

## SperiPluri™ CD Feeder-Free PSC Expansion Medium

### SperiPluri™ CD 无饲养层人 PSC 扩增培养基

#### 一、产品描述

**SperiPluri™ CD Feeder-Free PSC Expansion Medium** (以下简称 SperiPluri™ CD) 是一种**化学成分明确、不含动物源蛋白、无需饲养层培养**的人多能干细胞 (hESC/hiPSC) 完全培养基, 专为人多能干细胞的生长和扩增而设计, 可以维持多种 iPSC、ESC 细胞系的生长活性与多能性。

#### 二、产品组分与储存

该产品以完整套装形式出售 (1 Kit)。

目录号	产品名称	规格	储存条件
<b>SperiPluri™ CD Feeder-Free PSC Expansion Medium (SP04503)</b> (长按 Ctrl 同时点击产品名称, 可直接跳转官网产品页)			
SP04503-A	SperiPluri™ CD Feeder-Free PSC Expansion Medium Basal Medium	490 mL	2~8°C
SP04503-B	SperiPluri™ CD Feeder-Free PSC Expansion Medium Supplement (50×)	10 mL	-20°C

**\*将基础培养基和添加剂混匀配置成完全培养基, 可在 2~8°C 中存储, 建议 2 周内用完。**

### 三、试剂及材料

试剂	耗材
SperiPluri™ CD Feeder-Free PSC Expansion Medium	六孔板
SperiGel™ Matrigel (SperiGel™ 基质胶)	1 mL/5 mL/10 mL/25 mL 移液管
LN521	15 mL/50 mL 离心管
DPBS, 无钙, 无镁 & DPBS, 含钙, 含镁	1.5 mL/2 mL 冻存管
Recombinant Trypsin-EDTA Solution	
ROCK 抑制剂	
DMEM/F12 培养基	
SperiCryo™ CD hPSC Cryopreservation Medium (cGMP Grade)	

### 四、试剂准备

#### (一) SperiPluri™ CD Feeder-Free PSC Expansion Medium 完全培养基配制 (500 mL)

1. 建议在 4°C 下解冻 SperiPluri™ CD Feeder-Free PSC Expansion Medium Supplement , 切勿在 37°C 下解冻。
2. 在生物安全柜中, 将解冻的 10mL 的 SperiPluri™ CD Feeder-Free PSC Expansion Medium Supplement 使用移液管全部转移至 490 mL 的 SperiPluri™ CD Feeder-Free PSC Expansion Medium Basal Medium 中。
3. 配制好的完全培养基可在 2~8°C 下稳定储存 2 周。在使用前, 室温下预热当天所需的完全培养基。不建议在 37°C 下预热培养基。

NOTE: 可根据实际使用配制完全培养基, 即将 SperiPluri™ CD Feeder-Free PSC Expansion Medium Supplement 分装后冷冻保存, 则将 Supplement 分装 1.0 mL×10 支, 避免反复冻融。配制 50 mL 完全培养基, 即解冻 1.0 mL Supplement, 然后与 49 mL Basal Medium 混合。



## （二）SperiGel™ Matrigel 包被细胞培养皿/瓶（以包被六孔板为例，如若使用其它细胞培养容器，操作过程同样适用）

### 1. SperiGel™ Matrigel的解冻：

将 SperiGel™ Matrigel 从-20℃转移至 4℃过夜解冻，（建议将 SperiGel™ Matrigel 放置于冰盒中，放置 4℃冰箱过夜解冻），待基质胶融化后，混匀，在无菌条件下按照所需剂量进行分装，将分装后的基质胶存放-20℃冰箱，避免反复冻融（融化后的基质胶在 10℃以上会逐渐凝固，整个实验过程需始终保持基质胶置于冰上）。

**NOTE：分装基质胶：推荐按照 1：50 的稀释比例进行分装，可将基质胶分装为 500 μL/支，即 500 μL 的基质胶可使用 25 mL 预冷的 DMEM/F12 进行稀释。**

### 2. SperiGel™ Matrigel的使用：

- 1) **稀释SperiGel™ Matrigel：**取25 mL预冷的DMEM/F12培养基到50 mL离心管中，从-20℃中取出一支分装好的500 μL/支的基质胶，吸取1 mL准备好的预冷的DMEM/F12在基质胶中缓慢反复吹打进行化冻，多次反复进行，直至将基质胶全部转移至DMEM/F12培养基，即稀释完成，将稀释后的基质胶溶液上下混匀。

**NOTE：稀释后的基质胶溶液4℃条件下，可使用2周。**

- 2) **SperiGel™ Matrigel的包被：**取1 mL稀释后的基质胶溶液到六孔板的一个孔中，根据实验需求，进行不同孔数的包被（即每个孔加入1 mL的基质胶溶液），轻轻晃动六孔板，使溶液均匀铺满底面，将包被好的六孔板放于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱内孵育30~60 min。

**NOTE：六孔板若不立即使用，需使用封口膜封好，放置2-8℃储存，一周内使用。**

- 3) 待使用时，将包被好的六孔板从培养箱中取出，放置于超净台中吸去包被液，去除后无需冲洗培养皿，即可使用。

### 注意事项：

- 可能需要针对每个细胞系确定基质胶溶液最佳稀释度。预实验1:10至1:50的各种稀释度以选择最佳浓度。
- 基质胶的充分融化至少需要4℃过夜，某些情况下，产品浓度很高，则需要更久的时间来融胶；



- 整个操作过程中，所有接触基质胶的培养器皿，耗材和培养液均应预冷，因为基质胶在超过10°C的情况下就会开始成胶；
- 基质胶的使用浓度不要低于3 mg/mL，成胶最佳浓度为6-8 mg/mL；
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

### (三) LN521 包被细胞培养皿/瓶（以包被六孔板为例，如若使用其它细胞培养容器，则操作过程同样适用）

- 1) LN521 的解冻：将贮存于-80°C的 LN521 提前取出放置于 2~8°C下缓慢解冻，解冻后混匀。

**NOTE：解冻后的 LN521 在 2~8°C条件下，可存储 3 个月，也可根据实际需求进行分装，将分装后的 LN521 存储于 2~8°C或-20°C条件下，最长可存储 3 个月。**

- 2) LN521 的分装：建议使用 0.5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  对培养板进行包被，六孔板每孔面积约为 10  $\text{cm}^2$ ，则六孔板一个孔需 5  $\mu\text{g}$  的 LN521，每个孔加入 1 mL 的稀释液，LN521 的原始浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，即在 1 mL 的 DPBS（含钙含镁）中加入 50  $\mu\text{L}$  的 LN521 溶液；建议将 LN521 分装成 300  $\mu\text{L}/\text{支}$ ，每次使用时可取出一支包被一块六孔板。
- 3) LN521 的包被：取一支分装的 LN521，加入 6 mL 的 DPBS（含钙含镁）稀释混匀，轻柔操作，不要剧烈震荡，将稀释后的 LN521 加入到六孔板中，每孔加入 1 mL 稀释液，轻轻晃动六孔板，使稀释液均匀的铺满底面。将包被好的六孔板放置 2~8°C过夜包被，使用前，将六孔板放置 37°C、5%  $\text{CO}_2$  培养箱内孵育 60~120 min。

**NOTE：1. 若未提前包被 LN521 且急需使用，可将稀释后的 LN521 加入六孔板中，每孔加入 1 mL 稀释液，轻轻晃动六孔板，使稀释液均匀的铺满底面，然后将六孔板放置 37°C、5%  $\text{CO}_2$  培养箱内至少孵育 120 min。**

**2. 六孔板若不立即使用，需使用封口膜封好，放置2~8 °C储存，一周内使用。**

- 4) 待使用时，将包被好的六孔板从培养箱中取出，放置于超净台中吸去包被液，去除后无需冲洗培养皿，即可使用。



## 五、操作流程

### （一）在 SperiPluri™ CD 培养基中培养人 PSCs 的指南

1. 当出现以下任一情况时进行传代：
  - PSC 克隆变得过于密集或过大。
  - 克隆覆盖了约 80%的培养瓶表面积（通常每 4 至 5 d 一次）。
2. 传代比例可以变化，早期传代通常在 1:2 到 1:4 之间，已建立的培养物通常在 1:3 到 1:12 之间。细胞可能会以不同的速度生长，传代比例将需要调整。
3. 建议尽可能使用 P10~P30 代次的细胞进行科研工作。
4. 在传代过程中切勿使用刮刀等机械方式强行剥离细胞。

### （二）细胞复苏（以六孔板为例，操作过程同样可适用于其它培养容器）

1. SperiPluri™ CD 完全培养基室温下预热。
2. 按照 SperiGel™ Matrigel 包被或者 LN521 包被六孔板的步骤进行包被，将六孔板提前放置 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内孵育。
3. 在 15 mL 离心管中加入 5 mL 以上完全培养基，然后在完全培养基中加入 ROCK 抑制剂，一般选取 10 μM 的 ROCK 抑制剂，混匀后备用。
4. 从液氮中取出细胞，立即放入 37 °C 水浴锅中，快速晃动，使冻存液迅速融化。

**NOTE：融化过程快速晃动冻存管，保证冻存液融化迅速、均匀。**

5. 用 75 % 医用酒精擦拭冻存管外表面，在生物安全柜中打开冻存管，将细胞冻存悬液缓慢滴加至 15 mL 离心管中，此离心管预先含有 4 mL 的 ROCK 抑制剂的 SperiPluri™ CD 完全培养基的，放入离心机中离心，300g，5 min。
6. 离心后去除上清，加入大于 1 mL 含有 ROCK 抑制剂的 SperiPluri™ CD 完全培养基，轻柔吹打细胞沉淀，



混匀细胞，进行细胞计数（复苏时建议六孔板每孔接种细胞量  $2 \times 10^5$ ）。

7. 将包被完成的六孔板从培养箱中取出，放置生物安全柜，吸去板中的包被液，每孔加入 2 mL 含有 ROCK 抑制剂的 SperiPluri™ CD 完全培养基，按照一定细胞数将细胞悬液接种到六孔板中，水平十字混匀细胞。
8. 然后将六孔板放入 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中，再次水平十字摇匀细胞，进行培养。

**NOTE：接种 2 h 内不可移动、观察细胞。这会严重影响细胞贴壁，会造成细胞状态不佳、细胞聚团、贴壁不均匀等情况。**

9. 复苏 18~24 h 后，观察细胞状态，更换新鲜的 SperiPluri™ CD 完全培养基。
10. 每天更换新鲜的 SperiPluri™ CD 完全培养基，直到细胞生长至 80%左右汇度，即需传代或冻存。

### **（三）细胞传代（以六孔板为例，消化酶为 SPERIKON Recombinant Trypsin-EDTA Solution，操作过程同样可适用于其它培养容器）**

使用 SPERIKON Recombinant Trypsin-EDTA Solution 或者市面常用的干细胞消化酶（例如 Accutase）对 PSC 细胞进行消化传代：

1. 在生物安全柜中进行六孔板的包被，将包被的六孔板放置 37 °C 培养箱中进行孵育。
2. 在室温下预热 SperiPluri™ CD 完全培养基 以及 DMEM/F12 培养基。
3. 在 15 mL 离心管中加入传代所需的 SperiPluri™ CD 完全培养基，然后在 SperiPluri™ CD 完全培养基 中加入 ROCK 抑制剂，一般选取 10 μM 的 ROCK 抑制剂，混匀后备用。
4. 从培养箱中取出细胞，弃细胞上清，每孔加入 2 mL 不含钙、镁离子的 DPBS 清洗细胞。
5. 吸去不含钙、镁离子的 DPBS 清洗液，向六孔板中加入 1 mL 的 SPERIKON Recombinant Trypsin-EDTA Solution。
6. 在 37 °C 培养箱中消化 4~5 min，在显微镜下观察细胞变圆且细胞集落出现空洞时，即终止消化。
7. 向六孔板中每孔加入 2 mL 的 DMEM/F12 培养基，终止消化酶，轻柔吹打细胞，将细胞悬液收集到 15 mL



离心管中，离心 300 g，5 min。

8. 离心后去除上清，加入大于 1 mL 含有 ROCK 抑制剂的 SperiPluri™ CD 完全培养基，轻柔吹打细胞沉淀，混匀细胞，进行细胞计数（传代建议六孔板每孔接种细胞量  $1.5 \times 10^5$ ）
9. 将包被完成的六孔板从培养箱中取出，放置生物安全柜，吸去板中的包被液，每孔加入 2 mL 含有 ROCK 抑制剂的 SperiPluri™ CD 完全培养基，按照一定细胞数将细胞悬液接种到六孔板中，水平十字混匀细胞。
10. 将细胞轻轻放入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中，再次水平十字混匀细胞。
11. 18-24 小时后更换新鲜的 SperiPluri™ CD 完全培养基，之后每天换液，4 d 左右细胞密度达到 80-85% 进行细胞传代或者冻存。

#### (四) 细胞冻存

1. 细胞密度达到 80-85% 进行细胞冻存。
2. 从培养箱中取出细胞，弃去细胞上清，六孔板每孔加入 2 mL 不含钙、镁离子的 DPBS 清洗细胞。
3. 吸去不含钙、镁离子的 DPBS 清洗液，向六孔板中加入 1 mL 的 SPERIKON Recombinant Trypsin-EDTA Solution。
4. 在 37 °C 培养箱中消化 4~5 分钟，在显微镜下观察细胞变圆且细胞集落出现空洞时，即终止消化。
5. 向六孔板中每孔加入 2 mL 的 DMEM/F12 培养基，终止消化酶，轻柔吹打细胞，将细胞悬液收集到 15 mL 离心管中，离心 300 g，5 min。
6. 离心后去除上清，加入 3~5 mL 含有 ROCK 抑制剂的 SperiPluri™ CD 完全培养基，轻柔吹打细胞沉淀，混匀细胞，进行细胞计数。使用 SperiCryo™ CD hPSC Cryopreservation Medium 冻存液 冻存，一般建议  $2 \sim 3 \times 10^6$  / 支。
7. 细胞计数后，将细胞悬液再次离心 300 g，5 min。
8. 吸去上清，根据细胞计数结果，加入相应体积的 SperiCryo™ CD hPSC Cryopreservation Medium 冻存液，



轻柔混匀细胞，加入冻存管中（每支冻存管细胞悬液体积 1 mL）。

- 将细胞置于梯度程序降温盒中，并置-80 °C 冰箱中过夜，次日转入液氮罐中长期保存；或使用程控降温设备将细胞降至-80 °C 以下后直接转入液氮储存。

## 六、将其它培养体系中的 hPSC 更换为 SperiPluri™ CD 培养基

使用其它培养体系的 hPSC 在细胞密度达到 80%左右且细胞状态良好时，进行细胞消化，按照六孔板每孔接种  $2.5\sim 3 \times 10^5$  的高密度接种细胞到 ROCK 抑制剂的 SperiPluri™ CD 完全培养基中，培养 18~24 h 后，更换新鲜的 SperiPluri™ CD 完全培养基对细胞进行培养，使用 SperiPluri™ CD 培养细胞 3 代后，细胞则可适应 SperiPluri™ CD 培养基。

## 七、相关产品推荐

推荐试剂&材料	品牌	货号
<u>SperiPluri™ CD Feeder-Free PSC Expansion Medium</u>	SPERIKON	SP04503
<u>SperiGel™ Matrigel</u>	SPERIKON	SP00604
<u>DPBS, 无钙, 无镁</u>	SPERIKON	SP00121
<u>DPBS, 含钙, 含镁</u>	SPERIKON	SP00123
<u>Recombinant Trypsin-EDTA Solution</u>	SPERIKON	SP00213
<u>Y-27632 (ROCK 抑制剂)</u>	SPERIKON	SP00930
<u>DMEM/F12 培养基</u>	SPERIKON	SP03101
<u>SperiCryo™ CD hPSC Cryopreservation Medium (cGMP Grade)</u>	SPERIKON	SP00870

**NOTE:** (长按 Ctrl 同时点击产品名称，可直接跳转官网产品页，如需更多帮助，请联系 SPERIKON)



## 八、免责声明与客户服务

法律声明:

本产品生产设施符合 ISO 9001 与 ISO 13485 质量管理体系标准。**仅供科研使用 (Research Use Only)** ,  
**不可用于临床诊断或治疗**。本产品适用于多能干细胞 (PSC) 及其衍生细胞的药物研发、筛选与评估。如需更多  
信息或购买相关产品, 请联系 SPERIKON 。



