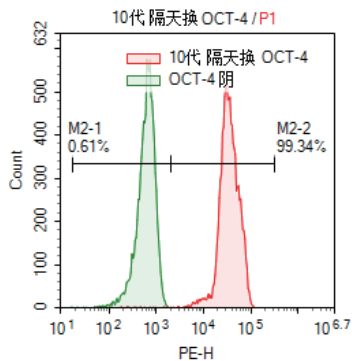
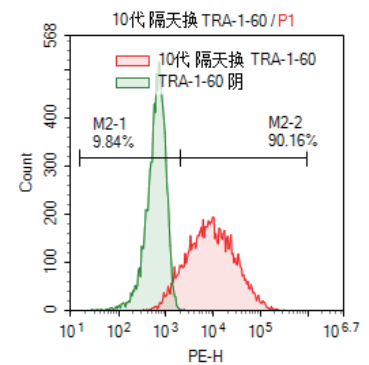
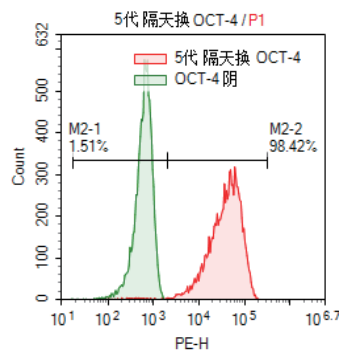
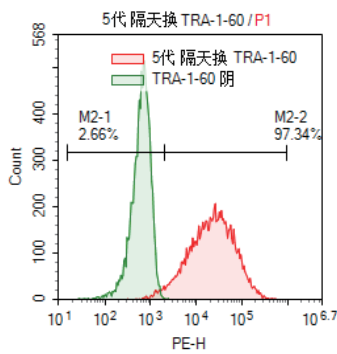
### 【隔天换液】

培养基支持隔天换液，以 4 天或 5 天为一个传代周期，具体操作流程为：



### 4天周期细胞表型：

分组	TRA-1-60	Oct4
P5	97.34%	98.42%
P10	90.16%	99.34%
P15	92.66%	99.54%

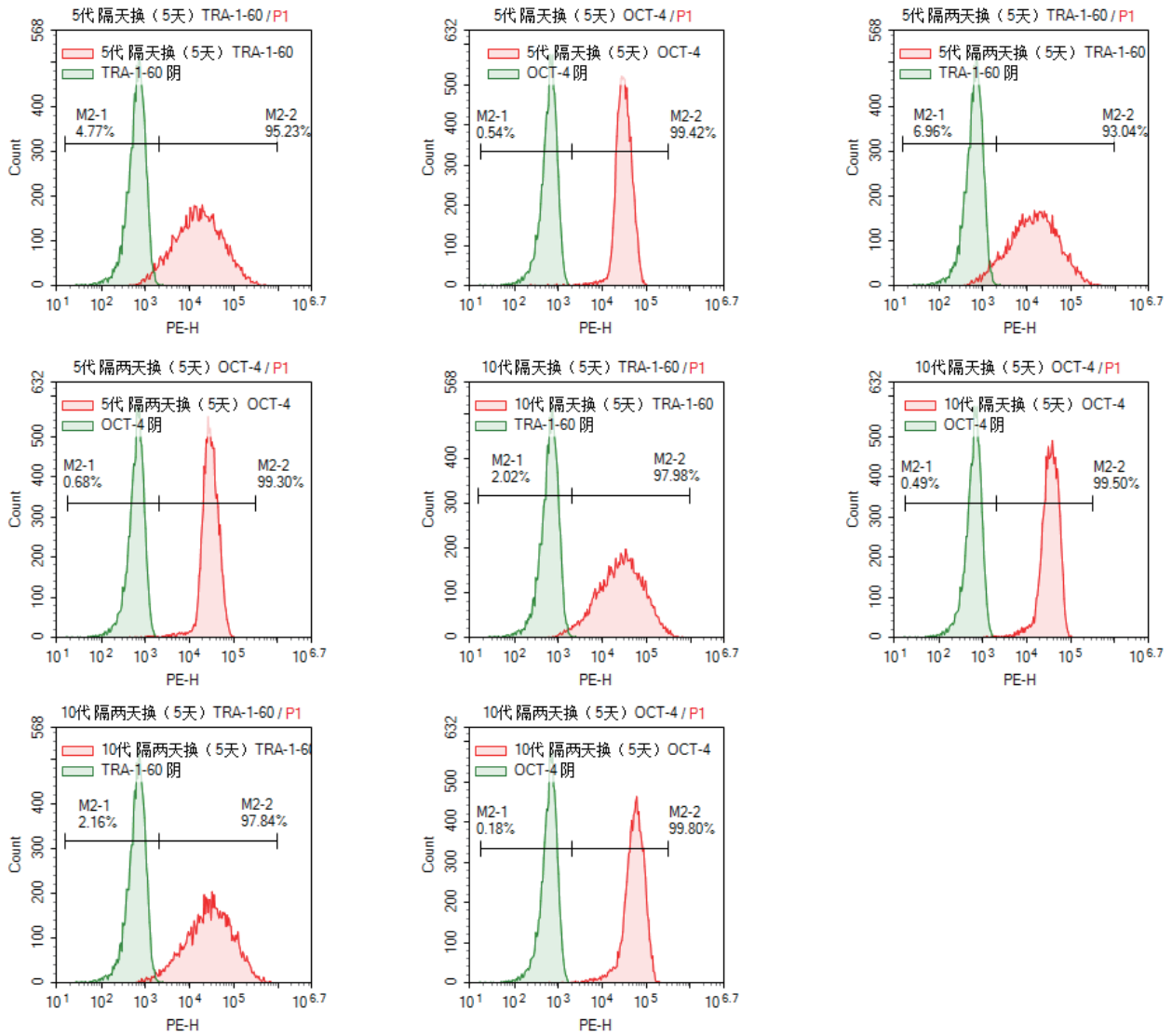


4天周期细胞扩增倍数:

代次	培养皿	接种密度 /cm <sup>2</sup>	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	15600	2	2.9 E6	19.3	96
3		15600		3.2 E6	21.3	96
4		15600		2.3 E6	15.3	96
5		15600		3.1 E6	20.6	96
6		15600		2.7 E6	18	96
2		15600		2.9 E6	19.3	96
3		15600		3.2 E6	21.3	96
4		15600		2.3 E6	15.3	96
5		15600		3.1 E6	20.6	96
6		15600		2.7 E6	18	96
7		15600		3.1 E6	20.6	96
8		15600		4.1 E6	27.9	96
9		15600		2.5 E6	16.7	96
10		15600		3.9 E6	26.1	96
11		15600		3.3 E6	22.3	96
12	15600	3.3 E6	22.3	96		
13	15600	3.9 E6	26.5	96		
14	15600	3.9 E6	26.5	96		
15	15600	2.7 E6	18.4	96		

5天周期细胞表型:

分组	TRA-1-60	Oct4
P5 (隔一天)	95.23%	99.42%
P5 (隔两天)	93.04%	99.30%
P10 (隔一天)	97.98%	99.50%
P10 (隔两天)	97.84%	99.80%



**5天周期 (隔一天) 细胞扩增倍数:**

代次	培养皿	接种密度 /cm <sup>2</sup>	培养基体积 (mL)	收获细胞数	扩增倍数	生长时间 (小时)
1	6孔板	10400	2	4.6 E6	46.3	120
2		10400		2.6 E6	26	120
3		10400		4.2 E6	42.7	120
4		10400		1.5 E6	15.5	120
5		10400		3.8 E6	38.5	120
6		10400		4.4 E6	44.2	120
7		10400		3.3 E6	33.5	120
8		10400		3.4 E6	34.5	120
9		10400		3.7 E6	37.7	120
10		10400		2.1 E6	21.9	120

**5天周期（隔两天）细胞扩增倍数**

代次	培养皿	接种密度 /cm <sup>2</sup>	培养基体积 (mL)	收获细胞数	扩增倍数	生长时间 (小时)
1	6 孔板	10400	2	4.6 E6	46.3	120
2		10400		1.9 E6	19.3	120
3		10400		4.5 E6	45.8	120
4		10400		1.4 E6	14.5	120
5		10400		4.1 E6	41.9	120
6		10400		4.0 E6	40.6	120
7		10400		3.5 E6	35.5	120
8		10400		3.1 E6	31.3	120
9		10400		4.3 E6	43.8	120
10		10400		2.0 E6	20.9	120

**【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，使细胞处于小团块水平。
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8月21日

**【版本号】** 1.0.2

**YOCON 友康<sup>®</sup>**

文件版本号：2025 -V1.0.2

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](http://www.yocon.cn)

