

SperiPluri™ CD Feeder-Free PSC Expansion Medium

SperiPluri™ CD 无异源人 PSC 扩增培养基

产品说明书

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、不含动物源成分、无需饲养层培养的人多能干细胞培养基，可以维持诱导性多能干细胞 (iPSC)、胚胎干细胞 (ESC) 等细胞系的生长，并且保持其多能性。

二、产品信息

该产品以完整套装形式出售 (1 Kit)，包含以下组合：

目录号	目录号	产品名称	规格	储存条件
SP04503	SP04503-A	SperiPluri™ CD Feeder-Free PSC Expansion Medium Basal Medium	500 mL	2~8°C
SP04503	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
SPERIKON Matrigel (SPERIKON 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
Accutase	
Y-27632 (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

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，建议将 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）SPERIKON Matrigel 包被细胞培养容器（以包被六孔板为例，如若使用其他细胞培养容器，操作过程同样适用）

1. SPERIKON Matrigel 的分装：

将 SPERIKON Matrigel 从 -20°C 转移至 4°C 过夜解冻，（建议将 SPERIKON Matrigel 放置于冰盒中，将冰盒连同基质胶放置 4°C 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在 -20°C 冰箱，避免反复冻融（融化后的基质胶在 10°C 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. SPERIKON Matrigel 的稀释使用：

- 1) 稀释：取 25 mL 预冷的 DMEM/F12 培养基到 50 mL 离心管中，从 -20°C 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°C 条件下，可使用 2 周。

- 2) 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，使溶液均匀铺满底面，将包被好的六孔板放于 37°C、5% CO₂ 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 °C 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：

- 建议针对每个细胞系确定基质胶溶液最佳稀释度：可进行预实验1:10至1:50的稀释比例测试，选择最佳稀释比例。
- 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℃的情况下就会开始成胶；
- 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，如若使用其他细胞培养容器，则操作过程同样适用)

1. LN521 的解冻：

将贮存于-80℃的 LN521 提前取出放置于 2~8℃下缓慢解冻，解冻后混匀。

◆ NOTE：解冻后的 LN521 在 2~8℃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℃或-20℃条件下，最长可存储 3 个月。

2. LN521 的分装：

建议使用 0.5 μg/cm² 对培养板进行包被，六孔板每孔面积约为 10 cm²，则六孔板一个孔需 5 μg 的 LN521，每个孔加入 1 mL 的稀释液，LN521 的原始浓度为 100 μg/mL，即在 1 mL 的 DPBS (含钙含镁) 中加入 50 μL 的 LN521 溶液；建议将 LN521 分装成 300 μL/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，不要剧烈振荡，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，使稀释液均匀地铺满底面。将包被好的六孔板放置 2~8℃过夜包被，使用前，将六孔板放置 37℃、5% CO₂ 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，使稀释液均匀地铺满底面，然后将六孔板放置 37℃、5% CO₂ 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℃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 注意事项：

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%的培养容器表面积（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，已构建稳定细胞株通常在 1:3 到 1:12 之间，传代比例可根据细胞的增殖情况进行调整。
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他培养容器）

1. SperiPluri™ CD 完全培养基室温下预热。
2. 按照 SPERIKON 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% CO₂ 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。**

1. 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。
2. 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 2×10^5 个细胞）。
3. 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。
4. 然后将六孔板放入 37 °C、5%CO₂ 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。**

5. 复苏 18~24 h 后，观察细胞状态，更换新鲜的 SperiPluri™ CD 完全培养基。
6. 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 或者市面常用的干细胞消化酶（例如 Accutase），操作过程同样可适用于其他培养容器）

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 或者 Accutase 消化酶。
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 1.5×10^5 ）
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% CO₂ 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 或者 Accutase 消化酶。
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。



- 向六孔板中每孔加入 2mL 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。
- 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 $2\sim3 \times 10^6$ /支。
- 细胞计数后，将细胞悬液再次离心 300 g, 5 min。
- 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、将其他培养体系中的 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 $2.5\sim3 \times 10^5$ 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
SperiPluri™ CD Feeder-Free PSC Expansion Medium	SPERIKON	SP04503
SPERIKON Matrigel	SPERIKON	SP00604
DPBS, 无钙, 无镁	SPERIKON	SP00121
DPBS, 含钙, 含镁	SPERIKON	SP00123
Recombinant Trypsin-EDTA Solution	SPERIKON	SP00213
Y-27632 (ROCK 抑制剂)	SPERIKON	SP00930
DMEM/F12 培养基	SPERIKON	SP03101
SperiPluri™ 无蛋白 hPSC 细胞冻存液	SPERIKON	SP00854

八、免责声明与客户服务

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。如需更多帮助，请联系 SPERIKON。

