

## EZ-Stem™ 干细胞完全培养基使用说明书

### 产品信息

货号	YM-HA-001		
名称	EZ-Stem™ 干细胞完全培养基 (EZ-Stem Complete Medium)		
组分 1	Basal Medium For ESC and iPSC	规格	400 mL
组分 2	Supplement C	规格	20 mL
组分 3	Supplement D	规格	80 mL
货号	YMH-002		
名称	EZ-Stem™ 干细胞冻存液		
组分	EZ-Stem™ Cryopreservation Medium	规格	50 mL
货号	YMH-003		
名称	EZ-Stem™ 干细胞消化液		
组分	EZ-Stem™ Passaging Medium	规格	500 mL
货号	YMH-004		
名称	EZ-Stem™ 干细胞凋亡抑制剂		
组分	EZ-Stem™ Apoptosis inhibitor Medium	规格	1 mL
质量控制	通过细菌、真菌、支原体、内毒素检测。 通过渗透压、pH 检测。 通过产品性能检测。		



## ■ 保存条件

一、套装内所有成分均需避光保存。

套装内 Basal Medium For Human ESC and iPSC 需置于 4°C 冰箱保存，保质期为 1 年；

Supplement C 和 Supplement D 需置于 -20°C 保存，保质期为 1 年；

二、在 4°C 解冻 Supplement C/D，不要在 37°C 条件下解冻。（注：Supplement C/D 冻融总次数不能超过 2 次。）

三、配制后的 EZ-Stem™ 干细胞完全培养基，需放置 4°C 保存，保质期为 2 周；

四、所有产品请于保质期内使用，过期的成分可能严重影响培养效果。

## ■ EZ-Stem™ 干细胞完全培养基配置

将 Basal Medium For Human ESC and iPSC，Supplement C 和 Supplement D 混匀配置成 EZ-Stem™ 干细胞完全培养基，可在 2°C~8°C 中存储，2 周内用完。

## ■ 准备工作

一、分装 Matrigel（货号：354277）

提前一天把 Matrigel 放于冰盒中，再把冰盒放入 4°C 冰箱，Matrigel 需冻融成液态状，分装时用的枪头、EP 管等提前放置在 -20°C 预冷。分装操作时，手不要接触基质胶，避免体温使基质胶凝固；整个分装过程在冰上进行，每次实验取出分装管使用。储存于 -20°C，使用前提前在 4°C 冰箱解冻 15min。

二、铺板

1) 提前 4°C 解冻 Matrigel，预冷 DMEM/F12 基础培养基，准备离心管和 6 孔板。

2) 按 Matrigel: DMEM/F12 基础培养基=1:100 比例稀释。具体操作为（以配置 50ml/管为例）：吸取 50ml 预冷的 DMEM/F12 基础培养基至离心管，用枪头吸取 700ul 离心管里预冷的 DMEM/F12 基础培养基加入分装的 Matrigel 中，轻柔吹打混匀至无明显胶



状物，然后将该 Matrigel 加入到刚才的 50ml DMEM/F12 基础培养基中，颠倒 20 次混匀。

3) 将稀释后的 Matrigel 培养基加入需要包被的培养皿中，六孔板每孔加入 1 mL，其他孔板按同样比例的量加入。培养板置于 37°C 培养箱，2 小时后即可使用。

4) 包被好的培养皿若不立即使用，六孔板每孔补加 1ml DMEM/F12，封口膜封口后，放置于 37 度培养箱可保存一周。稀释后的 matrigel 若不立即使用，可放 4 度保存并尽快使用。存放时间越久包被效果越差。

## ■ 细胞复苏

1) 准备工作：将 EZ-Stem™ 干细胞完全培养基提前置于室温预热，将冻存细胞从液氮中取出，放置在干冰盒中，放置数分钟让残余液氮挥发。

2) 将细胞从干冰盒中取出，复苏时稍稍甩动，去除残留的干冰，再迅速用镊子夹住盖子放入 37°C 水浴中快速晃动（注意：水不能没过盖子），使其在 1 分钟左右完全融化。在超净台内，用酒精棉球擦拭冻存管外壁消毒，稍稍晾干。用单道移液器将所有融化的细胞悬液转移到 15 mL 离心管。

3) 在超净台内用单道移液器滴加相当于 10 倍冻存液体积的 EZ-Stem™ 干细胞完全培养基（通常为 5ml），盖上盖子，缓慢温柔的颠倒混匀 3 下，700 rpm 室温离心 5 min 收集细胞。

4) 超净台内小心倒去上清，吸取 1 mL 含有 EZ-Stem™ 干细胞凋亡抑制剂的新鲜 EZ-Stem™ 干细胞完全培养基重悬细胞至单细胞悬液（1 mL EZ-Stem™ 干细胞完全培养基加入 0.25  $\mu$ L 的 EZ-Stem™ 干细胞凋亡抑制剂），再转移至装有 1 mL 含有 EZ-Stem™ 干细胞凋亡抑制剂的新鲜 EZ-Stem™ 干细胞完全培养基的 6 孔板中，写上细胞名称、复苏日期、代次，放置 37°C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱内培养。

## ■ 细胞传代

1) 细胞长至 70%-80% 汇合度即可传代。在超净台内把 6 孔板里的培养基吸弃至废液缸，



用 1 mL 1×PBS 洗涤细胞 1~2 次，以去除残余的培养基。

2) 加入能够覆盖培养板底面体积的 EZ-Stem™干细胞消化液，轻轻晃动孔板并使 EZ-Stem™干细胞消化液完全浸过细胞，37°C培养箱孵育 5-10 min 后，待在显微镜下观察到大部分细胞有明显回缩的状态，弃去 EZ-Stem™干细胞消化液。用新鲜 EZ-Stem™干细胞完全培养基轻柔吹打成细胞悬液（不要吹打成单细胞），按一定比例传代细胞。

3) 首次按照 1: 6-1: 8 进行传代，若细胞在两天内长满可增加传代比例，若细胞生长三四天还未长满，可适当缩小传代比例。

## ■ 细胞冻存

1) 以 6 孔板为例，细胞汇合度至 70%~80%可冻存，不能长到 100%。在超净台内把六孔板里的培养基吸弃至废液缸，用 1×PBS 洗涤 1~2 次，加入 EZ-Stem™干细胞消化液置于 37°C培养箱消化 5-10 min，当大部分细胞变亮变圆后，且细胞尚未脱离基质胶或飘起时即消化完成。

2) 消化结束，轻轻取出培养板，吸弃 EZ-Stem™干细胞消化液。

3) 拿出 EZ-Stem™干细胞冻存液，每孔加入 1ml 冻存液，轻柔吹打，水平十字摇匀三次，随后吸取细胞悬液加入冻存管中。

4) 将冻存管转移到程序降温盒中，并放置-80°C冰箱过夜，第二天转移至液氮罐中长期保存。

备注：EZ-Stem™干细胞凋亡抑制剂的作用是广泛应用的非肌肉肌球蛋白 II 型 ATP 酶抑制剂，作用于 ROCK-myosin II 信号通路，可以阻止多功能干细胞因分离导致的凋亡，在不影响干细胞的自我更新或者多潜能特性的前提下改善分离的 hPSC 的存活率和克隆效率。

## ■ 注意事项

1) 确保 EZ-Stem™干细胞完全培养基储存于 4°C，并在 2 周内用完，每次只预温当次实验所需的培养基，减少 EZ-Stem™干细胞完全培养基的温度变化，避免培养基中



的因子效价下降。

- 2) 若短期内无法用完全部培养基，我们建议分批配制。请按照套装内各成分比例，配制所需量。但剩余的成分必须严格按照各自的保存条件妥善保存，并且不可多次冻融。
- 3) EZ-Stem™ 干细胞完全培养基套装内的所有成分都严格控制无菌，一般情况下我们不建议再次除菌。若配制过程有污染风险，可将 EZ-Stem™ 干细胞完全培养基过滤除菌。

