

iPSC无血清冻存液使用说明书

【产品名称】

通用名称：iPSC 无血清冻存液

【产品规格】

产品名称	产品货号	规格	保存温度	保质期限
iPSC 无血清冻存液	NC0603	100 mL/ 瓶	2-8℃，避光保存	12 个月

【预期用途】

专用于 iPSC 细胞株的冻存。

【产品特点】

在细胞冻存中，冰晶是导致细胞损伤、存活率下降的首要元凶。本冻存液的核心技术在于其协同抗冰晶机制：配方中的部分细胞内保护剂能迅速穿透细胞膜，在内部降低冰点，将水分子“固定”为无定形的玻璃化状态，从而有效抑制致命性胞内冰晶的产生；同时，部分细胞外保护剂通过与水分子结合，干扰冰晶的规则排列，阻止尖锐、损伤性冰晶的生长，并在细胞周围形成一道柔性屏障。这种内外协同的保护策略，减少了冻融过程中冰晶对细胞膜、细胞器造成的物理穿刺损伤，从而大幅提高 iPSC 在复苏后的回收率与活率。

【主要组成成分】

氨基酸、维生素、无机盐、白蛋白、冷冻保护剂。

【产品性能】

1. 复苏后：细胞活率 $\geq 90\%$ ，细胞回收率 $\geq 80\%$
2. 复苏代次表型：TRA-1-60 $\geq 90\%$ ，OCT4 $\geq 95\%$
3. 复苏代次培养 96h 后扩增倍数： ≥ 13 倍

【产品指标】

外观：淡黄色或黄色澄清透明液体
装量：100 mL/ 瓶
pH 值：25 ℃，7.2-7.6
内毒素： < 0.25 EU/mL
无菌检测：真菌、细菌、支原体阴性
渗透压：2300-2600 mOsm/kg(直接检测法)

【产品使用说明】

1. 试剂和材料

产品	品牌 / 货号
iPSC 无血清冻存液	YOCON / NC0603
iPSC 无血清培养基套装	YOCON / NC0401、NC0401.S
Y27632	MCE / HY-10583
DMEM / F12	YOCON / NC0406
DPBS(不含钙镁离子)	YOCON / BS0402
Stempro™ Accutase™ 细胞解离试剂	Thermo / A1110501
MatriGel	Corning / 354277
另需细胞培养板 / 瓶 / 皿，15 mL 离心管和移液管等细胞培养耗材	

2. 细胞冻存前准备

- (1) 要求冻存的细胞在对数生长期，且活率大于 90%。
- (2) 计算细胞冻存密度，一般要求密度在 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cells/mL。

3. 细胞冻存过程（程序冻存）（以六孔板操作为例，操作程序同样适用于其他培养容器）

- (1) 当细胞汇合度达到 80%~90% 左右时可以收获细胞进行冻存。
- (2) 室温下预温 iPSC 无血清培养基、DPBS，20-30 min。
- (3) 用显微镜观察需要冻存的细胞状态，确定已分化的区域。用毡制粗头笔或透镜标志器在培养板底部标记这些区域。
- (4) 用移液枪头刮除或抽取，去除分化区域。
- (5) 用 DPBS 清洗细胞，随后用 1mL Accutase 消化液处理细胞（37℃ 5 min），用 2 倍体积的 iPSC 无血清培养基中和。
（其它培养板可按照比例使用适量的 Accutase 消化液）
- (6) 转移至 15mL 离心管中，离心，160 g，5 min，弃上清，用适量的 iPSC 无血清培养基重悬细胞。
- (7) 细胞悬液进行细胞计数，计数后离心，160 g，5 min 即可。
- (8) 弃上清，4℃ 保存的 iPSC 无血清冻存液缓慢加入离心后的细胞沉淀中，根据所需冻存密度调整细胞冻存液用量。
- (9) 反复轻柔吹吸混匀后，分装于细胞冻存管中，推荐每管 1mL ~ 1.5mL。
- (10) 细胞冻存管放入程序降温盒中，置于 -80℃ 冰箱过夜保存，次日转移至液氮中保存。

备注：

1. 冻存过程中，细胞在冻存液中常温下不要超过 5min，避免保护剂对细胞造成损伤。
2. 吹打细胞时尽量轻柔，iPSC 对机械力损伤比较敏感。
3. 细胞冻存管一定要保证完全密封，否则在复苏过程中有可能会炸裂。

4. 细胞复苏过程（以六孔板操作为例，操作程序同样适用于其他培养容器）

- (1) 室温下预温 iPSC 无血清培养基和 DMEM/F12 培养基，20-30 min。MatriGel 包被的细胞培养板放入二氧化碳培养箱中预热 0.5-1h，预热结束后每个孔换上含有 10 μ M Y27632 的 iPSC 无血清培养基。
- (2) 将细胞冻存管从液氮中取出，迅速置于 37°C 水浴锅中快速晃动促进融化，尽量 1-2min 内融化，时间越短，对细胞影响越小。
- (3) 将融化后的细胞悬液转移至 15 mL 离心管中，用 DMEM / F12 基础培养基滴加进行稀释。（如细胞冷冻保存液为 1 mL，则加入 9 mL DMEM / F12 基础培养基）
- (4) 混匀后立即离心，160 g，5 min 即可，离心结束后弃上清，加入 1mL 预温的含有 10 μ M Y27632 的 iPSC 无血清培养基重悬。
- (5) 细胞悬液进行细胞计数，按照 20-40 万 / 孔 的密度接种于预热的细胞培养板中。（其他规格培养板按照比例计算接种）
- (6) “十字法”摇匀细胞，随后将细胞培养板置于二氧化碳培养箱中培养，培养 72h~96h。（二氧化碳浓度根据培养基要求决定，通常为 5%）

注：细胞计数使用 AO/PI 双染（AO/PI 细胞计数仪）或 PI 单染（流式细胞仪）进行计数；冻存、复苏、传代所需细胞数均为活细胞数。

【产品数据】

iPSC 在液氮中冻存 3 个月，连续培养 2 代结果：

1. 细胞复苏：流式计数

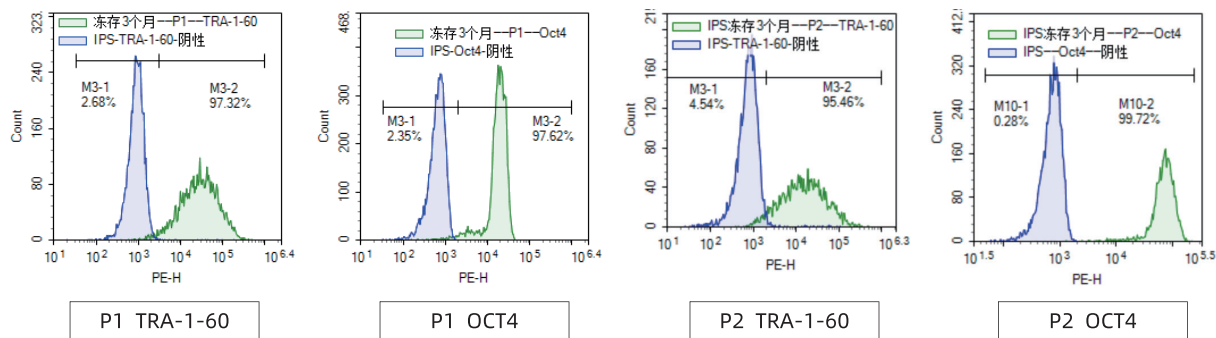
细胞数	细胞冻存密度	回收率	活率
935650	1x10 ⁶ cells/mL	93.57%	94.88%

2. 细胞培养：流式计数

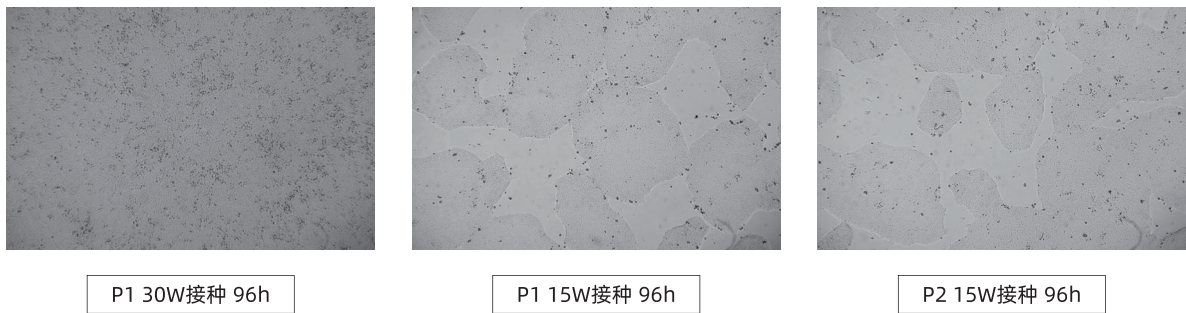
复苏后培养代次	细胞接种量（六孔板）	收获细胞数	细胞扩增倍数	生长时间
P1	300000/ 孔	5156750	17.19	96h
P1	150000/ 孔	2982900	19.89	96h
P2	150000/ 孔	3112900	20.75	96h

3. 细胞表型：

复苏后培养代次	TRA-1-60	OCT4
P1	97.32%	97.62%
P2	95.46%	99.72%



4. 细胞照片:



【生产企业】

研发生产基地：北京市密云区科技路 6 号
总部地址：北京市海淀区长春桥路 11 号亿城中心 C2 座
华东分区：上海市普陀区真如街道天汇广场 706 室
华中分区：武汉市东湖高新技术开发区光谷大道 58 号光谷总部国际 2 栋 1210
华南分区：广东省广州市海珠区新港东路 1068 号中洲中心北塔 901
联系电话：0086-400-001-1266 0086-010-58711655
官方网站：www.yocon.cn

【说明书核准日期】 2025年12月25日

【版本号】 1.0.1