

技术手册

# 在mTeSR<sup>™</sup>1中 维持培养人多能 干细胞



## 使用mTeSR™1进行细胞培养的关键步骤

### 选择与mTeSR™1搭配使用的基质

细胞在mTeSR™1中培养时，可以使用Vitronectin XF™或Corning® Matrigel®作为表面包被的基质，使用方法参见4.2节。Corning® Matrigel®作为表面包被基质可用于多种用途，但是其成分并不明确。而Vitronectin XF™只含有单一的人源化蛋白，成分确定。要是需要整个培养系统都具有确定的成分，推荐使用Vitronectin XF™。

### 选择与mTeSR™1搭配的传代试剂

对培养在mTeSR™1的细胞进行传代时，根据所用基质（表2），可以选择无酶（5.1节）或者有酶（5.2节）传代方法。推荐使用无酶传代方法，具有易用，高得率，保护细胞表面蛋白的完整性便于再次贴壁等优势。在无酶传代试剂中，ES和iPS例行团块传代时（5.1.1节），ReLeSR™是最快速直接的方法。无论使用任何传代试剂，传代前都应优化传代试剂的消化时间。解离后的集落形态见图9（ReLeSR™），图10和图11（GCDR），图12（分散酶）。消化时间根据细胞系和所用的传代试剂而有差异，因此进行解离消化时需要在显微镜下观测，直至确定最佳的消化时间。

### 聚集体传代和单细胞传代

关于人ES和iPS细胞的常规扩增，本手册推荐使用以聚集体的方法传代这些细胞，细胞聚集体直径大约在50 - 200  $\mu\text{m}$ 。使用这些已经建立完善的方法可将多种细胞系传代20代以上仍然保持正常的核型。尽管ES和iPS可通过单细胞进行传代，但是整体上不推荐这种方法。有实验显示单细胞传代可能会对细胞施加额外的选择压力，导致在培养过程中遗传异常<sup>5-6</sup>。单细胞传代需要频繁检查核型。

### 人ES和iPS细胞的鉴定

定期检测培养物，确保细胞未分化并保持正常的核型。附录2详细介绍了如何使用流式鉴定未分化的细胞。常规对人ES和iPS细胞进行培养扩增时，细胞应保持正常的基因组。否则，长期传代可能会出现染色体异常和遗传变异<sup>5,6,8</sup>。因此，周期性（大约10 - 20代）检查人ES和iPS细胞培养物以排除核型异常的可能性是非常重要的。

### ES和iPS的克隆密度

保持合理的集落密度是ES和iPS在mTeSR™1维持培养的一关键。培养物过于密集会导致自发性分化增加。对于使用mTeSR™1推荐的克隆密度见图14；建议调整铺板密度以达到期望的铺板的团块数量（比如增加/减少传代比例）。改变集落密度后，最佳的传代周期可能会受到影响（6.0节和附录1）。需要注意的是有些细胞系在高密度培养时会增加自发性分化的概率。如果观测到分化增加，下一次传代时可以降低铺板密度。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

## 培养基换液

为保证人ES和iPS细胞的最佳生长，需要每天更换培养基，偶尔进行双倍补充培养基（在一次补加培养基时，加入两倍所需的培养基体积）是可以的，不会影响培养的质量。例如，在周五进行一次双倍补充培养基，可等到周日再进行下一次培养基的换液。每一代只能进行一次双倍补加培养基，可在传代后集落还是很小而所需营养亦较少的时候，使用一个特殊的培养流程，在周末不更换培养基（两天不更换培养基）是可行的。这个培养流程的详情请参见技术公告：使用mTeSR™1或TeSR™-E8™无需周末换液的流程（文件编号 #28071）。

## 从TeSR™-E8™培养基转换到mTeSR™1

在TeSR™-E8™中培养的人ES和iPS细胞可以很方便的转移到mTeSR™1中培养（7.1.1节）。转移后，一开始的1-2代细胞自发性分化可能会增多。人工去除分化的区域（5.1.1节）或者使用特殊的解离试剂例如ReLeSR™（5.1.1节）会帮助细胞快速的适应新的环境，不会影响长期培养细胞的状态。

## 从其他无饲养层培养基转移到mTeSR™1

在TeSR™2中培养的，或者其他无饲养层培养基培养的人ES和iPS细胞，可以很方便的转换到mTeSR™1（7.1.1节）。细胞可以无缝转换至mTeSR™1，很少发生形态、多能性和增长率的变化。

## 从依赖饲养层的培养体系转换到mTeSR™1

生长在饲养层上的人ES和iPS细胞可以很方便的转换到mTeSR™1（7.1.4节）。培养1-2代后，细胞就会适应无饲养层的培养，表现出和无饲养层人多能干细胞一致的形态。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

## Table of Contents

使用mTeSR™1进行细胞培养的关键步骤 .....	i
<b>1.0 介绍 .....</b>	<b>1</b>
<b>2.0 材料, 试剂和设备 .....</b>	<b>2</b>
2.1 mTeSR™1培养基 .....	2
2.2 人ES和iPS细胞培养所需的额外材料 .....	2
2.3 维持人ES和iPS细胞培养所需的设备 .....	3
<b>3.0 用mTeSR™1培养人ES和iPS细胞 .....</b>	<b>4</b>
3.1 细胞在mTeSR™1培养的形态 .....	4
3.2 使用mTeSR™1进行培养时如何确定传代时间 .....	7
<b>4.0 试剂和材料的准备 .....</b>	<b>16</b>
4.1 配制mTeSR™1完全培养基 .....	16
4.2 培养器皿的基质包被 .....	16
4.2.1 Vitronectin XF™ .....	16
4.2.2 Corning® Matrigel® .....	18
<b>5.0 在mTeSR™1中生长的人ES和iPS细胞的传代 .....</b>	<b>19</b>
5.1 无酶传代方法 .....	19
5.1.1 ReLeSR™ .....	19
5.1.2 温和细胞解离试剂 (GCDR) .....	21
5.2 含酶的传代方案 .....	25
5.2.1 分散酶 .....	25
<b>6.0 定制传代方案 .....</b>	<b>28</b>
6.1 细胞聚集体大小 .....	29
6.2 传代时克隆的密度 .....	30
<b>7.0 附加的流程 .....</b>	<b>31</b>
7.1 转换细胞的培养体系 .....	31
7.1.1 从无饲养层培养基过渡到mTeSR™1 .....	31
7.1.2 从mTeSR™1过渡到TeSR™-E8™或TeSR™2 .....	31
7.1.3 从Corning® Matrigel®过渡到Vitronectin XF™ .....	31
7.1.4 从饲养层的培养体系过渡到mTeSR™1 .....	32

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明, 不可用于人或动物的诊断或治疗。

---

7.2	为下游应用制备单细胞悬液 .....	33
7.3	细胞的冻存和解冻 .....	34
7.3.1	mFreSR™和Cryostor® CS10 (细胞聚集体) .....	34
7.3.2	FreSR™-S (单细胞) .....	36
8.0	疑难解答 .....	38
9.0	参考文献 .....	40
<b>附录1: 用人ES和iPS细胞聚集体进行铺板时, 聚集体的计数方法 .....</b>		<b>41</b>
<b>附录2: 流式细胞术技术方案 .....</b>		<b>42</b>
试剂和材料 .....	42	
准备单细胞悬液进行流式检测 .....	43	
标记表面抗原的技术方案 .....	43	
标记细胞内抗原OCT4的技术方案 .....	44	

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明, 不可用于人或动物的诊断或治疗。

## 1.0 介绍

在无饲养层体系中维持和增殖人胚胎干 (ES) 和诱导多能干 (iPS) 细胞，需要使用复杂的培养基配方以及小心谨慎的操作，来维持每一代的高质量的细胞培养。使用无饲养层培养体系消除了饲养层细胞固有的生物变异性，去除了培养体系中的不确定成分。近期的研究主要集中于简化培养体系（培养基，基质，传代试剂），去除所有不明的成分，提高人ES和iPS细胞培养方法的重现性。

**mTeSR™1**是一种成分确定，无需饲养层的人ES和iPS细胞培养基，配方基于James Thomson实验室公开发表的文献<sup>1-4</sup>。**mTeSR™1**可与Corning® Matrigel®基质配合使用，维持培养高质量的人ES和iPS细胞，或与Vitronectin XF™（由Primorigen Biosciences Inc.研发生产）配合使用，以保证整个培养体系成分确定。另外，**mTeSR™1**同时兼容无酶和有酶两种传代方法。

**mTeSR™1**是最为广泛应用的无饲养层培养基，具有超过1500篇文献支持。已经被成功的用于维持培养数百种不同的人ES和iPS细胞系。发表的文献包括多方面用途，包括细胞系建立和在**mTeSR™1**维持培养的细胞，可定向分化为多种细胞类型。

如需完整的文献列表，请访问[www.stemcell.com/mTeSR1publications](http://www.stemcell.com/mTeSR1publications)。

在**mTeSR™1**中维持培养的人ES和iPS细胞：

- 表型一致，核型正常
- 高表达多种未分化多能干细胞的基因（例如OCT4, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81和NANOG）
- 可形成包含三个胚层细胞的畸胎瘤
- 可定向分化成为所有三个胚层的成熟细胞类型（例如，中胚层，内胚层和外胚层）
- 从饲养层依赖的培养体系转换时不需要适应期（例如没有细胞产率低的时期）
- 兼容生物反应器和悬浮培养

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

## 2.0 材料, 试剂和设备

### 2.1 mTeSR™1培养基

mTeSR™1	组分	体积	存贮条件	有效期
500 mL (产品号 #85850)	mTeSR™1基础培养基 (#85851)	400 mL	2 - 8°C.	标签上有效期内稳定。
	mTeSR™1 5X 添加物 (#85852)	100 mL	-20°C.	标签上有效期内稳定。
1 L (产品号 #85857)	mTeSR™1基础培养基 (#85871)	800 mL	2 - 8°C.	标签上有效期内稳定。
	2 x mTeSR™1 5X 添加物 (#85852)	2 x 100 mL	-20°C.	标签上有效期内稳定。

### 2.2 人ES和iPS细胞培养所需的额外材料

试剂类型	产品名称	产品号 #
传代试剂	ReLeSR™	05872
	温和细胞解离试剂 (GCDR)	07174
	分散酶 (1 U/mL)	07923
基质和相关材料	Vitronectin XF™ 试剂盒	07190
	Vitronectin XF™	07180
	CellAdhere™ 稀释缓冲液	07183
	非组织培养处理的6孔培养板*	27147
	Corning® Matrigel® hESC-Qualified Matrix	Corning 354277
	组织培养处理的培养皿**	例如: 6孔培养板, 产品号 #38016
冻存保存液	mFreSR™	05855
	CryoStor® CS10	07930
	FreSR™-S	05859
其他材料	DMEM/F-12 with 15 mM HEPES	36254
	细胞刮刀	e.g. Corning 产品号 #3010 或 Fisherbrand 产品号 #08-100-240
	不含Ca++和Mg++的DPBS	37350
	Y-27632 (Dihydrochloride) (ROCK 抑制剂)	72302
	台盼蓝	07050

\* 需要与Vitronectin XF™合用

\*\* 需要与Corning® Matrigel®合用

STEMCELL Technologies Inc推出的人ES和iPS细胞研究的完整产品列表, 请访问我们的网站  
[www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明, 不可用于人或动物的诊断或治疗。

## 2.3 维持人ES和iPS细胞培养所需的设备

- 二级生物材料处理认证的生物安全柜
- 湿度和温度可控的细胞培养箱, 用于保持37°C和95%湿度, 含有5% CO<sub>2</sub>
- 低速吊篮离心机 (例如Beckman GS-6)  
注意: 手册中所有描述的流程都可以在有刹车的条件下进行。
- 电动移液器 (例如Drummond Scientific) 和合适的血清移液管
- 移液枪 (例如Eppendorf, Gilson) 和枪头
- 可放大20 - 100倍的倒置显微镜 (例如 Olympus CKX31)
- 异丙醇冻存盒 (例如 Nalgene, Fisher; 产品号 #1535050)
- -150°C冰箱或液氮罐
- -80°C冰箱
- -20°C冰箱
- 冰箱 (2 - 8°C)

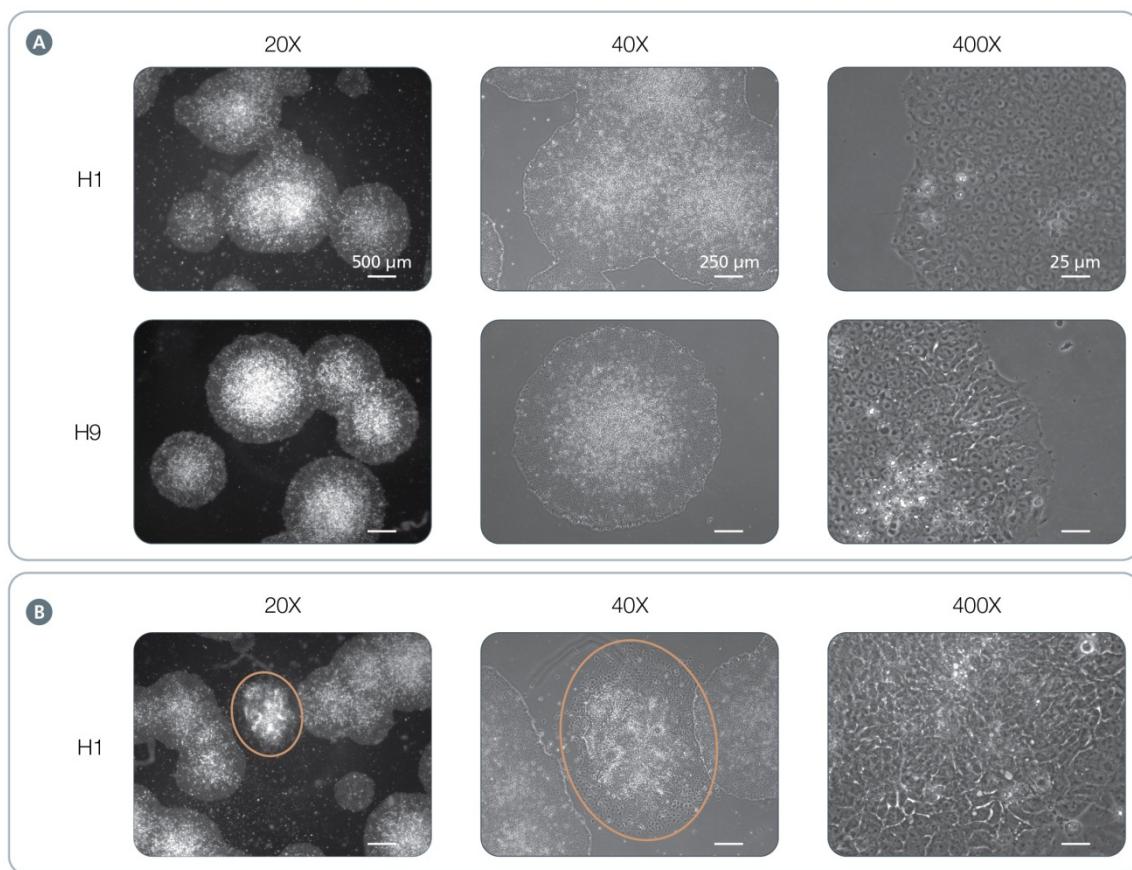
本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明, 不可用于人或动物的诊断或治疗。

### 3.0 用mTeSR™1培养人ES和iPS细胞

在mTeSR™1培养基中培养人ES和iPS细胞，过程可能不同于在其他培养基中培养。手册中描述的步骤通用  
于常规细胞，对于特殊的细胞系可能需要进一步的优化。

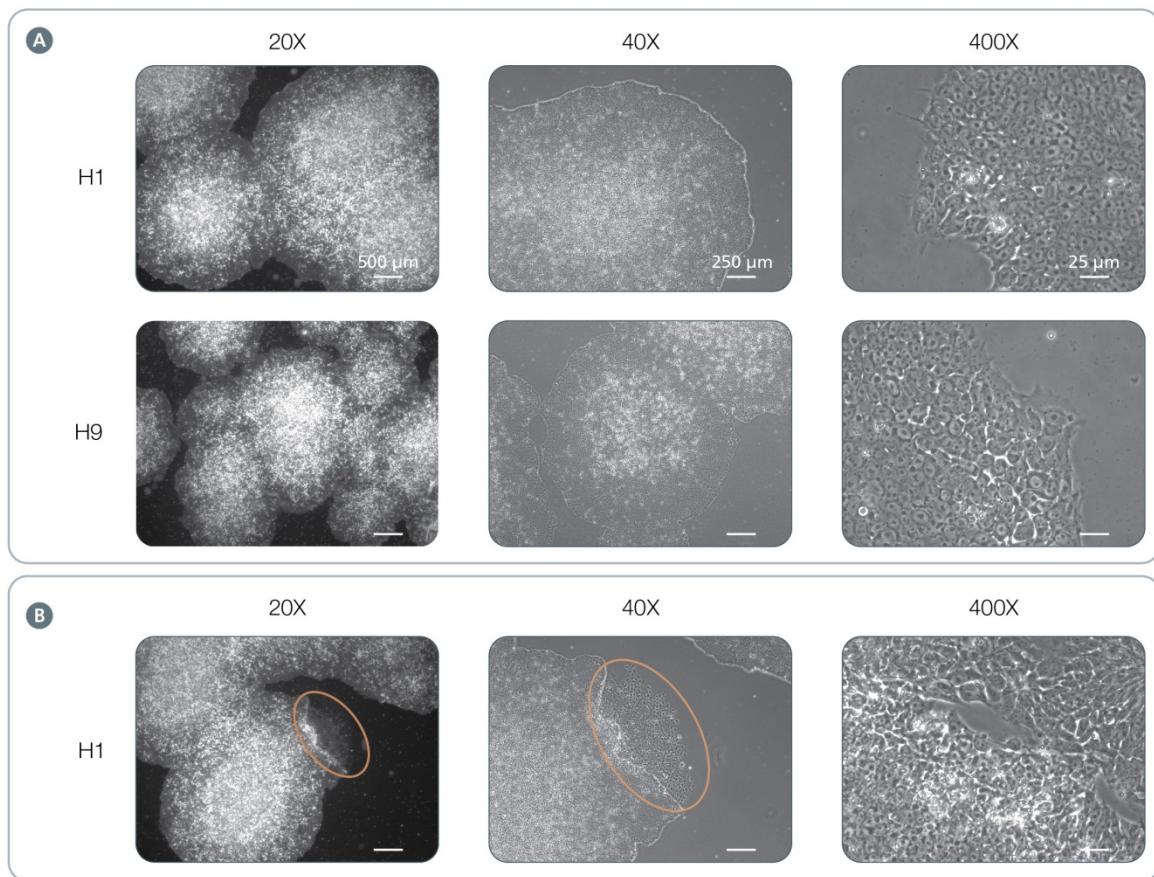
#### 3.1 细胞在mTeSR™1培养的形态

未分化的人ES细胞（图1A和图2A）和iPS细胞（图3A和图4A）在mTeSR™1中培养，形成紧密的多细胞集落  
，具有清晰的边界。细胞间紧密的堆积起来，具有高核质比，且核仁显著。健康的集落会无缝的融合起来，在  
中心有多层细胞，在相衬显微镜下观察，成紧密的细胞簇。mTeSR™1中培养的集落在Vitronectin XF™上生  
长时更紧密且更圆（图1和图3），而使用Corning® Matrigel®生长的集落则较为分散且形状不规则。在这两种  
基质上，自发性分化的特征表现为失去集落边界的完整性，一个集落内有不规则的细胞形态区域，或者出现其  
他的细胞类型等（图1B，图2B，图3B）。



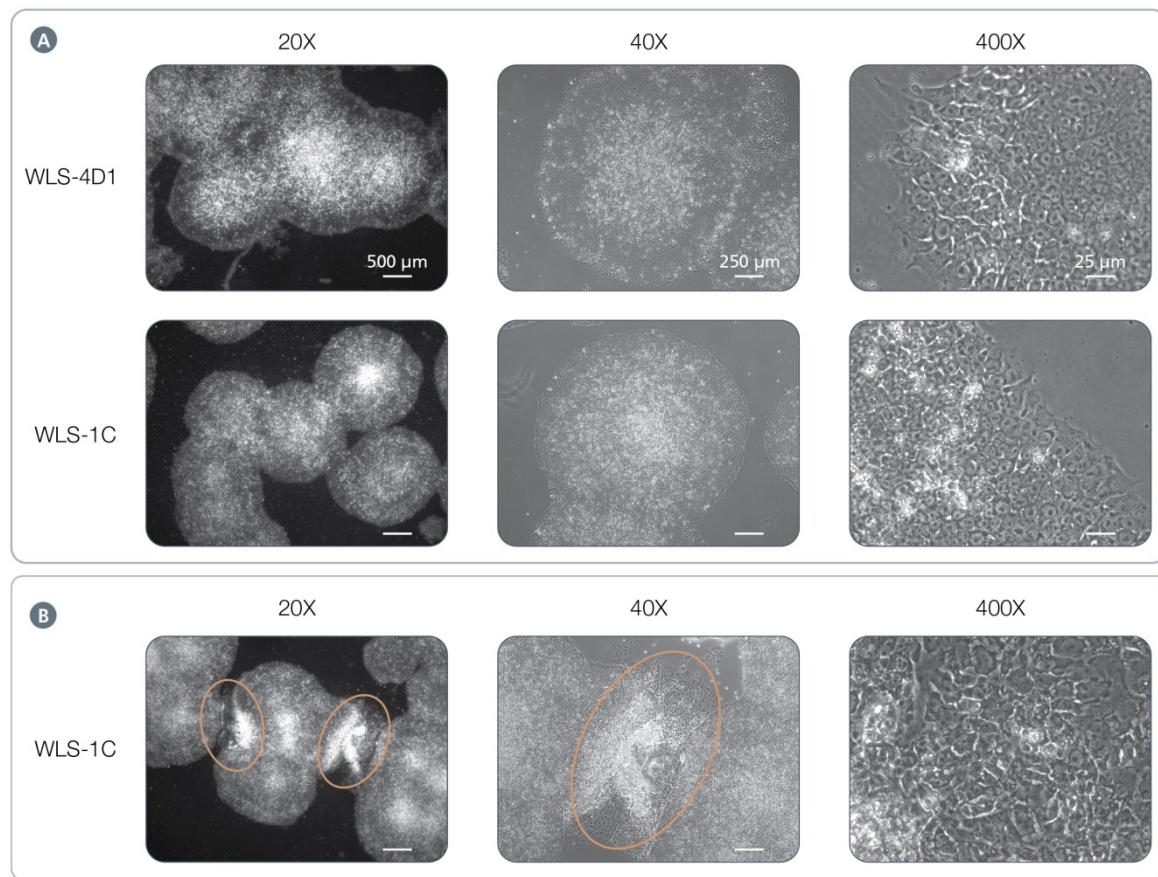
**图1. 在 Vitronectin XF™上和mTeSR™1中培养的人ES细胞的形态特征。** (A) 最佳传代时的未分化的  
人ES细胞 (H1和H9)。(B) 两个未分化的H1集落中间出现自发性分化的区域 (橙色圈中)。图像使用了  
三种放大倍率: 20X, 40X和400X。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。



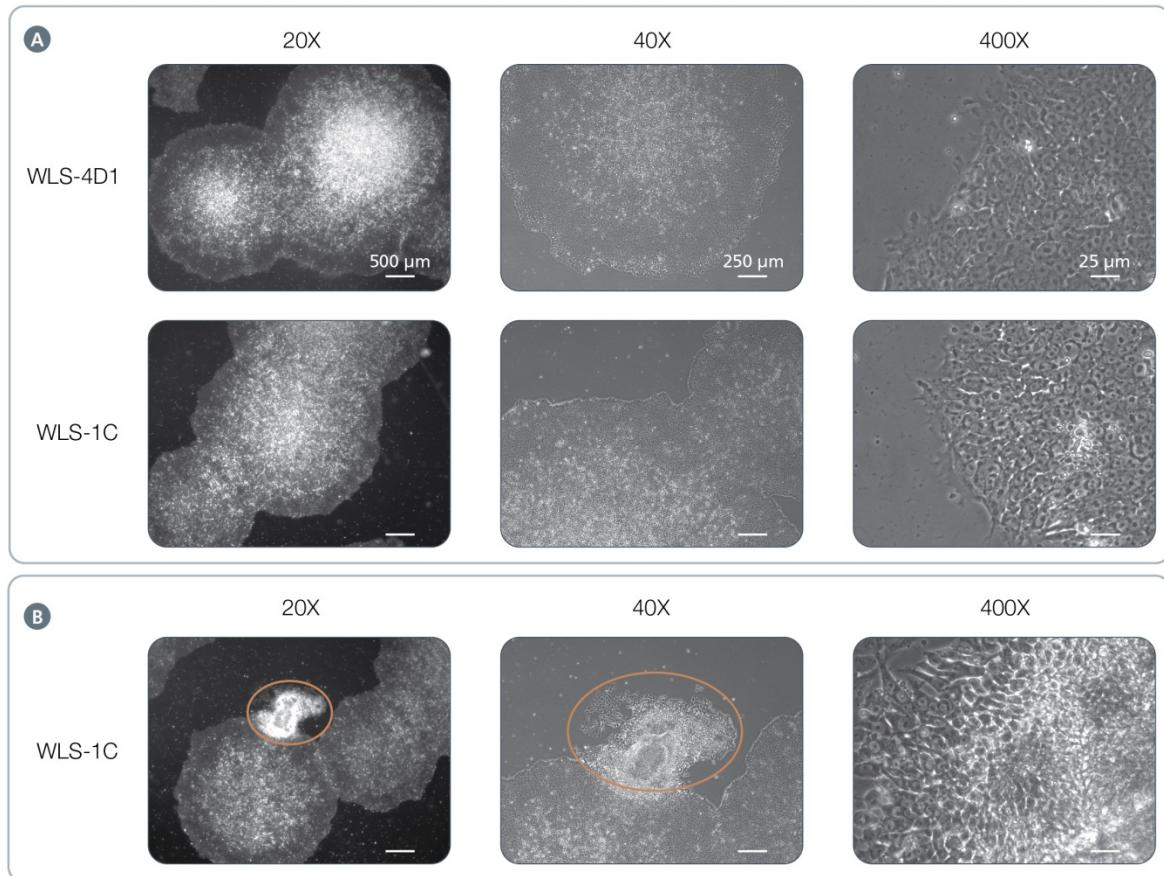
**图2. 在Corning® MatriGel®和mTeSR™1中培养的人ES的形态特征。** (A) 最佳传代时期未分化的人ES细胞 (H1和H9)。 (B) 在一个未分化的H1集落旁边自发性分化的区域 (橙色圈中)。图像使用了三种放大倍率: 20X, 40X和400X。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明, 不可用于人或动物的诊断或治疗。



**图3. 在Vitronectin XF™和mTeSR™1中培养的人iPS细胞的形态特征。** (A) 最佳传代时期未分化的人iPS细胞细胞 (WLS-4D1和WLS-1C)。 (B) 在两个未分化WLS-1C集落中间出现的自发性分化区域 (橙色圈中)。 图像使用了三种放大倍率: 20X, 40X和400X。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明, 不可用于人或动物的诊断或治疗。



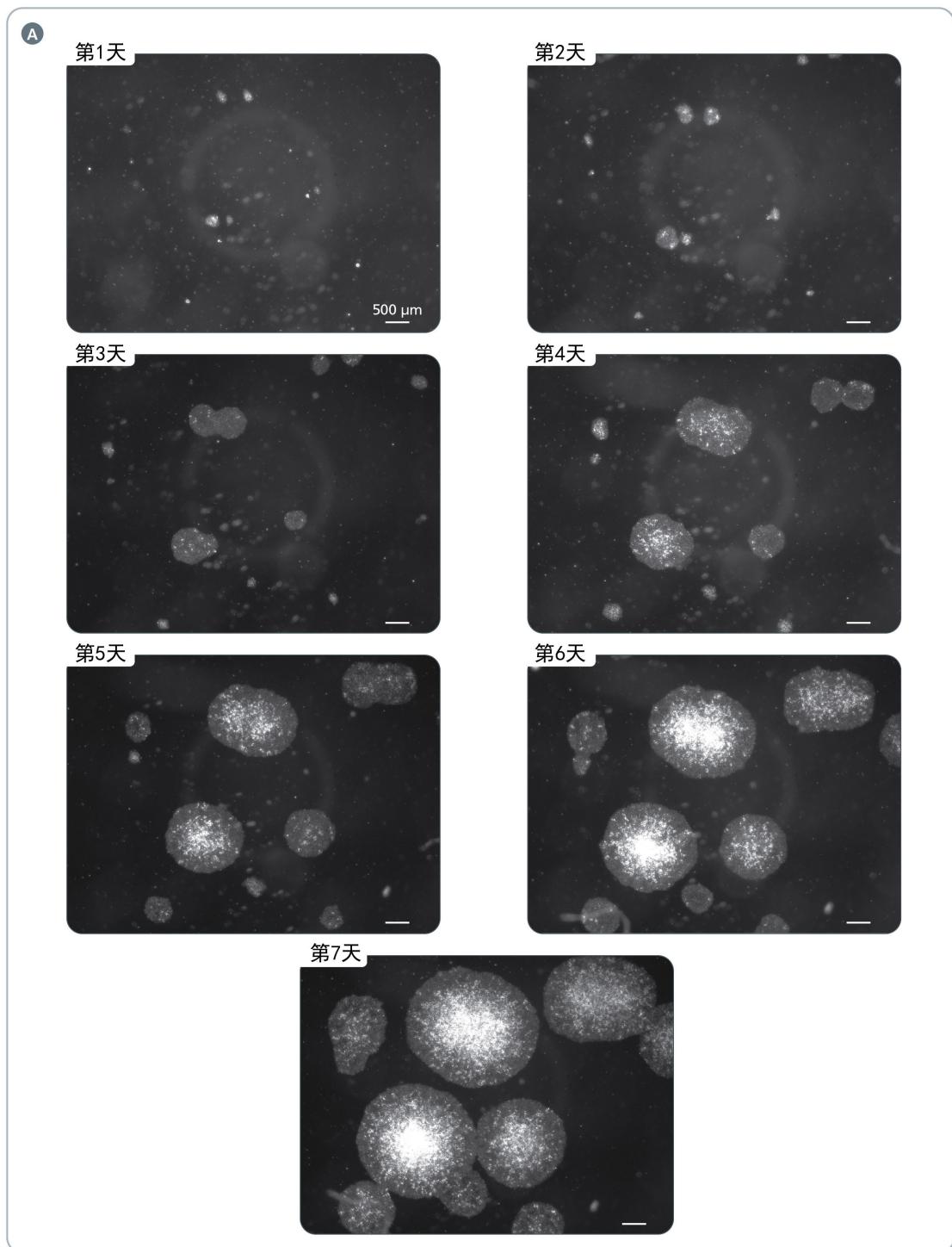
**图4. 在Corning® MatriGel®和mTeSR™1中培养的人iPS细胞的形态特征。** (A) 最佳传代时期未分化的人iPS细胞 (WLS-4D1和WLS-1C)。 (B) 未分化WLS-1C集落边界旁的自发性分化区域 (橙色圈中)。图像使用了三种放大倍率: 20X, 40X和400X。

### 3.2 使用mTeSR™1进行培养时如何确定传代时间

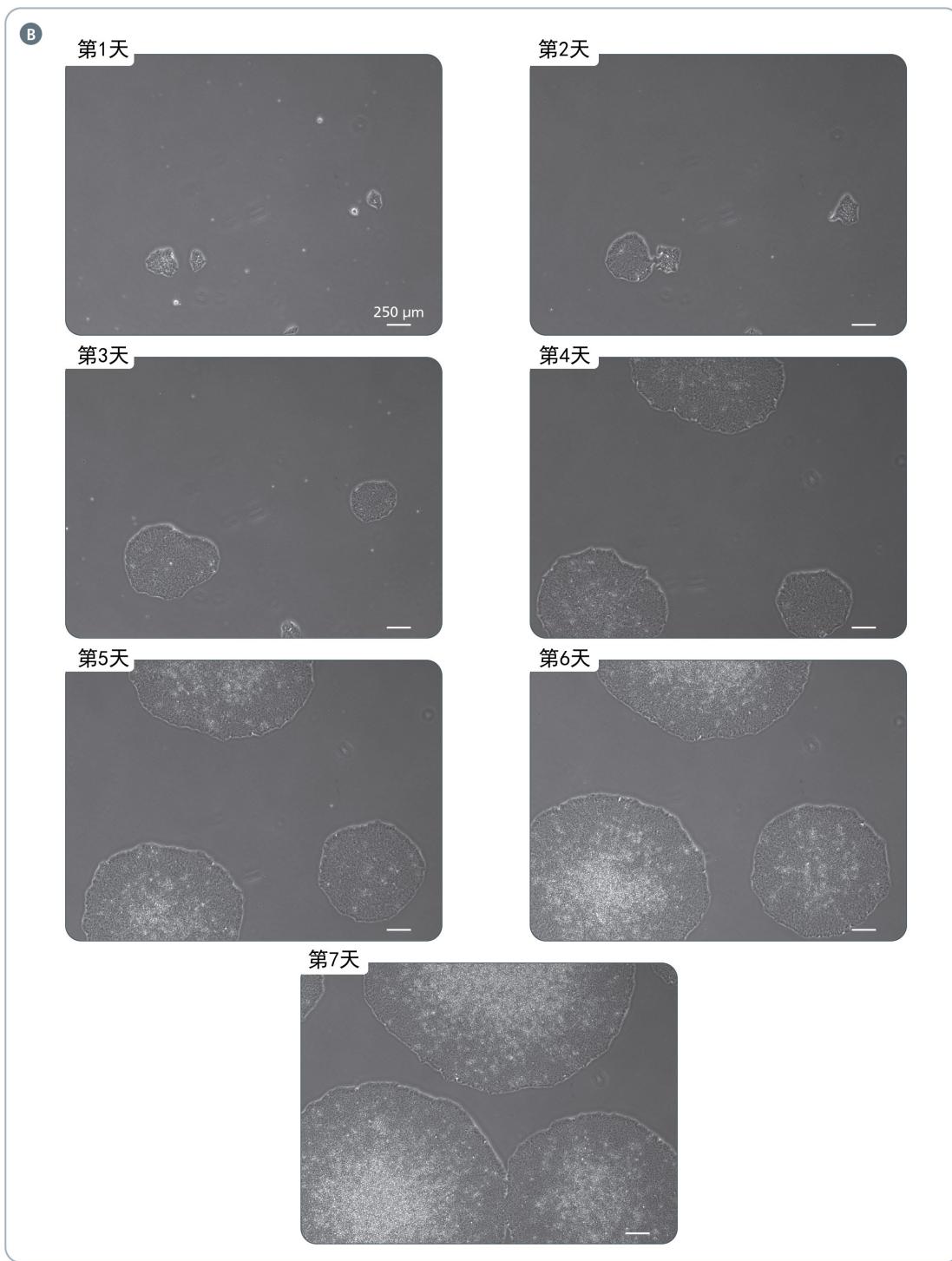
在mTeSR™1中培养的人ES和iPS细胞, 当大多数集落长得大, 紧密, 集落的中心比边缘更致密的时候, 就可以传代了 (图5, 图6, 图7, 图8)。使用其他培养基时集落形态会有所不同。在mTeSR™1中铺板第4天, 集落可能还没有显示非常致密的细胞堆积, 但四天后, 集落的密度和大小会迅速增加, 同时在传代之前的1 - 2天, 集落的形态也会发生显著的变化。

如果将集落传代的太早或者太频繁, 在铺板的时候, 细胞聚集体也许会变得不贴壁, 导致产率降低, 而且细胞也可能会开始分化 (出现其他的细胞种类和不同的形态)。如果传代时间太晚, 培养物可能会开始出现分化的迹象。大概会有24 - 48小时的最佳传代时间窗口。如果出现较大的集落, 并具有有致密的中心, 需要在24小时内传代 (更多的信息参见8.0节)。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明, 不可用于人或动物的诊断或治疗。

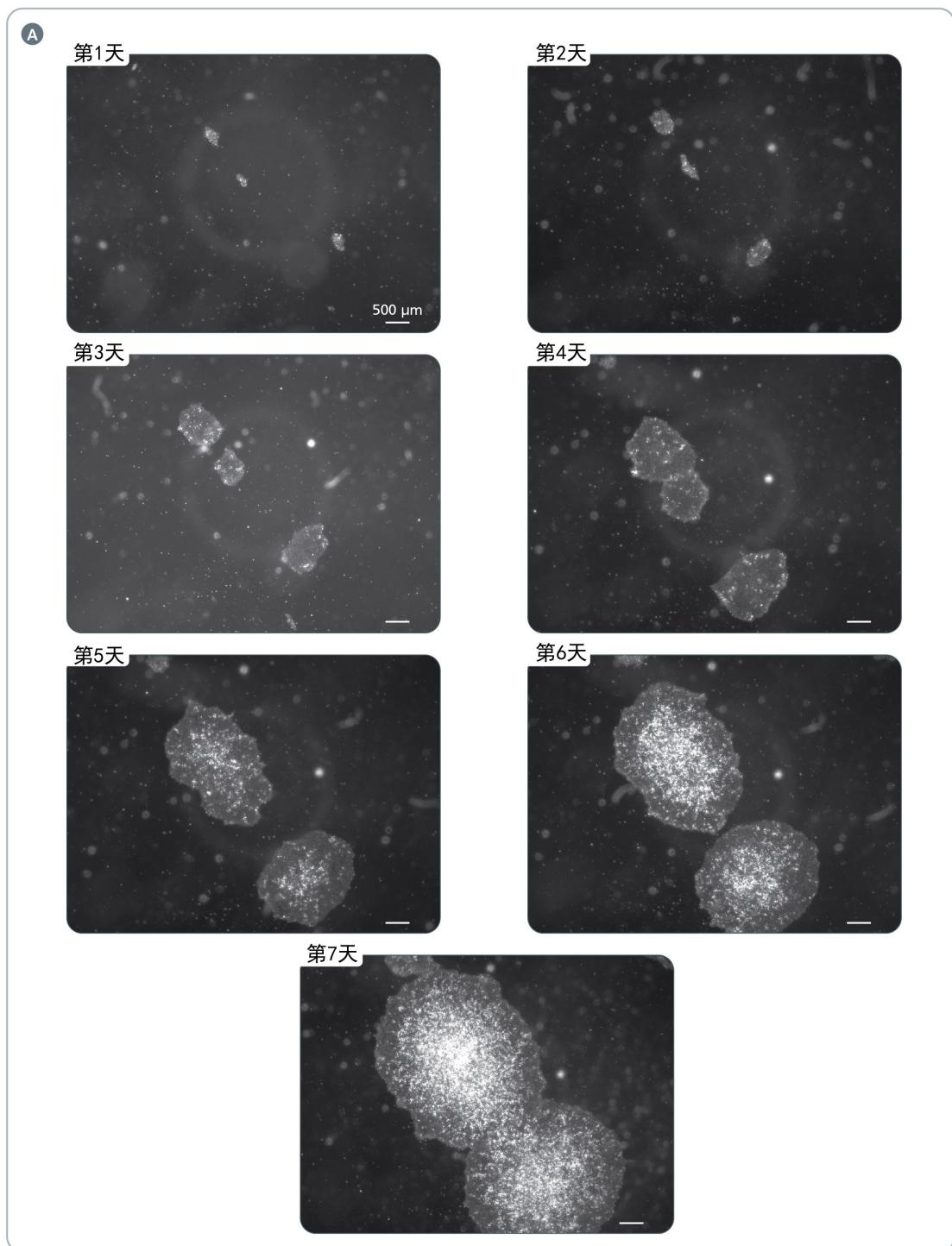


本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

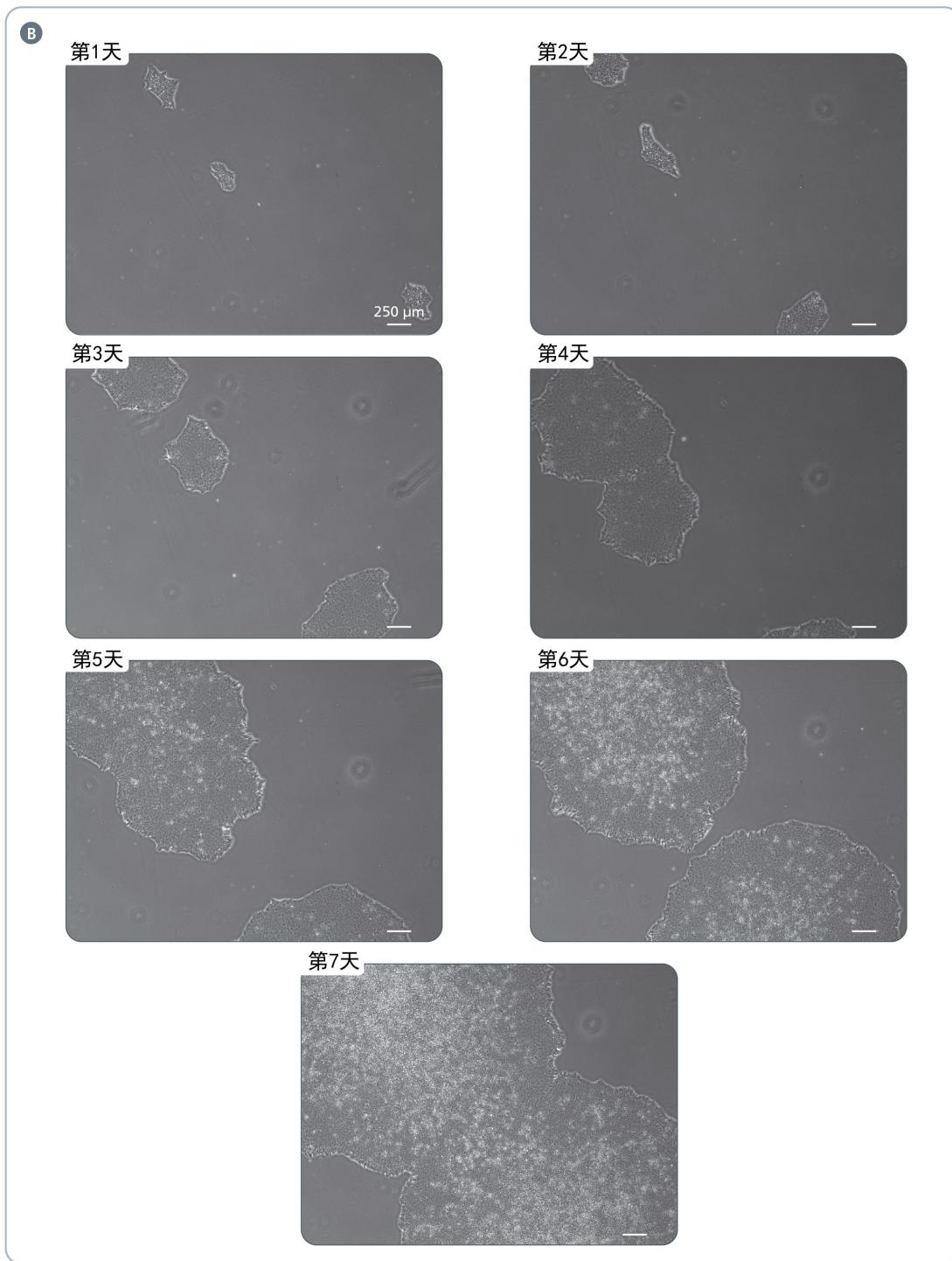


**图5. 传代1 - 7天后的人ES细胞培养于Vitronectin XF™和mTeSR™1中的形态。**人ES细胞 (H1) 的照片，分别放大 (A) 20倍 (B) 40倍。对这种培养体系，第7天是最佳的传代时间。注意：最佳的传代时间由铺板密度和聚集体大小决定 (6.0节)。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

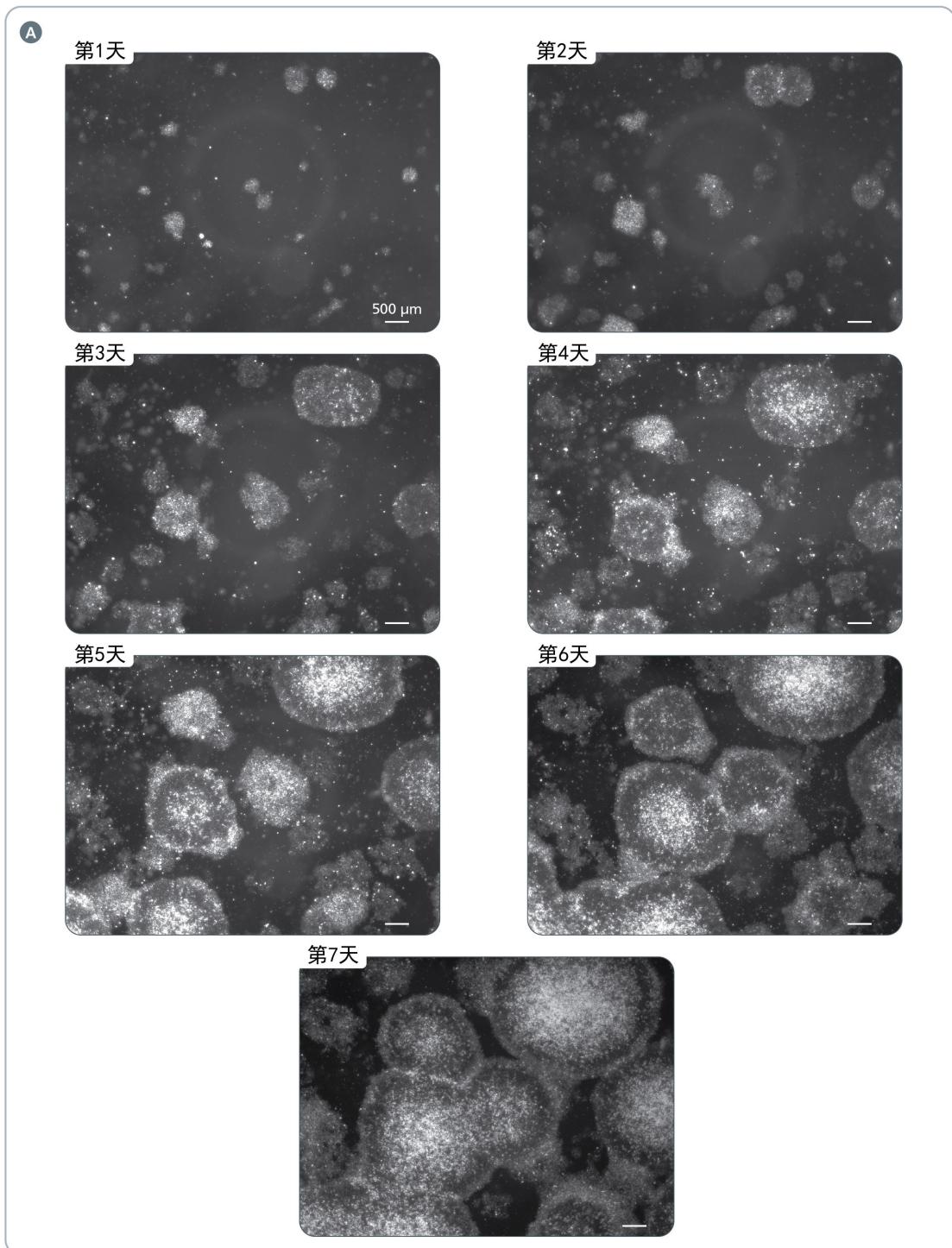


本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

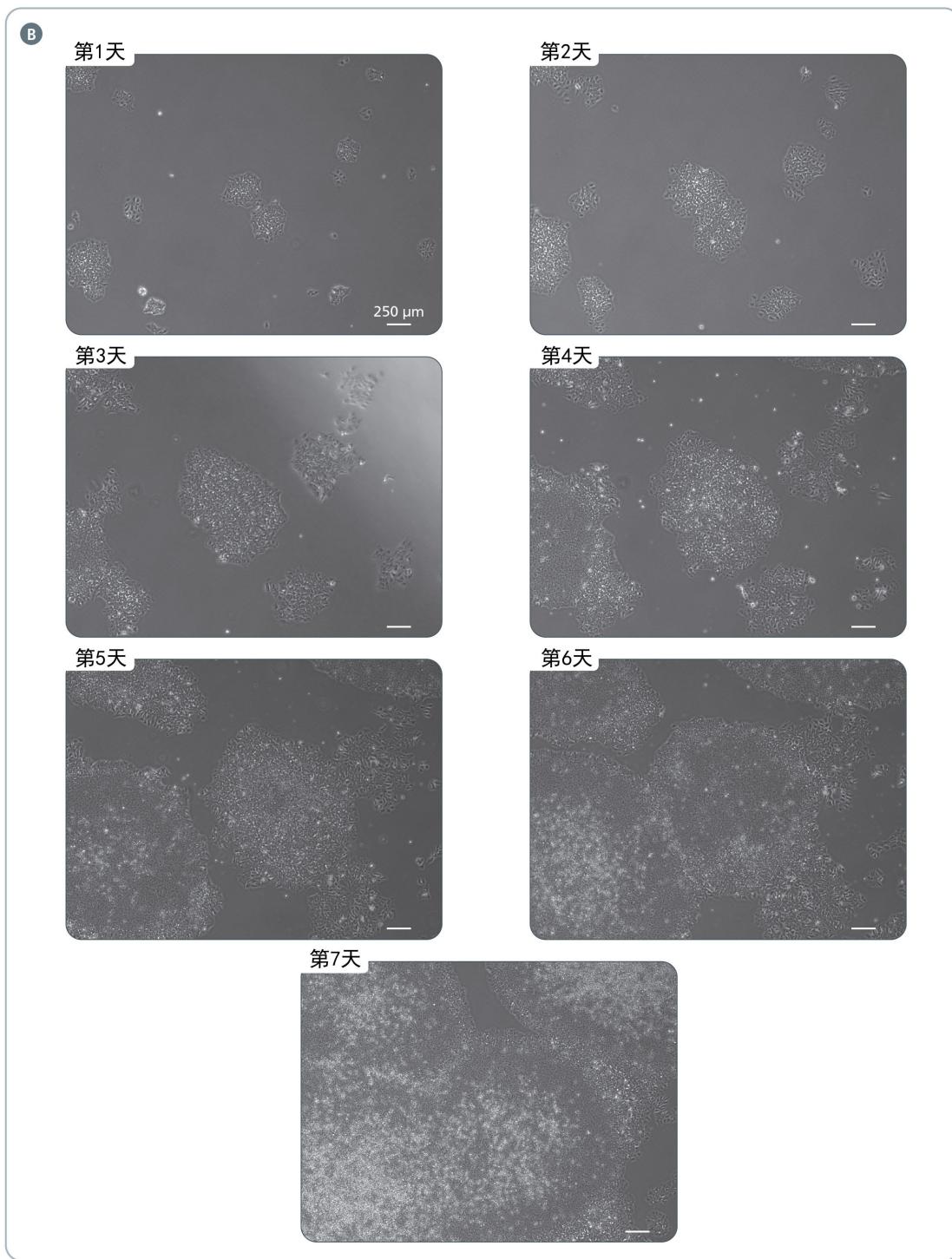


**图6. 传代1 - 7天后的人ES细胞培养于Corning® Matrigel®和mTeSR™1中的形态。**人ES细胞 (H1) 的照片，分别放大 (A) 20倍 (B) 40倍的照片。对这种培养体系，第7天是最佳的传代时间。注意：最佳的传代时间由铺板密度和聚集体大小决定（参见6.0节）。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

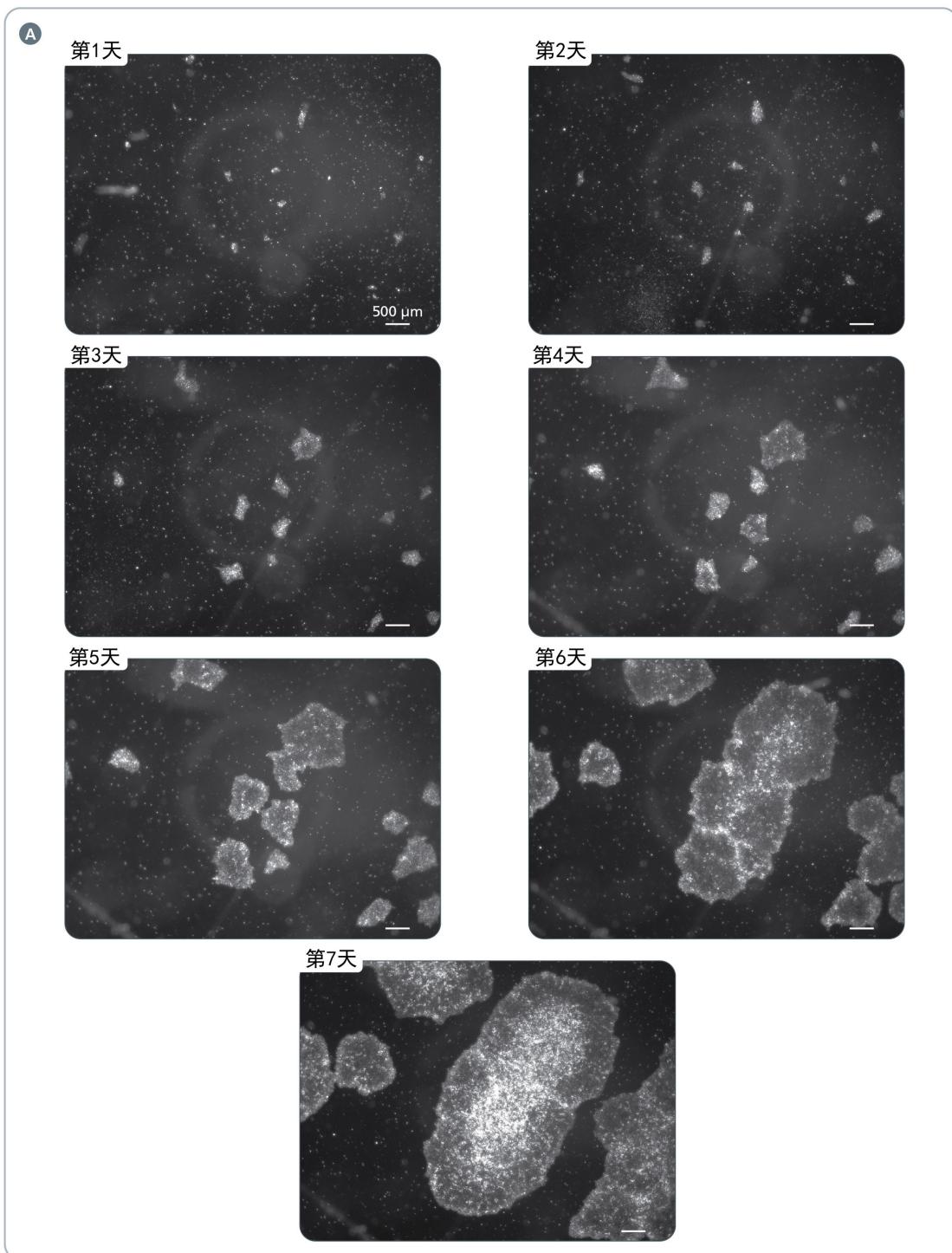


本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

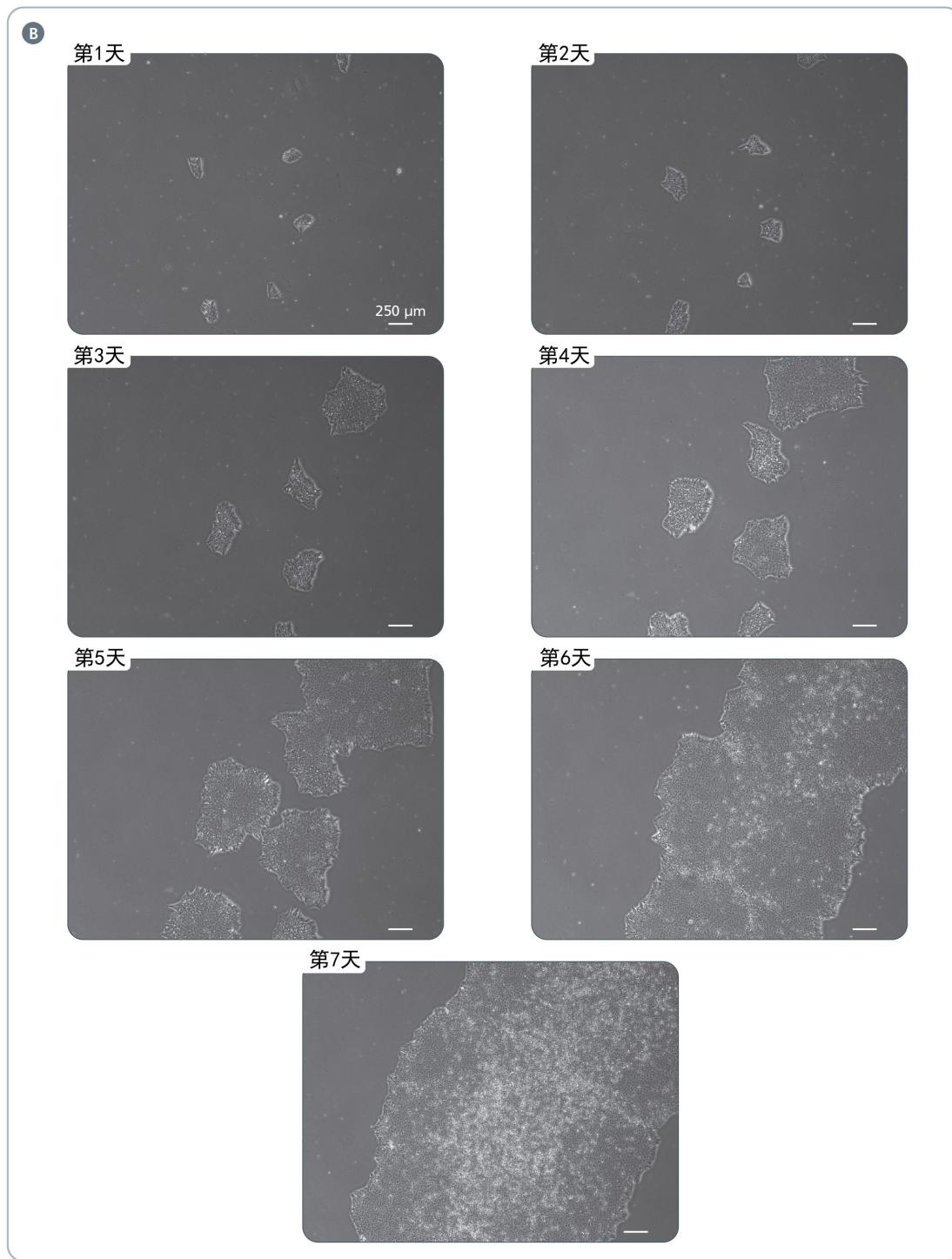


**图7. 传代1 - 7天后的人iPS细胞培养于Vitronectin XF™和mTeSR™1中的形态。**人iPS (WLS-4D1) 细胞的照片，分别放大 (A) 20倍 (B) 40倍。对这种培养体系，最佳的传代时间是第七天。注意：最佳的传代时间由铺板密度和聚集体大小决定 (参见6.0节)。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。



本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。



**图8. 传代1 - 7天后人iPS细胞培养于Corning® MatriGel®和mTeSR™1中的形态。**人iPS细胞 (STiPS-M001) 的照片，分别放大 (A) 20倍 (B) 40倍。对这种培养体系，最佳的传代时间是第七天。注意：最佳的传代时间由铺板密度和聚集体大小决定（参见6.0节）。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

## 4.0 试剂和材料的准备

### 4.1 配制mTeSR™1完全培养基

使用无菌操作制备mTeSR™1的完全培养基（基础培养基 + 5X 添加物）。下面的示例是配置500 mL的完全培养基。如需准备其他体积，请按照比例调整。

**注意：**在室温（15 - 25°C）融解添加物和完全培养基，或者2 - 8°C过夜融解。不可使用37°C水浴解冻。

1. 将mTeSR™1 5X解冻添加剂并完全混匀。

**注意：**一旦解冻，立即使用或者分装并储存于-20°C，于-20°C可贮存3个月。不要超过添加剂的有效期。分装的添加剂融解后，立即使用。不可再次冷冻。

2. 将100 mL的mTeSR™1 5X添加剂加入到400 mL的mTeSR™1基础培养基中，彻底混匀。

**注意：**如果不立即使用，mTeSR™1完全培养基可以在2 - 8°C存储2周。或者分装并储存于-20°C可达6个月。不可超过每个单独组分的有效期。分装的完全培养基融解后，立即使用或者在2 - 8°C保存可达2周。不要重新冷冻。

如果是无菌制备，mTeSR™1完全培养基可以立刻使用。如果需要，也可以用0.2 μm低蛋白滤器过滤。

### 4.2 培养器皿的基质包被

使用mTeSR™1成功的培养人ES和iPS细胞，需要恰当的基质让细胞聚集体贴附。推荐搭配Vitronectin XF™（产品号 #07180）或者Corning® Matrigel® hESC-Qualified Matrix（Corning 产品号 #354277）和mTeSR™1配合使用。当需要成分完全确定的培养体系时，推荐使用Vitronectin XF™重组蛋白基质。

#### 4.2.1 Vitronectin XF™

用Vitronectin XF™包被培养皿时，需进行无菌操作。

**注意：**使用非组织培养处理的培养皿（例如非组织处理的6孔板；产品号 #27147）。

1. 在室温（15 - 25°C）将Vitronectin XF™解融。
2. 将Vitronectin XF™用CellAdhere™稀释缓冲液（产品号 #07183）稀释到终浓度10 μg/mL（例如，40 μL的Vitronectin XF™加入到每毫升的CellAdhere™稀释缓冲液中）。用50 mL的聚苯丙乙烯尖底管稀释Vitronectin XF™。
3. 温和的混匀稀释的Vitronectin XF™，不要涡旋震荡。
4. 立即使用稀释好的Vitronectin XF™溶液包被非组织处理的培养基。表1是推荐的包被体积。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

表1. 包被培养皿的推荐体积

培养皿*	稀释后的基质体积
6孔培养板	1 mL/孔
10 mm培养皿	6 mL/培养皿
T-25 cm <sup>2</sup> 培养瓶	3 mL/培养瓶
T-75 cm <sup>2</sup> 培养瓶	8 mL/培养瓶

\* 包被Vitronectin XF™需要使用非组织处理的培养皿。

5. 轻柔的前后摇晃培养皿，让Vitronectin XF™溶液均匀的覆盖培养皿表面。

注意：如果培养皿的表面没有被Vitronectin XF™完全覆盖，不可用于人ES或iPS细胞的培养。

6. 使用前在室温（15 - 25°C）孵育至少1个小时。不要让Vitronectin XF™挥发。

注意：如果不是立即使用，培养皿必须密封防止Vitronectin XF™溶液的蒸发（比如使用Parafilm®密封），在2 - 8°C 可以存放一周。使用前，经冷藏的包被培养皿需要在室温（15 - 25°C）下放置30分钟以恢复到室温。

7. 轻轻的将培养皿向一侧倾斜，让多余的Vitronectin XF™溶液集中在一侧。用吸管或者泵吸取多余的溶液。注意不要刮花包被的表面。

8. 用CellAdhere™稀释液清洗一次培养皿（例如，如果用6孔板，用2 mL/孔清洗）。

9. 吸走清洗液，加入mTeSR™1 培养基（例如，6孔板，每孔加入2 mL）。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

#### 4.2.2 Corning® Matrigel®

Corning® Matrigel® hESC-qualified基质应该分装冻存。参考厂家提供的分析认证文件，确定分装的体积（或称稀释倍数），配制24 mL稀释的基质。解融和处理Corning® Matrigel®时确保将其放置在冰上，以防止Corning® Matrigel®凝固。

**注意：使用经组织培养处理的培养器皿（例如，6孔板，产品号 #38016）**

1. 在冰上解融一份分装的Corning® Matrigel®。
2. 在50 mL离心管中加入24 mL的预冷的DMEM/F-12，并且放在冰上。
3. 将解融的Corning® Matrigel®加入到预冷的DMEM/F-12中（在50 mL离心管中），混匀。如果需要，可用预冷的培养基清洗Corning® Matrigel®的管。
4. 稀释好的Corning® Matrigel®溶液必须立即使用，进行培养皿的包被。推荐的包被体积参见表1。
5. 轻轻晃动培养皿，将Corning® Matrigel®溶液均匀的覆盖到培养皿的表面。
6. 使用前至少在室温(15 - 25°C)孵育1个小时，不可使Corning® Matrigel®蒸发。  
**注意：如果不是立即使用，包被好的培养皿必须密封防止Corning® Matrigel®溶液的蒸发（例如使用Parafilm®），包被后可以在2 - 8°C放置一周。在使用之前，至少在室温（15 - 25°C）中放置30分钟恢复到室温。**
7. 轻轻的将培养皿的一侧倾斜，使多余的Corning® Matrigel®溶液在一侧的边缘汇聚。通过移液器或者泵吸取多余的Corning® Matrigel®溶液。确保包被的表面没有被刮到。
8. 立即加入mTeSR™1培养基（例如，6孔板每孔2 mL）。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

## 5.0 在mTeSR™1中生长的人ES和iPS细胞的传代

在mTeSR™1培养基中维持培养的人ES和iPS细胞可以用多种方法进行传代，有酶和无酶方法在本节中都有描述。为了达到最佳的性能，选择一种合适的且能兼容所用培养基的传代试剂是非常重要的（表2）。

**表2. 兼容的基质和传代试剂**

基质	兼容的传代试剂
Vitronectin XF™	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ReLeSR™</li> <li>• 温和细胞解离试剂（GCDR）</li> </ul>
Corning® Matrigel®	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ReLeSR™</li> <li>• 温和细胞解离试剂（GCDR）</li> <li>• 分散酶</li> </ul>

### 5.1 无酶传代方法

这些传代方法使用无酶解离的方式将集落从培养器皿脱离。使用此方式制备的细胞聚集体可能很脆弱，应该尽快进行铺板。

#### 5.1.1 ReLeSR™

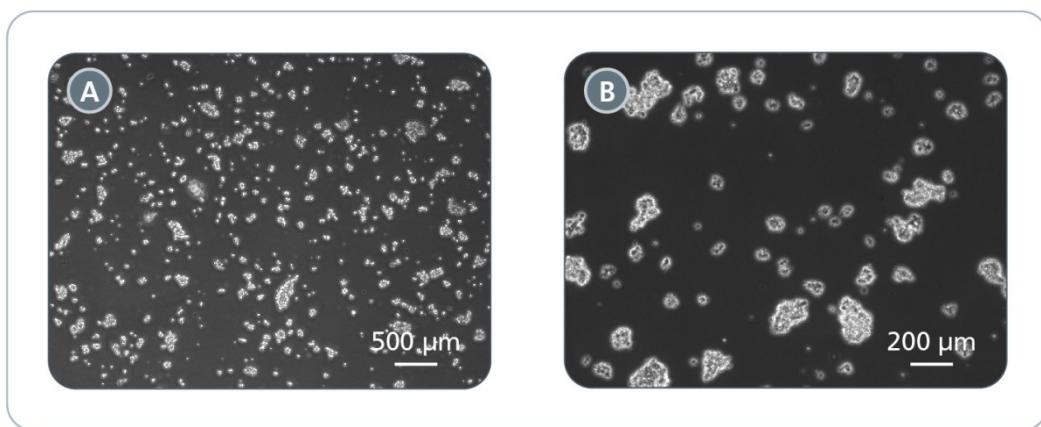
ReLeSR™是一种无酶的试剂，用于解离和以聚集体传代的方式传代人ES和iPS细胞，且无需手工选取或刮擦分化的区域。下面的方法推荐用于首次在mTeSR™1中培养细胞。

下面的步骤适用于6孔板的单孔操作。如果使用其他培养器皿，请对应地调整体积。

1. 传代前，至少提前一个小时使用Vitronectin XF™（4.2.1节）或Corning® Matrigel®（4.2.2节）包被6孔板。
2. 分装够用的mTeSR™1，将其恢复到室温（15 - 25°C）。
3. 使用1 mL的不含Ca++和Mg++的D-PBS清洗细胞，并吸掉。
4. 注意：不要在37°C水浴中加热mTeSR™1。
5. 使用1 mL的ReLeSR™，并在一分钟内吸掉，此时集落上只剩薄薄的一层解离试剂。
6. 在37°C孵育5 - 7分钟。
7. 注意：最佳的解离时间根据不同的细胞系而会有差异。当第一次用ReLeSR™传代的时候，需要确定最佳的解离时间（更多信息请参见图9和8.0节）。
8. 加入1 mL的mTeSR™1。
9. 将孔板放在涡旋混匀仪上（例如：Multi-MicroPlate Genie, 120V, Scientific Industries Model SI-4000, 1200 rpm）2 - 3分钟来分离克隆。或者，用一只手握牢孔板，用另外一只手轻拍孔板的一侧，30 - 60秒。
10. 用5 mL的吸管把脱落的细胞聚集体转移到15 mL离心管，细胞聚集体的大小大约在50 - 200 μm（图9），此为适宜铺板的聚集体大小。
11. 注意：如果希望直接从传代的孔中铺板的话（即不转移到离心管），将聚集体混合物用一个5 mL的吸管吹打一次，这样确保大细胞聚集体都被打散。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

- 将聚集体按照所期望的密度铺板到包被好的并含有mTeSR™1的培养孔。当集落密度为最佳状态时，可以对培养物以1:10至1:50的分配比例（即将1个培养孔内的细胞聚集体分别铺板到10 - 50个新的培养孔中），每4 - 7天进行一次传代）。如果集落太密集或者太稀疏，可在下一次传代的时候调整传代比例（更多信息参见6.0节）。
  - 将孔板放入37°C培养箱。将孔板前后左右的快速摇晃几次，确保聚集体分布均匀。24小时内不可扰动培养板。
- 注意：聚集体分布不均匀可能会导致人*ES*和*IPS*细胞的分化。
- 用mTeSR™1每天换液，测评估培养物，监控生长状态，直到下一次传代。



**图9. ReLeSR™对在mTeSR™1中培养的人多能干细胞的影响。**图示为ReLeSR™流程第8步后理想的细胞聚集体大小（平均50 - 200 μm）。放大倍率：(A) 40X (B) 100X。如果细胞聚集体不类似于图中所示，传代的方法则需要进一步的优化（更多信息，参见第8节“ReleSR™消化的细胞聚集体大小不理想”）。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

### 5.1.2 温和细胞解离试剂 (GCDR)

GCDR是一种无酶的试剂，用于人ES和iPS细胞移聚集体方式传代，需要用手动刮擦生成的细胞聚集体。一旦熟悉下面的方法，可以通过改变细胞聚集体大小或者铺板密度，调整细胞的传代时间。如何调整传代方法，见6.0节。

下面的操作步骤适用于6孔板的单孔操作。如果使用其他培养器皿，请对应地调整体积。

1. 传代前至少提前一个小时，使用Vitronectin XF™ (4.2.1节) 或Corning® MatriGel® (4.2.2节) 包被孔板。
2. 分装够用的mTeSR™1，将其恢复到室温（15 - 25°C）。
- 注意：不可将mTeSR™1在37°C水浴加热。
3. 在显微镜下识别已发生分化的区域，然后用毡制粗头笔或透镜标志器在培养皿底部标记这些区域。
4. 用移液枪头或吸引器去除标记区域内发生分化的部分。避免培养板在培养箱外放置超过15分钟。
- 注意：如果分化区域小于5%，可以不需要刮除。如果培养物状态良好，分化区域不应超过20%。分化区域的典型图片见图1B, 图2B, 图3B, 图4B。
5. 吸走孔中的培养基，加入1 mL的GCDR。
6. 室温孵育，推荐的孵育时间见表3。

**表3. 不同基质使用温和细胞解离试剂的孵育时间**

基质	与GCDR的孵育时间	示意图
Vitronectin XF™	6 - 12 分钟	图10
Corning® MatriGel®	6 - 8 分钟	图11

注意：孵育时间根据不同的细胞系或者不同的无酶传代试剂可能会有所差异，因此解离过程需要在显微镜下监控，直到确定最佳的孵育时间。

7. 吸走GCDR试剂，加入1 mL的mTeSR™1培养基。用玻璃移液管或细胞刮（例如Corning 产品号 #3010 或 Fisher 产品号 #08-100-240）轻轻将集落刮取下来。
- 注意：尽量不要破坏克隆的完整性。操作时要务必小心，尽量防止集落解体。
8. 将刮取下来的细胞聚集体转移到15 mL锥形管中。
- 可选步骤：再向孔内添加1 mL的mTeSR™1培养基并进行冲洗，以收集残余的细胞聚集体。
- 注意：无需对聚集体进行离心分离。
9. 小心吸取细胞混合物并上下吹打2 - 3次，以打散聚集体。根据基质的不同，打碎聚集体的方式也有所差异，参照表4。均一的50 - 200 μm的聚集体悬液是最佳的，不要将其制备成单细胞悬液（更多信息，参见8.0节）。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

表4. 建议打散细胞聚集体的方法

基质	吸管类型	吹打次数*
Vitronectin XF™	1 mL 枪头	1 - 2
Corning® Matrigel®	2 mL 血清学移液管	2 - 5

\* 吹打的次数可以根据期望的聚集体大小进行调整 (6.1节)。合适的聚集体大小参考图13, 并且可以调整步骤以获得期望的结果。

10. 将聚集体按照所期望的密度铺板到包被好的并含有mTeSR™1的培养孔。当集落密度为最佳状态时, 可以对培养物每以1:10至1:50的分配比例 (即将1个培养孔内的细胞聚集体分别铺板到10 - 50个新的培养孔中), 每4 - 7天进行一次传代。如果集落太密集或者太稀疏分散, 可在下一次传代的时候调整传代分配比例 (更多信息参见6.0节)。

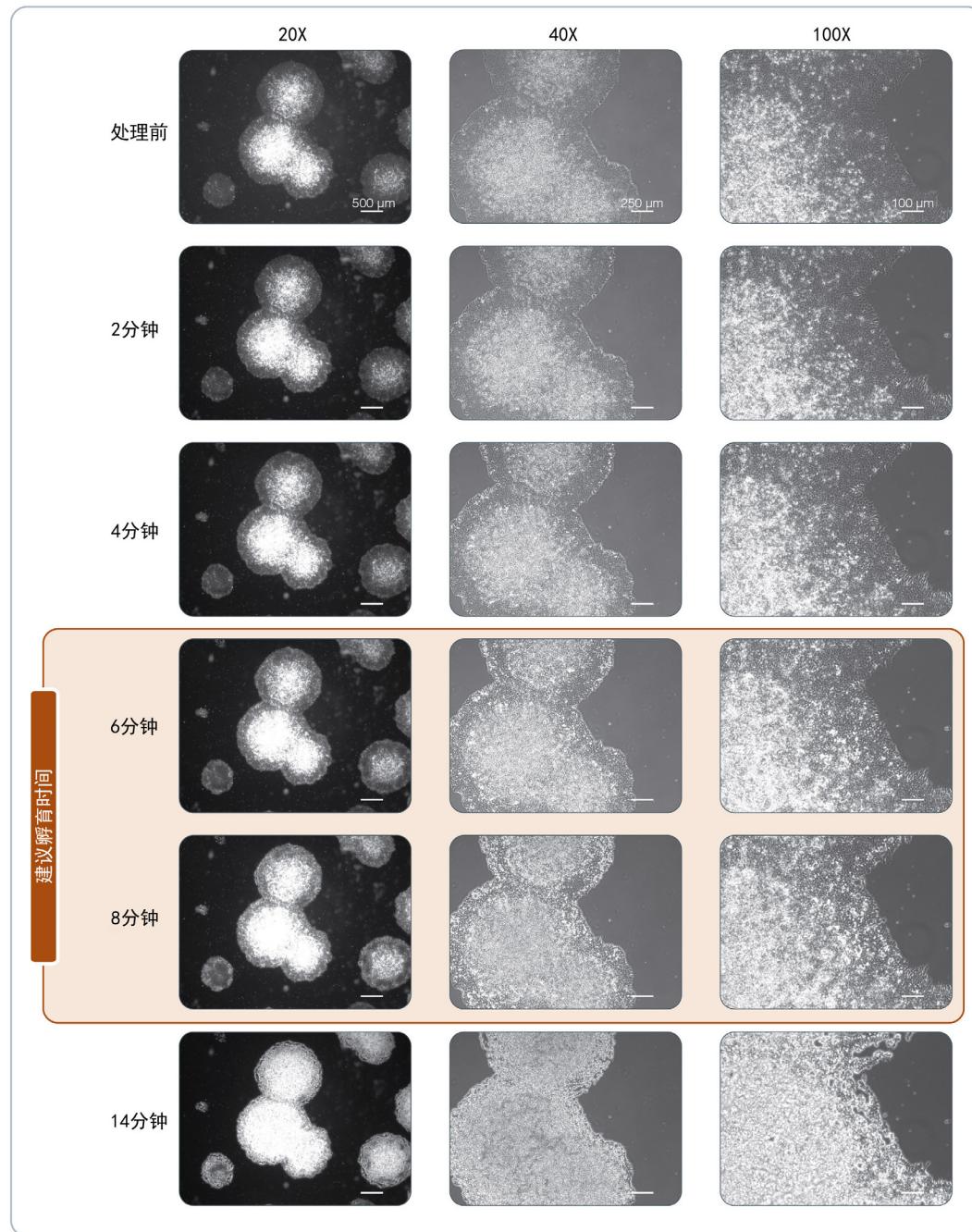
注意: 将细胞聚集体迅速转移到新的培养皿中, 以最大限度地提高其存活率及贴壁率。

11. 将孔板放入37°C培养箱。将孔板前后左右的快速摇晃几次, 确保聚集体分布均匀。24小时内不可扰动培养板。

注意: 细胞聚集体的不均匀分布也许会导致人ES和PS的分化增加。.

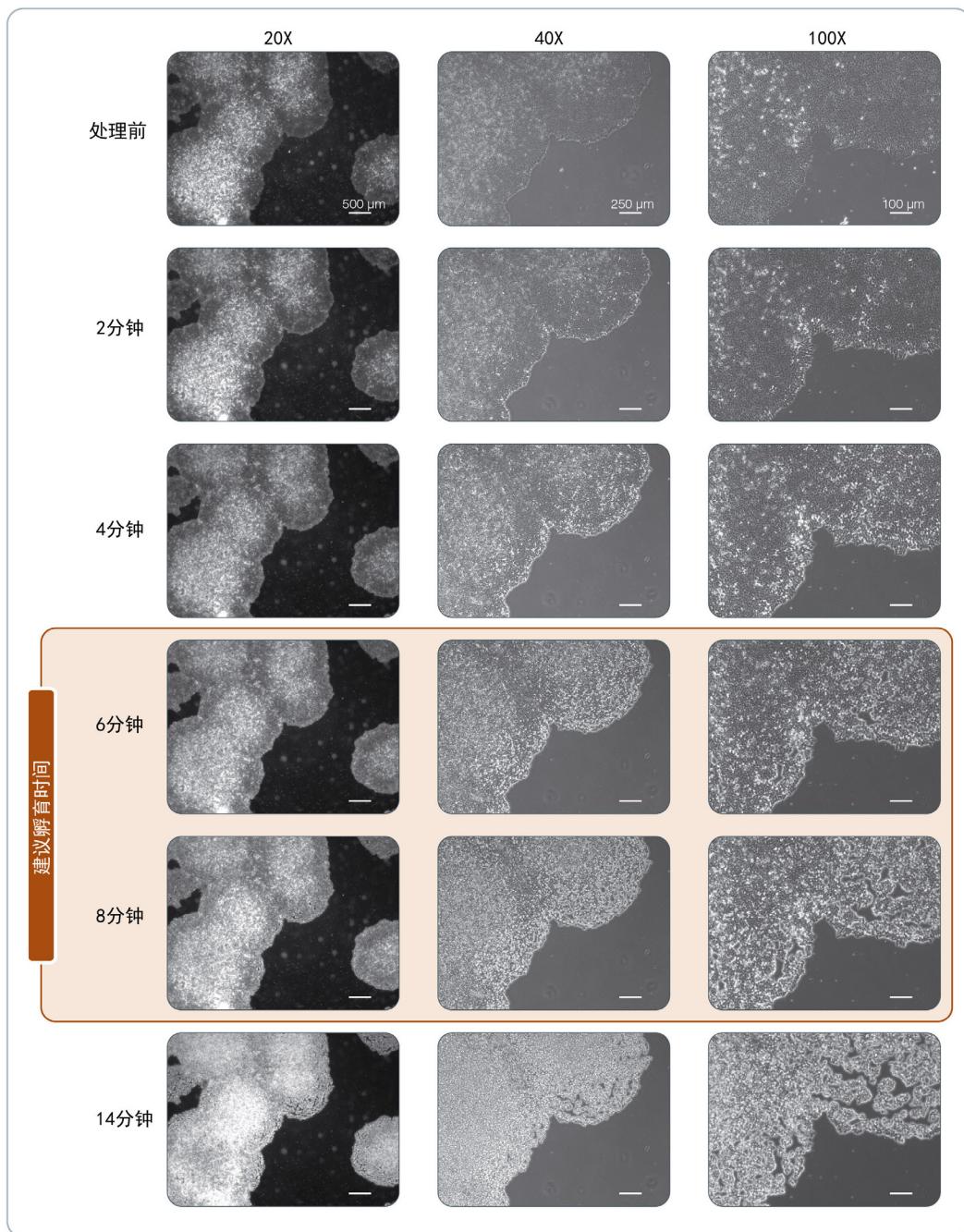
12. 每天换液, 目测评估监控生长状态, 直到下一次传代。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明, 不可用于人或动物的诊断或治疗。



**图10. GCDR对在Vitronectin XF™基质和mTeSR™1中培养的人ES细胞的影响。**人胚胎干细胞（H9）与GCDR孵育期间在不同时间点的图像。图片用了三种放大倍率：20X, 40X和100X。推荐的孵育时间为6 - 8分钟，此时克隆边缘的细胞之间出现间隙。时间过短，集落没有充分解离，时间过长，集落过度离解，并且在刮擦时可能会分解为单细胞。请注意，使用不同的细胞系或其他非酶传代试剂时，孵育时间可能会有所不同，因此应在显微镜下监测解离过程，直至确定最佳时间。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。



**图11. GCDR对在Corning® Matrigel®基质和mTeSR™1中培养的人iPS细胞的影响。**人iPS细胞 (STiPS-M001) 与GCDR孵育期间在不同时间点的图像。图片用了三种放大倍率: 20X, 40X和100X。推荐的孵育时间为6 - 8分钟, 此时集落边缘的细胞之间出现间隙。时间过短, 集落没有充分解离, 时间过长, 集落过度解离, 并且在刮擦时可能会分解为单细胞。请注意, 使用不同的细胞系或其他非酶传代试剂时, 孵育时间可能会有所不同, 因此应在显微镜下监测解离, 直至确定最佳时间。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明, 不可用于人或动物的诊断或治疗。

## 5.2 含酶的传代方案

此传代流程使用酶法解离集落，使其从培养器皿上脱落。

**注意：**推荐使用无酶法（第5.1节），方便使用，细胞回收率高，维持细胞表面蛋白质的完整性，有助于细胞重新黏附于基质。

### 5.2.1 分散酶

分散酶是一种含酶的试剂，用于人ES和iPS法细胞以聚集体的方式传代，需用手工刮擦的方法生成细胞聚集体。以下步骤适用于6孔板的单孔操作。如果使用其他培养器皿，请对应调整体积。

1. 传代之前，至少提前一个小时，用Corning® Matrigel®包被培养皿（4.2.2节）。
2. 分装足够的的mTeSR™1，分散酶（1 U/mL）和DMEM/F-12以进行细胞传代，并且将试剂恢复到室温（15 - 25°C）。

**注意：**不要在37°C水浴中加热mTeSR™1。

3. 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。
4. 用移液枪头刮除或抽取，去除分化区域。避免一次将培养皿在培养箱外面放置超过15分钟。

**注意：**如果分化<5%，则可能不需要去除分化区域。如果培养物状态良好，分化区域不会超过培养孔的20%。分化区域的示意图参见图1B, 图2B, 图3B, 图4B。

5. 从培养孔吸走培养基，使用2 mL的DMEM/F-12进行清洗。
6. 加入1 mL分散酶（1 U/mL）。
7. 在37°C孵育7分钟。其它信息参见图12。

**注意：**使用不同的细胞系或其他酶传代试剂时，孵育时间可能会有所不同，因此应在显微镜下监测解离，直至确定最佳时间。

8. 吸掉分散酶，然后用DMEM/F-12轻轻的洗涤培养皿，每孔洗2 - 3次（每次每孔使用2 mL）。
9. 加入2 mL DMEM/F-12或mTeSR™1。通过血清学玻璃移液管或细胞刮（例如Corning产品号#3010或Fisher产品号#08-100-240）刮除集落。

**注意：**尽量避免破坏集落的完整性。

10. 将分离的细胞聚集体转移至一个15 mL锥形试管中。

**可选：**用2 mL的DMEM/F-12或mTeSR™1冲洗孔，以收集剩余的聚集体。将冲洗液加入15 mL管中。

**注意：**如果在mTeSR™1中刮除细胞，则不需要进行步骤11和12。根据合适的分配比例，调整培养基的量，然后进入步骤13。

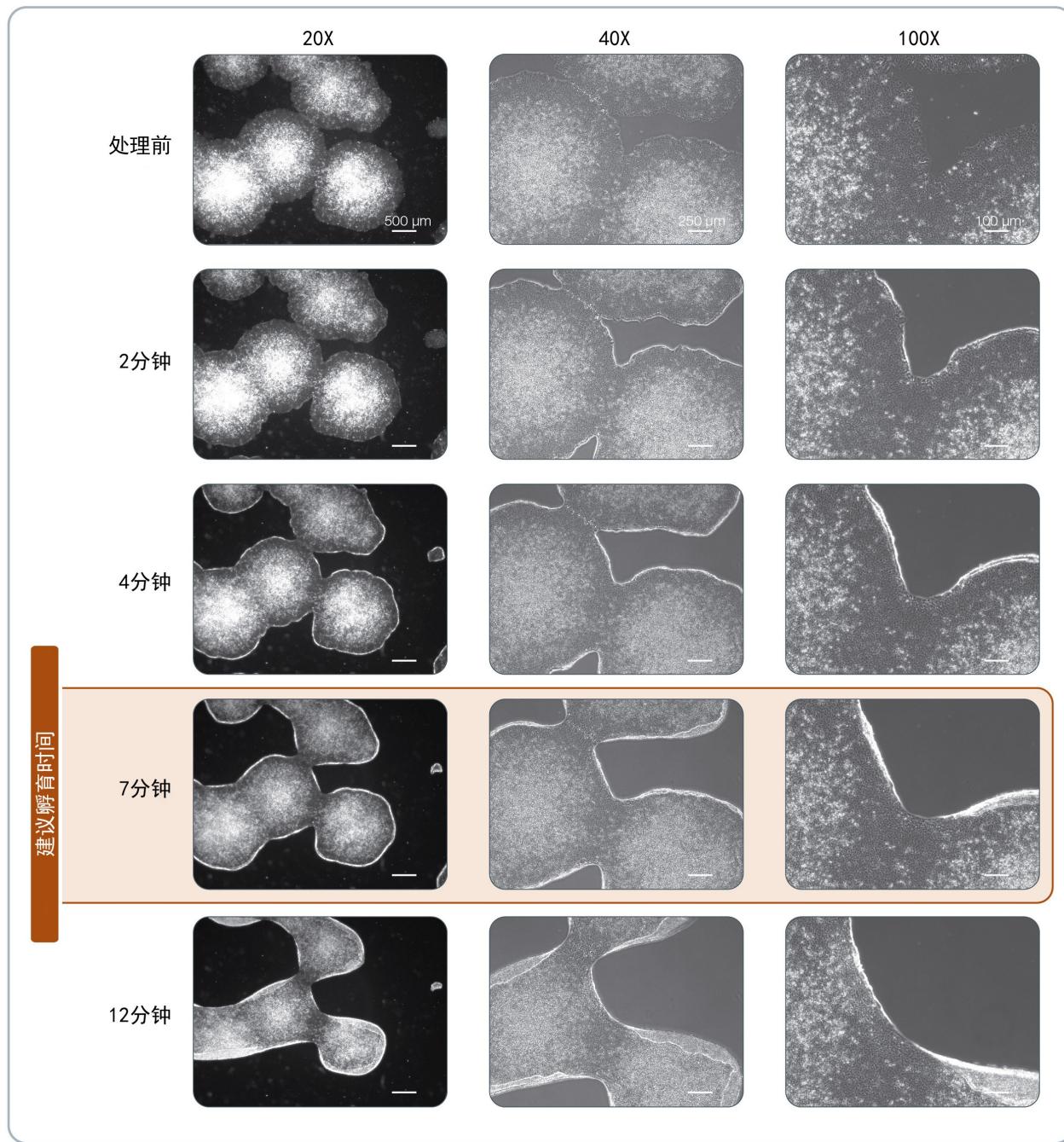
11. 将含有细胞聚集体的15 mL离心管在室温下以300 x g离心5分钟。
12. 吸出上清液。对于收集在15 mL管中的每个孔的细胞聚集体，加入1 - 2 mL mTeSR™1。
13. 使用2 mL血清移液管小心地将细胞聚集体混合物上下吹打2 - 3次，以打散细胞聚集体。均一的50 - 200 μm的聚集体悬浮液是最佳的；不要将其制备成单细胞悬液（有关更多信息，请参见第8.0节）。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

14. 将细胞聚集体混合物以所需的密度铺板到包被好的并含有mTeSR™1的培养孔。当集落密度为最佳状态时，可以对培养物以1:6至1:10的分配比例（即将1个培养孔内的细胞聚集体分别铺板到6 - 10个新的培养孔中），每4 - 7天进行一次传代。如果克隆太密集或太稀疏，可在下一次传代的时候调整传代分配比例（详见6.0节）。
15. 将培养板放在37°C的培养箱中。将培养板快速前后左右摇晃，以均匀分布细胞聚集体。24小时内不要移动培养板。

注意：细胞聚集体的不均匀分布可能导致人类ES和iPS细胞的分化增加。
16. 每天换液，目测评估监控生长状态，直到下一次传代。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。



**图12. 分散酶对在Corning® Matrigel®基质和mTeSR™1中培养的人ES细胞的影响。**人ES细胞（H9）与分散酶孵育期间在不同时间点的图像。图片用了三种放大倍率：20X, 40X和100X。推荐的孵育时间为7分钟，此时集落边缘变得松动，并从培养板上将稍微卷起，但集落应仍吸附在培养板上。时间过短，集落没有充分解离，时间过长，集落过度离解，并且在刮擦时可能会分解为单细胞。请注意，使用不同的细胞系或其他非酶传代试剂时，孵育时间可能会有所不同，因此应在显微镜下监测解离情况，直至确定最佳时间。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

## 6.0 定制传代方案

在mTeSR™1培养基中培养人ES和iPS细胞可灵活调整传代时间表，因为细胞可以在mTeSR™1中铺板后4 - 7天进行传代。下一次细胞传代的时间取决于铺板细胞聚集体的大小和密度。例如，如果较大的细胞聚集体以较高密度铺板，则下一个传代时间可能发生在第4或5天，而如果较小细胞聚集体以较低密度铺板，则下一次传代可能发生在第6天或7天（表5）。大细胞聚集体和小细胞聚集体的示意图参见图13。不管使用的传代密度和细胞聚集体大小如何，当准备传代时，大多数集落必须呈现致密堆积而集落的中心变得多层化。

**表5. 影响下一次传代时间的参数**

铺板时		传代时	
细胞聚集体大小*	铺板密度	集落密度**	培养时（天）
大	高	高	4 - 5
大	低	低	
中	中	中	
小	高	高	
小	低	低	5 - 6
			6 - 7

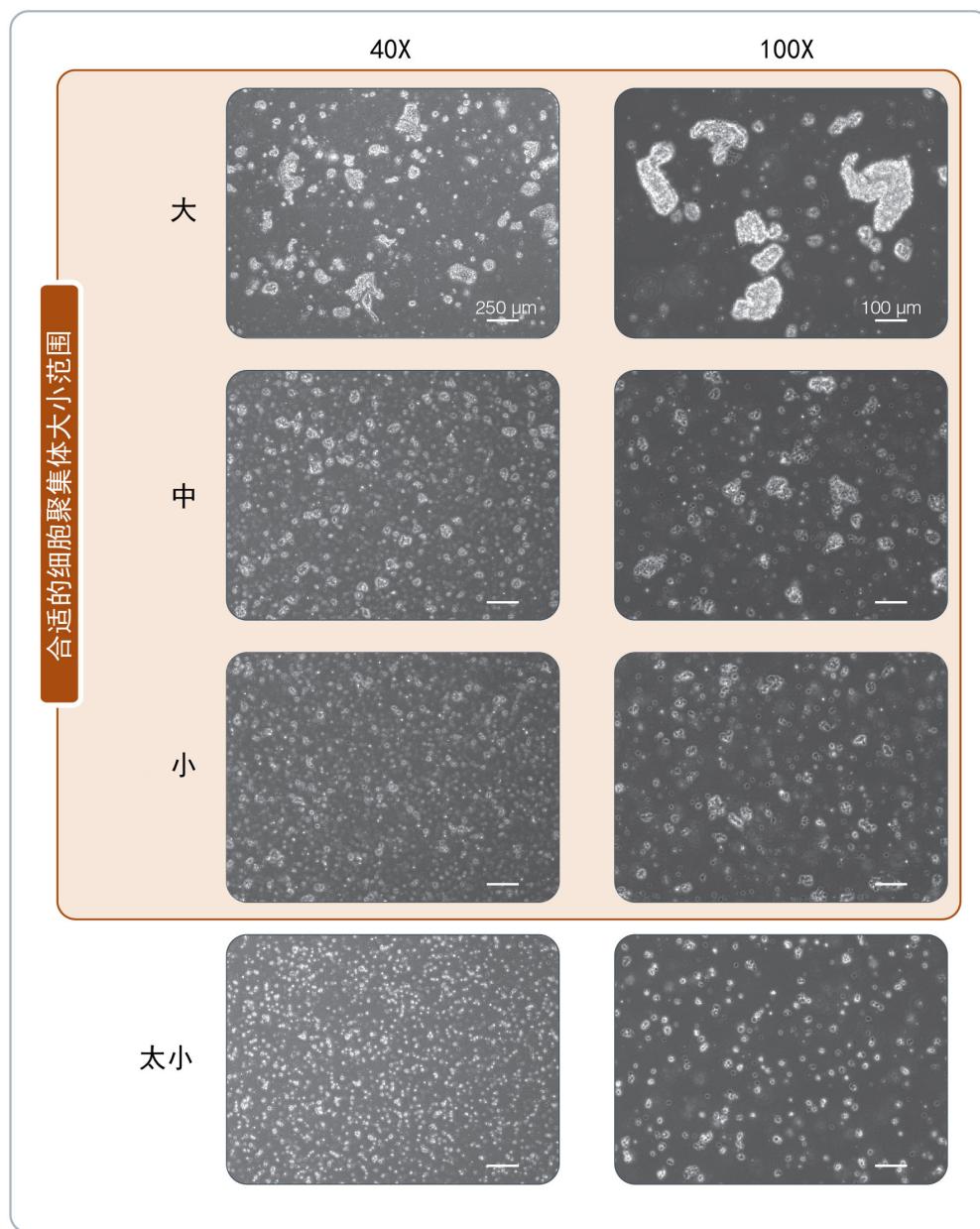
\* 示意图见图13

\*\* 示意图见图14

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

## 6.1 细胞聚集体大小

在铺板时，可以通过上下吹打的次数来调节悬浮液中细胞聚集体的大小（表4）。有关推荐的细胞聚集体大小范围，请参见图13。注意不要生成单细胞。

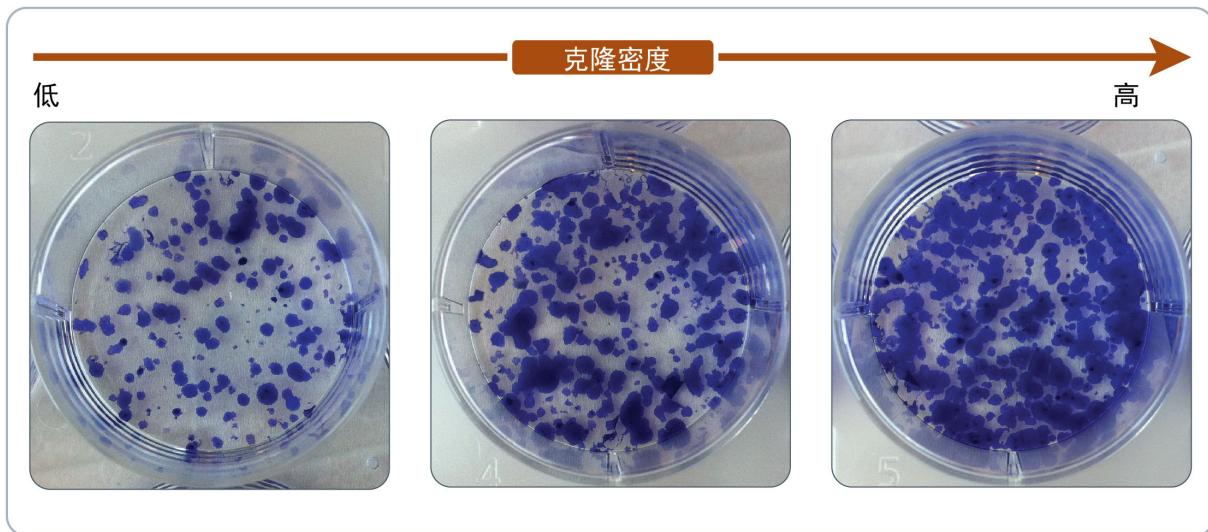


**图13. 铺板时适宜的细胞聚集体的大小。**细胞聚集体大小可以通过上下吹打的次数来获得。避免生成单细胞。使用两个放大倍率拍摄的图像：40X和100X。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

## 6.2 传代时克隆的密度

在传代时铺板的细胞聚集体的数量与在下一次传代时观察到的克隆密度相关。通过改变铺板时的比例可以根据需要增加或降低克隆密度。例如，铺板时较低的分配比例（**split ratio**；即铺板更多的细胞聚集体）将导致下次传代时的较高的克隆密度。典型的分配比例为1:10到1:50；这可根据使用的细胞系和操作者的不同而变化。参考图14为传代时应该观察到的推荐的克隆密度范围。注意，当以更高的密度培养时，一些细胞系可能会出现更多自发性分化。如果观察到增加的自发性分化，则可以通过在下一次传代时铺板较少的细胞聚集体来降低克隆密度。计数细胞聚集体是确定和调整铺板密度的另一种方法（见附录1）。



**图14. 在mTeSR™1培养时适宜的克隆密度。**在mTeSR™1培养基中培养人ES细胞（H1），并在传代的最佳时间用Giemsa染色（注意，对于不同的克隆密度，传代的最佳时间可能不同，参见表5）。每个图像代表一个6孔板的单个孔。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

## 7.0 附加的流程

### 7.1 转换细胞的培养体系

#### 7.1.1 从无饲养层培养基过渡到mTeSR™ 1

从TeSR™-E8™（产品号 #05990），TeSR™2（产品号 #05860）或其他无饲养层培养基将人ES和iPS细胞过渡到mTeSR™1时，不需要适应步骤。

- 将TeSR™-E8™转换至mTeSR™1 - 遵循无酶传代方案（5.1节）
- 将TeSR™2转换至mTeSR™1 - 遵循无酶（5.1节）或有酶（5.2节）传代方案

传代后，将细胞聚集体铺板到含有mTeSR™1的预包被培养皿上。建议初始培养时，使用之前的无饲养层培养基和培养体系做一个平行对照，以确保所选择的mTeSR™1中的铺板密度是适当的。注意，细胞在过渡期后的前1-2代可能会出现自发型分化的增加。手动移除分化区域（5.1.2或5.2.1节）或使用专门的解离试剂如ReLeSR™（5.1.1节）将有助于确保细胞快速适应新环境，而不影响细胞的长期培养。

#### 7.1.2 从mTeSR™1过渡到TeSR™-E8™或TeSR™2

将人ES和iPS细胞从mTeSR™1过渡到TeSR™-E8™或TeSR™2培养基时，不需要适应步骤。按照无酶传代方案（5.1节）或有酶传代方案（5.2节），并将细胞聚集体重新铺板到含TeSR™-E8™或TeSR™2培养基的预包被培养皿中。

#### 7.1.3 从Corning® Matrigel®过渡到Vitronectin XF™

在Corning® Matrigel®上培养的人ES和iPS细胞可以很方便的过渡到Vitronectin XF™基质上，而不需要适应步骤。当细胞适合传代的时候，按照5.1节的流程，如同将细胞重新铺板到Corning® Matrigel®基质上一样（例如，使用表三中推荐的Corning® Matrigel®孵育时间），将细胞聚集体铺板到

Vitronectin XF™包被的培养器皿上（4.2.1节）。Vitronectin XF™上培养的细胞，可以使用非酶传代技术（5.1节）进行后续的传代。转移到Vitronectin XF™后，不要使用有酶传代方法。

注意：培养基和基质可以同时更换（例如：用TeSR™-E8™在Corning® Matrigel®培养的细胞可以一步转换到使用mTeSR™1在Vitronectin XF™基质上培养，参见7.1.1节）。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

### 7.1.4 从饲养层的培养体系过渡到mTeSR™1

在饲养层细胞上培养的人ES和iPS细胞可以方便地转移到无饲养层条件下，用mTeSR™1进行培养。对于饲养层培养体系下得细胞，使用您已经建立好方法获取的细胞聚集体，并将细胞铺板到包被有适宜基质的mTeSR™1中，或者使用下面的技术方案。铺板效率可能会在转换过程中受到影响，因此，细胞聚集体的初始铺板密度要比常规用于传代的高2-3倍，用于缩短细胞对无饲养层培养的适应过程。

以下的操作步骤是针对6孔板中的单孔操作，如果使用其他的培养器皿，请相应的调整体积。

1. 在传代前至少1小时，用Vitronectin XF™（4.2.1节）或Corning® Matrigel®（4.2.2节）包被新培养板。
2. 分装适量的mTeSR™1，DMEM/F-12和胶原酶IV型（产品号#07909），恢复到室温（15-25°C）。
 

注意：不可在37°C水浴加热mTeSR™1完全培养基。
3. 使用显微镜以肉眼来识别分化区域。在板的底部标记这些分化区域。通过用移液管尖端刮擦或通过抽吸去除分化区域。
 

注意：如果细胞状态良好，分化区域不应超过培养孔的20%。
4. 从孔中取出吸液培养基，加入1 mL胶原酶IV型（1 mg/mL）。
5. 在37°C消化20分钟。
 

注意：使用不同的细胞系或其他酶传代试剂时，消化时间可能会有所不同，因此应在显微镜下监测解离，直至确定最佳时间。
6. 吸出胶原酶，并用1 mL的DMEM/F-12冲洗两次。
7. 加入1 mL的mTeSR™1培养基。用血清学玻璃移液管或细胞刮（例如Corning产品号#3010或Fisherbrand产品号#08-100-240）轻轻将集落刮取下来。
8. 把分离的细胞聚集体转移到一个新的15 mL尖底离心管。
 

可选：用另外的1-2 mL的mTeSR™1冲洗培养孔以收集剩余的细胞聚集体。将冲洗液加入15 mL管中。
9. 使用2 mL血清移液管小心地将细胞聚集体混合物上下吹打2-3次，以打散细胞聚集体。均匀的50-200 μm的聚集体悬浮液是最佳的；不要将其制备成单细胞悬液（有关更多信息，请参阅第8.0节）。
10. 将细胞聚集体混合物以适宜的密度铺板在含有mTeSR™1的预包被的培养孔上。
 

注意：饲养层细胞会在转换后的前1-2代持续使用，但是第2代后停止使用饲养层细胞。建议在刚转化时，使用前的饲养层培养基和培养体系做一个平行对照，以确保所选择的mTeSR™1中的铺板密度是适当的。
11. 将培养板放入37°C的培养箱中。将培养板快速，前后左右摇晃以均匀分布细胞聚集体。24小时内不要移动培养板。
 

注意：聚集体的不均匀分布可能导致人ES和iPS细胞的分化增加。
12. 用mTeSR™1每天换液，目测培养物评估生长状态，直到下一次传代。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

## 7.2 为下游应用制备单细胞悬液

以下是从6孔板中在mTeSR™1培养基中生长的培养物制备单细胞悬液的说明。如果使用其他培养器皿，请相应调整整体积。通常培养物在适合传代的时候，亦可进行收获和冷冻。

1. 将培养基（DMEM/F-12或mTeSR™1），GCDR解离试剂，无Ca++和Mg++的D-PBS，在使用之前恢复到室温（15 - 25°C）。

注意：不要在37°C水浴中加热mTeSR™1。

2. 用1 mL的无Ca++和Mg++的D-PBS清洗准备传代的培养孔。

3. 吸走清洗液，加入1 mL的GCDR解离试剂。37°C孵育8 - 10分钟。

注意：消化时间根据不同的细胞系或者其他传代试剂的不同而有所变化。

4. 使用血清移液管或1 mL微量吸管器上下吹打来收获细胞，以确保形成单细胞悬浮液并将细胞转移到15 mL锥形试管中。用另外的2 - 4 mL培养基（DMEM/F-12或mTeSR™1）冲洗培养孔，并将冲洗液加入到含有细胞的管中。

5. 以300 x g离心5分钟。

6. 用适当的培养基重悬细胞，进行预期的下游实验。

注意：人ES或iPS细胞以单细胞进行铺板时，建议添加10 μM Y-27632 (ROCK抑制剂，产品号#72302)，目前已知Y-27632可以增加细胞存活率。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

## 7.3 细胞的冻存和解冻

在mTeSR™1维持培养的人多能干细胞可以用mFreSR™和Cryostor® CS10进行聚集体冻存，也可以用FreSR™-S进行单细胞冻存。这两种冻存方法都可适用于本手册中所描述的使用聚集体传代技术进行的常规传代。

解冻复苏方案适用于在冷冻保存之前在mTeSR™1中维持培养的人ES和iPS细胞。对于其他方案培养的细胞（例如使用饲养层细胞或其他条件培养基，或无饲养层培养基如TeSR™-E8™或TeSR™2），应当使用冷冻保存之前相同的培养基和条件下进行解冻。复苏后，细胞可以转换到mTeSR™1（7.1.1和7.1.4节）培养基。

### 7.3.1 mFreSR™和Cryostor® CS10（细胞聚集体）

mFreSR™（产品号 #05854）是一种成分确定、无血清的冻存液，专门为在mTeSR™1中培养的人ES和iPS干细胞设计。为即用型且含冻存保护剂。

CryoStor® CS10（产品号 #07930）是一种无动物成分的冻存液，为即用型且含冻存保护剂。

#### 冻存

**注意：开盖之前，用70%的乙醇或异丙醇擦拭瓶身。**

以下说明适用于在mTeSR™1中培养的6孔板培养物的冻存，使用mFreSR™或Cryostor® CS10皆可。培养物应该在适合传代的时候进行收集和冻存。每管所含有的细胞应当来源于6孔板的1个培养孔。如果使用其他的培养器皿，请相应的调整体积。

**注意：如果使用mFreSR™，融化所需量的mFreSR™然后放置于冰上。**

1. 用无酶方法进行传代至第8步（5.1节），或者用有酶传代方法至第10步（5.2节）。
2. 在室温（15 - 25°C）以300 x g离心5分钟。
3. 轻轻吸走上清液，注意不要扰动细胞团。
4. 用血清学吸管以1 mL的mFreSR™或Cryostor® CS10重悬细胞。在打散细胞团时，尽量减少细胞聚集体分解。
5. 用2 mL的血清学吸管将1 mL的细胞聚集体转移到标记好的冻存管中。
6. 用以下方法冻存细胞聚集体：
  - 推荐使用缓速降温方法，每分钟降低1度，随后可以在-135°C液氮或更低的温度长期保存。不推荐在-80°C长期保存。
  - 逐步降温法：-20°C保存2个小时，然后-80°C中保存2个小时，随后可以在-135°C液氮中或更低的温度长期保存。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

## 解冻

人ES和iPS细胞在解冻后，应该立即铺板在预先包被好的培养皿中（4.2节）。上述冻存的一管细胞可以成功的铺板到6孔板的1 - 2孔。

1. 开始之前，提前准备好以下材料：试管，恢复到室温的mTeSR™1（15 - 25°C），及预先包被的培养板，确保整个解冻复苏程序可以在最短的时间内完成。

**注意：**不要在37°C水浴中加热mTeSR™1培养基。

2. 在37°C水浴中快速解冻，持续温和的在水中晃动冻存管，直到剩余少量细胞还处于冻存状态。

3. 从水浴中取出冻存管，用70%的酒精或异丙醇擦拭除菌。

4. 用2 mL的血清移液管把细胞悬液转移到一个15 mL的锥形试管。

**注意：**用2 mL的血清移液管代替1 mL的枪头可以减少细胞聚集体的分解。

5. 逐滴加入5 - 7 mL的预热的mTeSR™1培养基到15 mL的离心管中，加入的同时轻轻混匀。

6. 室温（15 - 25°C）以300 x g离心5分钟。

7. 吸出培养基，使细胞沉淀完好无损。使用2 mL血清移液管轻轻将细胞沉淀重悬于1 mL的mTeSR™1中。小心保持细胞作为聚集体。

8. 将0.5 mL的细胞混合物转移到含有mTeSR™1的预包被的6孔板的培养孔中（例如，每个冷冻管可以铺板两个孔）。

**注意：**铺板多少孔可能需要根据冻存的细胞聚集体数量进行调整。通常在复苏后，要比在常规的传代铺板更多的细胞聚集体数量。

9. 将培养板放入37°C培养箱。快速前后左右的摇晃培养板数次，将细胞聚集体分布均匀。24小时内不要移动培养板。

**注意：**不均一的聚集体分布可能会导致人ES和iPS细胞分化增加。

10. 用mTeSR™1每天换液，目测培养物以评估生长状态直到下一次传代。解冻复苏后的6 - 7天，查看是否有适合传代的（中心致密的）未分化的集落。

**注意：**解冻复苏后如果只能观察到少数的未分化的集落，只选取这些未分化的集落进行传代，并将它们铺板至相同大小的新包被的培养孔（不进行稀释传代）。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

### 7.3.2 FreSR™-S (单细胞)

FreSR™-S (产品号 #05859) 是一种成分确定, 无血清且无动物源成分的冻存液。即用型并含有冻存保护剂。

#### 冻存

注意: 打开之前用70%的乙醇或异丙醇擦拭瓶身。

以下说明适用于在mTeSR™1中培养的6孔板培养物的冻存, 如果使用其他的培养器皿, 请相应的调整体积。细胞应该在传代时进行收集和冻存。

1. 使用前将培养基 (DMEM/F-12或mTeSR™1), GCDR 解离试剂和无Ca++和Mg++的D-PBS恢复到室温。  
注意: 不要在37°C水浴中加热mTeSR™1培养基。
2. 用1 mL的无Ca++和Mg++的D-PBS润洗需要传代的培养孔。
3. 吸去润洗液, 加入1 mL的GCDR。37°C孵育8 - 10分钟。  
注意: 消化时间根据不同的细胞系和使用的传代试剂不同而有所变化。
4. 用1 mL的移液器枪头或者血清学吸管收集细胞, 反复吹打数次确保获得单细胞悬液, 并将细胞转移到15 mL的锥形试管中。用另外的2 - 4mL的培养基 (DMEM/F-12或mTeSR™1) 润洗培养孔, 把润洗后的培养基加入到细胞收集管中。
5. 用台盼兰染色进行活细胞计数。
6. 在室温 (15 - 25°C) 下, 以300 x g离心5分钟。
7. 小心的用吸管去掉上清液, 留下少量的培养基, 确保细胞聚集体完好。轻弹管壁重悬细胞团。
8. 加入冷的 (2 - 8°C) FreSR™-S, 调整密度到 $1 \times 10^6$ 细胞/mL, 并彻底混匀。
9. 每个冻存管加入1 mL的单细胞悬液。
10. 冻存细胞:
  - 推荐使用缓速降温方法, 每分钟降低1度, 随后可以在 -135°C液氮或更低的温度长期保存。不推荐在 -80°C长期保存。
  - 逐步降温法: -20°C保存2个小时, 然后 -80°C中保存2个小时, 随后可以在 -135°C液氮中或更低的温度长期保存。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明, 不可用于人或动物的诊断或治疗。

## 解冻

人ES和iPS细胞在解冻后，应该立即铺板在预先包被好的培养皿中（4.2节）。上述冻存的一管细胞可以成功的铺板到6孔板的1 - 2孔。

1. 开始之前，提前准备好以下材料：试管、恢复到室温的mTeSR™1（15 - 25°C），DMEM/F-12，及预先包被的培养板，确保整个解冻复苏程序可以在最短的时间内完成。

**注意：**不要在37°C水浴中加热mTeSR™1培养基。

2. 在mTeSR™1中加入终浓度为10 μM的Y-27632。
3. 在37°C水浴中快速解冻，持续温和的在水中晃动冻存管直到剩余少量细胞还处于冻存状态。
4. 从水浴中取出冻存管，用70%的乙醇或异丙醇擦拭冻存管。
5. 用1 mL的移液器枪头将冻存管中的细胞悬液缓慢的的转移到含有5 - 7 mL的DMEM/F-12的15 mL的离心管中。
6. 室温（15 - 25°C）下以300 x g离心5分钟。
7. 用吸管小心的去除上清液，留下少量培养基确保细胞团未被扰动。
8. 加入1 mL含有10 μM Y-27632的mTeSR™1，轻轻混匀。
9. 将细胞铺板到预先包被好的培养皿中。

**注意：**通常，一个含有 $1 \times 10^6$ 细胞的冻存管可以解冻复苏并铺板到6孔板的1 - 2个培养孔中。

10. 将培养板放入37°C培养箱。快速前后左右的摇晃培养板数次，将细胞分布均匀在整个表面。
11. 使用mTeSR™1（不含有ROCK抑制剂Y-27632）每天换液，并目测评估培养的生长状态直到下一次传代（例如，80 - 90%的细胞贴壁生长汇合率）。解冻复苏后，大概需要2 - 5天。

**注意：**时间可能会因为使用不同的细胞系而有所变化，因此培养物需要在显微镜下监控直到确定最佳的传代时间。

12. 推荐使用标准的方法进行细胞聚集体传代（例如ReLeSR™ [5.1.1节]）。

**注意：**通常不推荐连续的单细胞传代，因为会增加核型异常的风险<sup>5-6</sup>。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

## 8.0 疑难解答

问题	解决方案
培养物中的分化区域太多 (>20%)	<ul style="list-style-type: none"> <li>确保新制备的 mTeSR™1 完全培养基在 2 - 8°C 保存，并且不超过两周。</li> <li>确保分化的区域在传代之前被除去，无论是使用手动（参见5.1.2或5.2.1节）或者 ReLeSR™（5.1.1节）。</li> <li>避免培养板一次性地在培养箱外超过15分钟。</li> <li>传代后，确保产生的细胞聚集体大小均一。</li> <li>传代时铺板较少的细胞，降低克隆密度。</li> <li>传代的时候减少 ReLeSR™的孵育时间，因为你的细胞系或培养物可能比较敏感。</li> </ul>
用ReLeSR（5.1.1节）获得的细胞聚集体的大小不够理想（例如聚集体不类似图9所示）	<ul style="list-style-type: none"> <li>获得的聚集体比较大（例如平均尺寸大于 200 μm） <ul style="list-style-type: none"> <li>用吸管吹打聚集体混合物。避免产生单细胞悬液。</li> <li>增加1 - 2分钟的消化时间。</li> </ul> </li> <li>获得的细胞聚集体比较小（例如平均小于 50 μm） <ul style="list-style-type: none"> <li>解离后尽量减少破坏细胞聚集体。</li> <li>减少1 - 2分钟的孵育时间。</li> </ul> </li> </ul>
传代过程中获得的细胞聚集体过大	<ul style="list-style-type: none"> <li>增加GCDR的孵育时间。</li> <li>增加吸管吹打的次数。</li> <li>在加入非酶传代试剂之前，用无Ca++和Mg++的D-PBS清洗一次。</li> </ul>
用ReLeSR™的时候分化的细胞也和集落一起脱落	<ul style="list-style-type: none"> <li>减少1 - 2分钟的孵育时间。</li> <li>孵育温度降至室温（15 - 25°C）。</li> </ul>
消化后集落依旧贴壁，或者需要大力刮擦才能分离细胞	<ul style="list-style-type: none"> <li>确保已经使用5.0节描述的传代试剂。</li> <li>增加1 - 2分钟的孵育时间。</li> </ul>
铺板后不贴壁	<ul style="list-style-type: none"> <li>增加起始铺板的细胞聚集体数量（例如2 - 3倍的数量），维持更加密集的汇合率。</li> <li>用传代试剂（ReLeSR™, GCDR 或分散酶）处理后尽快操作以减少细胞聚集体在悬浮中的时间。</li> <li>传代时减少传代试剂的孵育时间，因为你的细胞系/培养物可能比较敏感。如果细胞在传代之前集落内还没有形成多层细胞，这点尤其需要注意。</li> <li>不要过多地吹打细胞聚集体来达到期望的尺寸，可以增加传代试剂的孵育时间1 - 2分钟。如果集落非常紧密而且细胞聚集体很难被打碎的时，这点尤其需要注意。</li> <li>当用Vitronectin XF™包被培养板时，确保使用非组织培养处理的培养板。</li> </ul>
解离集落时产生了单细胞	<ul style="list-style-type: none"> <li>细胞经传代试剂处理后，尽快操作以减少细胞聚集体悬浮的时间。</li> <li>传代时减少传代试剂的孵育时间，因为你的细胞系/培养物可能比较敏感。如果细胞在传代之前集落内还没有形成多层细胞，这点尤其需要注意。</li> <li>解离后尽量减少对细胞聚集体的操作。</li> </ul>

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

问题	解决方案
细胞不贴壁	<ul style="list-style-type: none"> <li>当使用Vitronectin XF™时，尽量避免使用有酶传代试剂（例如分散酶）。</li> <li>当使用Vitronectin XF™基质时，确保使用非组织培养处理的培养板。</li> </ul>
细胞在第一换液时脱落	<ul style="list-style-type: none"> <li>添加培养基的时候尽量操作温和。</li> <li>铺板后，在第3天换液，让细胞聚集体全部贴壁。</li> </ul>
细胞扩增效率低	<ul style="list-style-type: none"> <li>传代前延长细胞培养的时间。大部分细胞的扩增发生于最佳传代时间点之前。</li> </ul>
细胞聚集体的贴壁不均匀	<ul style="list-style-type: none"> <li>包被步骤中，确保培养孔完全被培养基质完全覆盖。</li> <li>将培养板放入培养箱时，确保细胞聚集体在培养孔中分布均匀，且铺板后24小时内不要扰动培养板。</li> </ul>

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

## 9.0 参考文献

1. Thomson JA et al. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391): 1145–7.
2. Levenstein ME et al. (2006) Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells* 24(3): 568–74.
3. Ludwig TE et al. (2006) Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol* 24(2): 185–7.
4. Ludwig TE et al. (2006) Feeder-independent culture of human embryonic stem cells. *Nat Methods* 3(8): 637–46.
5. Draper JS et al. (2004) Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 22(1): 53–4.
6. Buzzard JJ et al. (2004) Karyotype of human ES cells during extended culture. *Nat Biotechnol* 22(4): 381–2.
7. Braam SR et al. (2008) Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via alphavbeta5 integrin. *Stem Cells* 26(9): 2257–65.
8. Mitalipova MM et al. (2005) Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23(1): 19–20.

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

## 附录1：用人ES和iPS细胞聚集体进行铺板时，聚集体的计数方法

细胞聚集体计数是另外一种计算和调整铺板密度的方法，可以控制细胞传代时铺板数量合适的细胞聚集体。这种方法比较适用于刚接触人ES和iPS细胞培养的新手。

在下面的方案中，计数直径  $\geq 50 \mu\text{m}$  的细胞聚集体，因为它们最容易附着并生长成健康的克隆。使用目镜测微计可以帮助识别这种尺寸的细胞聚集体。在以细胞聚集体铺板传代时，应当按照下面方案进行。有关详细的传代方法，请参阅第5.0节。

1. 在96孔平底板的2个孔的中心画“+”作为计数方格。
2. 在每个孔加入40  $\mu\text{L}$ 的DMEM/F-12。
3. 在每个孔中加入5  $\mu\text{L}$ 细胞聚集体的混合物。
4. 计数每个孔中直径大约  $\geq 50 \mu\text{m}$  的细胞聚集体。将两个孔的计数结果取平均值，作为5  $\mu\text{L}$ 样品中细胞聚集体的平均细胞聚集体数量。
5. 用总的混合物体积 ( $V_T$ ) 计算细胞聚集体的浓度 ( $C$ ) 和在混合物中总的细胞聚集体的数量 ( $N_T$ )：

$$C = \frac{N_A}{5 \mu\text{L}}$$

$$N_T = C \times V_T$$

6. 决定铺板的细胞聚集体的目标数量 ( $N_P$ ，参见表6)。确保实验中所有条件（即  $N_P \times$  条件数）的铺板聚集体的总目标数量不超过  $N_T$ 。

**表6. 推荐的细胞聚集体铺板数量**

培养器皿	细胞聚集体的目标铺板数量 ( $N_P$ , 铺板密度)		
	低	中	高
6孔板的单孔	350	700	1000
100 mm培养皿	2100	4200	6000
T-75 $\text{cm}^2$ 培养瓶	2800	5600	8000

7. 计算实验中每个条件需要铺板的细胞聚集体数量 ( $V_P$ )：

$$V_P = \frac{N_P}{C}$$

8. 铺板前，轻柔的混匀聚集体混合物，以确保形成均一的悬液。
9. 将计算好的细胞聚集体混合物 ( $V_P$ ) 加入到预先包被好的，且含mTeSR™1培养基的培养孔。
10. 继续进行相应的传代步骤（5.0节）。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

## 附录2：流式细胞术技术方案

### 试剂和材料

#### 抗体

可以使用抗体通过流式来鉴定人ES和iPS细胞。下表列出STEMCELL所提供用来鉴定人ES和iPS细胞的部分抗体的信息。如需完整的抗体列表，包括其他结合物，规格和克隆，请访问[www.stemcell.com/antibodies](http://www.stemcell.com/antibodies)。

#### 标记表面抗原

一抗*	种属	亚型	产品号 #
Anti-Mouse SSEA-1 Antibody, Clone MC-480	Human, Mouse, Rat	IgM, kappa (Mouse)	60060
Anti-Mouse SSEA-3 Antibody, Clone MC-631	Human, Mouse, Rat, Rhesus	IgM, kappa (Rat)	60061
Anti-Human SSEA-4 Antibody, Clone MC-813-70	Human, Mouse, Rat, Rhesus, Cat, Chicken, Dog, Rabbit	IgG3, kappa (Mouse)	60062
Anti-Human SSEA-5 Antibody, Clone 8e11	Human	IgG1, kappa (Mouse)	60063
Anti-Human TRA-1-60 Antibody, Clone TRA-1-60R	Human, Rhesus, Rabbit	IgM, kappa (Mouse)	60064
Anti-Human TRA-1-81 Antibody, Clone TRA-1-81	Human, Rat, Rhesus	IgM, kappa (Mouse)	60065
Anti-Human TRA-2-49 Antibody, Clone TRA-2-49/6E	Human, Chimpanzee, Gibbon, Gorilla, Orangutan, Owl Monkey, Squirrel Monkey, Cat, Pig, Rabbit, Tiger	IgG1, kappa (Mouse)	60066
Anti-Human TRA-2-54 Antibody, Clone TRA-2-54/2J	Human, Chimpanzee, Gibbon, Gorilla, Orangutan, Owl Monkey, Squirrel Monkey, Cat, Pig, Rabbit, Tiger	IgG1, kappa (Mouse)	60067

\* 最适宜的工作浓度应由终端用户决定。

#### 标记细胞内抗原

一抗*	种属	亚型	产品号 #
Anti-Human OCT4 (OCT3) Antibody, Clone 3A2A20	Human	IgG2b, kappa (Mouse)	60093

\* 最适宜的工作浓度应由终端用户决定。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

## 通用试剂和材料

试剂和材料	产品号 #
无Ca <sup>++</sup> 和Mg <sup>++</sup> 的D-PBS	37350
DMEM/F-12	36254
台盼蓝	07050
温和细胞解离试剂 (GCDR)	07174
含有2%FBS的D-PBS	07905
1.5mL管	e.g. Eppendorf 022364111
5 mL FACS管	38007
锥形管 (15mL)	38009
核染料 (可选: 例如1 mg/mL propidium iodide diluted 1 in 1000 in 2% FBS/PBS)	75002

## 标记细胞内抗原所需的额外试剂

### 皂昔破膜缓冲液 (SPB) \*

组分	产品号 #	终浓度
皂昔	例如 Fluka Biochemika, 产品号 #47036	1 mg/mL
10% BSA溶液	04915	1%
无Ca <sup>++</sup> 和Mg <sup>++</sup> 的D-PBS	37350	终体积

\* 混合均匀后可以在2-8°C保存一个月。

### 2%多聚甲醛溶液\*

组分	终浓度	终浓度
多聚甲醛	例如Affymetrix 19943 1 LT	2%
无Ca <sup>++</sup> 和Mg <sup>++</sup> 的D-PBS	37350	终体积

\* 混合均匀后于2-8°C保存。

## 准备单细胞悬液进行流式检测

按照7.2节的说明制备单细胞悬液。用台盼兰染色进行活细胞计数。制备的单细胞悬液可以用来进行表面抗原或胞内抗原的标记。

## 标记表面抗原的技术方案

注意: 每个抗体都需要通过滴定确定最佳浓度。

1. 决定流式检测所需要的样品数量, 包括必要的对照组。
2. 在5 mL流式管或者1.5 mL管中加入大约 $1 \times 10^5$ 的细胞, 放置在冰上。
3. 以 $300 \times g$ 离心5分钟。
4. 样本离心时, 准备足够的一抗或者直接标记的抗体, 并按照适宜的工作浓度配置 (即工作液, 每个样本加 $100 \mu L$ )。
5. 小心去掉上清液, 注意不要扰动细胞团, 用抗体混合液重新悬浮细胞。轻轻混合, 在冰上孵育15 - 60分钟。如果用直标的抗体, 注意避光。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明, 不可用于人或动物的诊断或治疗。

6. 每管中加入 1 mL 的 2% FBS/PBS，轻轻混匀并以  $300 \times g$  离心 5 分钟。
  - 如果使用没经标记的一抗：当样本离心的时候，准备充足的二抗工作液（每个样本加 100  $\mu L$ ）。继续第 7 步。
  - 如果使用直标抗体：继续第 9 步。
7. 小心吸走上清液，注意不要扰动细胞团，在二抗工作液中重悬细胞。轻轻混匀，在冰上孵育 15 - 60 分钟。注意避光。
8. 每管中加入 1 mL 的 2% FBS/PBS，轻轻混匀并以  $300 \times g$  离心 5 分钟。
9. 小心移除上清液，注意不要扰动细胞团，在 200 - 300  $\mu L$  的 2% FBS/PBS 中重悬细胞。如果必要，转移到 5 mL 的流式管中。
 

可选：可加入 1  $\mu g/mL$  的 *Propidium iodide (PI)* 评估细胞活率。
10. 将样本放在冰上，注意避光，尽快用流式细胞仪分析。

## 标记细胞内抗原 OCT4 的技术方案

注意：每个抗体都需要通过滴定确定最佳浓度。

1. 决定流式检测所需要的样品数量，包括必要的对照组。
2. 在 5 mL 流式管或者 1.5 mL 管中加入大约  $4 - 8 \times 10^5$  的细胞。
3. 以  $300 \times g$  离心 5 分钟。
4. 小心吸走上清液，注意不要扰动细胞团，每管加入 250  $\mu L$  的 2% 多聚甲醛溶液重悬细胞。轻轻混匀，在冰上孵育 15 - 30 分钟。
5. 每管加入 1 mL 的 2% FBS/PBS。轻轻混匀，以  $300 \times g$  离心 5 分钟。
6. 小心移除上清液，注意不要扰动细胞团，轻轻混匀，每管加入 500  $\mu L$  的 皂昔破膜缓冲液 (SPB) 重悬细胞，室温 (15 - 25°C) 孵育 15 分钟。
 

注意：在流式分析之前，细胞需要保持在 SPB 中，直到最后一步重悬。
7. 样本孵育的时候，准备充足的一抗工作液，用 SPB 作为稀释液。
8. 以  $300 \times g$  离心 5 分钟。
9. 小心移除上清液，注意不要扰动细胞团，用一抗工作液重悬细胞（每个样本加 100  $\mu L$ ）。轻轻混匀，在冰上孵育 15 - 60 分钟。如果使用直标抗体，注意避光。
10. 每管加入 1 mL 的 SPB，轻轻混匀然后以  $300 \times g$  离心 5 分钟。
  - 如果使用不带标记的一抗，当样本离心的时候，准备充足的二抗工作液（每个样本加 100  $\mu L$ ）。继续第 14 步。
  - 如果使用直标抗体：继续第 13 步。
11. 小心吸走上清液，注意不要扰动细胞团，用二抗工作液重悬细胞。轻轻混匀，在冰上孵育 15 - 60 分钟。注意避光保存。

本产品是在 CGMP 质量管理体系 21 CFR 820 下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

12. 每管加入1 mL的SPB，轻轻混匀，以300  $\times$  g 离心5分钟。
13. 小心吸出上清液，注意不要扰动细胞团，用300  $\mu$ L的2% FBS/PBS重悬细胞。如果需要可将细胞转移到5 mL 的流式管中。
14. 将样本放在冰上，注意避光，尽快用流式细胞仪分析。  
可选：为了确保只有单个细胞被检测，可以设立FSC area vs FSC height的散点图，去除将偏离对角线的点，如图15。

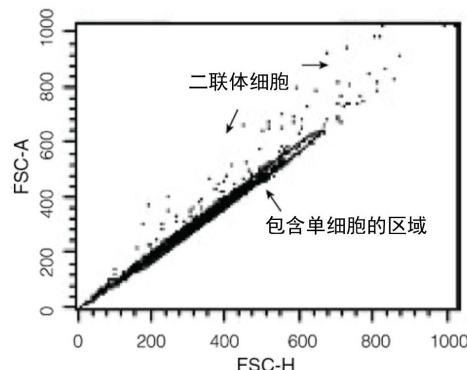


图15. 流式鉴别二联体细胞的例子

版权所有© STEMCELL Technologies Inc. 2017。保留一切权利,包括图形和图像。STEMCELL Technologies及其设计及徽标,以及Scientists Helping Scientists, CellAdhere, FreSR, and ReLeSR均是STEMCELL Technologies Canada Inc.的注册商标。Corning 和 Matrigel 是 Corning Inc. 的注册商标。E8, mTeSR 和 TeSR 是 WARC的注册商标。Vitronectin XF 由 Primrogen Biosciences, Inc. 研发和生产, Vitronectin XF 是 Primrogen Biosciences, Inc.的注册商标。CryoStor是BioLife Solutions的注册商标。Parafilm是Bemis Company, Inc.的注册商标。其他注册商标为各自持有人的产权。尽管STEMCELL尽一切努力保证STEMCELL及其供应商提供的信息正确，我们免除此类信息准确性或完整性的声明及保证。

本产品是在CGMP质量管理体系21 CFR 820下生产的。产品仅供研究使用。  
除非另行说明，不可用于人或动物的诊断或治疗。

技术手册

# 在mTeSR™1中 维持培养人多能 干细胞



STEMCELL Technologies China Co. Ltd.

电话: 400 885 9050

E-MAIL: INFO.CN@STEMCELL.COM

网站: WWW.STEMCELL.COM

微信ID: STEMCELLTech

