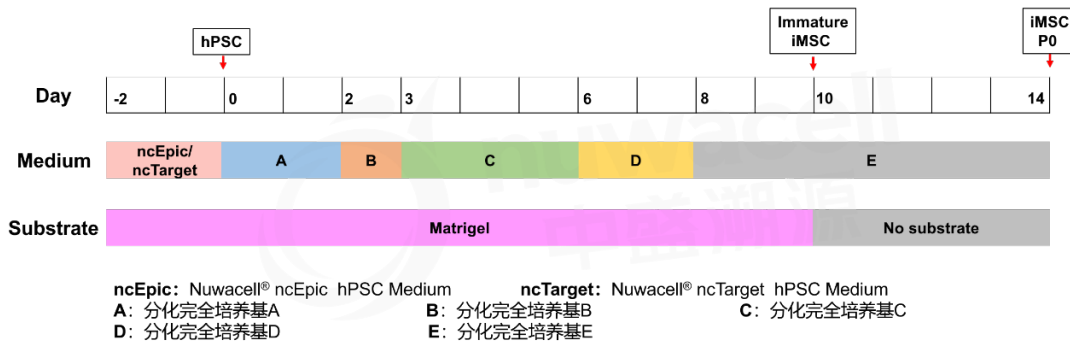


Nuwacell[®] hPSC-间充质干细胞分化试剂盒

使用说明书

一、产品简介

Nuwacell[®] hPSC-间充质干细胞分化试剂盒是中盛溯源生物科技有限公司原研的适用于从人类多能干细胞 (hPSC) 分化为 MSC 使用, 使用该产品能够从 hPSC 有效分化为高纯度的 MSC。MSC 可以稳定增殖, 细胞染色体核型正常、细胞表面因子表达正常 (CD73+/CD90+/CD105+, CD14-/CD34-/CD45-/CD79 α -/HLA-DR-), 三系分化潜能 (成骨分化、软骨分化、脂肪分化) 完备等特性。人类多能干细胞来源的 MSC 适用于各种体外实验、药物筛选和安全性评估、以及疾病动物模型细胞移植医疗等方面的研究和应用。



二、产品信息

表 1: Nuwacell[®] hPSC-间充质干细胞分化试剂盒说明

产品信息	货号	规格	储存条件
Nuwacell [®] hPSC-间充质干细胞分化试剂盒*包含:	RP01013	1 Kit	
Nuwacell [®] MSC differentiation Supplement A (10 \times)	RP01013-A	0.5 mL	-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C
Nuwacell [®] MSC differentiation Supplement B (10 \times)	RP01013-B	0.5 mL	-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C
Nuwacell [®] MSC differentiation Supplement C (10 \times)	RP01013-C	1 mL	-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C
Nuwacell [®] MSC differentiation Supplement D (10 \times)	RP01013-D	0.5 mL	-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C
Nuwacell [®] MSC differentiation Supplement E (30 \times)	RP01013-E	1 mL	-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C
Nuwacell [®] MSC differentiation Basal Medium F	RP01013-F	55 mL	2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C

*每个试剂盒可获得约 2×10^7 的 P0 代 MSC 细胞。

*将基础培养基和添加物混匀配置成分化完全培养基, 可在 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 中存储, 2 周内用完。

三、试剂材料

表 2: 推荐试剂&材料

试剂&材料	品牌 (e.g.)	货号 (e.g.)
Nuwacell [®] 科研级hiPSC细胞株	中盛溯源	RC01001
Nuwacell [®] ncEpic hPSC Medium	中盛溯源	RP01001
Nuwacell [®] ncTarget hPSC Medium	中盛溯源	RP01020
Nuwacell [®] hPSC Cryopreservation Medium	中盛溯源	RP01003
Nuwacell [®] hPSC Dissociation buffer	中盛溯源	RP01007
Nuwacell [®] Blebbistatin (10mM)	中盛溯源	RP01008
Nuwacell [®] ncMission hMSC Medium	中盛溯源	RP02010
Nuwacell [®] MSC Cryopreservation Medium	中盛溯源	RP02004
Nuwacell [®] Solase细胞消化液	中盛溯源	RP01021
Corning [®] Matrigel [®] Matrix	Corning	354277
DMEM/F12培养基	Thermo Sci.	11330
DPBS, no calcium, no magnesium	Thermo Sci.	14190144
6孔板	Thermo Sci.	140685
1 mL/5 mL/10 mL/25 mL移液管	Thermo Sci.	N/A
15 mL/50 mL离心管	Thermo Sci.	N/A
1.5/2 mL冻存管	Thermo Sci.	N/A
10 μ l/200 μ l/1000 μ l吸头	Rainin .	N/A
梯度程序降温盒	Thermo Sci.	5100-0001

四、试剂准备

➤ Nuwacell® hPSC-间充质干细胞分化完全培养基的配制

1. 在 4℃解冻 Nuwacell® MSC differentiation Supplement A、B、C、D、E，**不要在 37℃条件下解冻。**
2. 在生物安全柜中，参照表 3，使用无菌移液管及枪头混匀配制成分化完全培养基 A/B/C/D/E：
3. 分化完全培养基可于使用当天配置，置于 4℃储存，2 周内使用。

TIPS: 可根据实际用量将 Nuwacell® MSC differentiation Supplement A、B、C、D、E 分装后冷冻保存。冻融总次数不能超过 2 次。

表 3: Nuwacell® 人类多能干细胞来源间充质干细胞 (MSC) 分化完全培养基配制比例

种类	组分	终浓度
分化完全培养基-A	Nuwacell® MSC differentiation Basal Medium F	1×
	Nuwacell® MSC differentiation Supplement A (10×)	
分化完全培养基-B	Nuwacell® MSC differentiation Basal Medium F	1×
	Nuwacell® MSC differentiation Supplement B (10×)	
分化完全培养基-C	Nuwacell® MSC differentiation Basal Medium F	1×
	Nuwacell® MSC differentiation Supplement C (10×)	
分化完全培养基-D	Nuwacell® MSC differentiation Basal Medium F	1×
	Nuwacell® MSC differentiation Supplement D (10×)	
分化完全培养基-E	Nuwacell® MSC differentiation Basal Medium F	1×
	Nuwacell® MSC differentiation Supplement E (30×)	

五、Nuwacell®人类多能干细胞来源间充质干细胞 (MSC) 分化

5.1 hPSC 的培养和准备: 详见 Nuwacell® hPSC 培养基使用说明书

(<http://www.nuwacell.com/list.php?pid=4&ty=20> 操作说明书)

(<http://www.nuwacell.com/list.php?pid=4&ty=21> 操作视频教程)

以 6 孔板为例, hPSC 的接种密度为 4×10^5 /孔, 培养两天。

TIPS: 推荐用于定向分化的 hPSC 细胞复苏后至少传 5 代; 操作程序同样适用于其他培养容器: hPSC 的接种密度为 4×10^4 /cm², 培养基用量 200 μL/cm²。

5.2 DAY-1, 按照 5.1 描述方法将 hPSC 细胞接种到新的 6 孔板中, 培养。

5.3 DAY 0 (24~36 小时后), 将 Nuwacell® hPSC 完全培养基 (ncEpic 或 ncTarget) 吸除, 用 DMEM/F12 洗 2 次, 然后直接加入 分化完全培养基 A, 每孔 2 mL。

5.4 DAY 2 (换分化完全培养基 A 的 40 个小时后), 将 分化完全培养基 A 吸除, 用 DMEM/F12 洗 1 次, 随后加入 分化完全培养基 B, 每孔 2 mL。

5.5 DAY 3 (24 小时后), 将 分化完全培养基 B 吸除后直接加入 分化完全培养基 C, 每孔 2mL (不需要用 DMEM/F12 清洗)。

TIPS: 步骤 5.2~5.5 对换液时间要求严格, 推荐操作时间: 步骤 5.2. 早上 11: 00 传代; 步骤 5.3. 传代后 30 小时-第二天 17:00, 换分化完全培养基 A; 步骤 5.4. 第四天 09:00 换分化完全培养基 B。此时间安排可避免凌晨换液!

5.6 DAY 4, 使用 分化完全培养基 C 换液, 每孔 2 mL (不需要用 DMEM/F12 清洗)。

5.7 DAY 6, 将 分化完全培养基 C 吸除后直接加入 分化完全培养基 D, 2 mL 每孔 (不需要用 DMEM/F12 清洗)。

5.8 DAY 8, 将 分化完全培养基 D 吸除后直接加入 分化完全培养基 E, 2 mL 每孔 (不需要用 DMEM/F12 清洗)。

5.9 DAY 10, 弃去上清, 每孔加入 2 mL 1×DPBS 洗一遍后加入 2 mL Nuwacell® Solase 置于 37°C, 5% CO₂ 浓度, 饱和湿度的培养箱中孵育 3-5 分钟, 200×g 离心 5 分钟, 去除上清, 使用 分化完全培养基 E 重悬细胞, 随后按照 1:4 的比例传代, 使用 分化完全培养基 E 维持培养。

5.10 DAY 11, 使用 分化完全培养基 E 换液 2 mL/孔。

5.11 DAY13-14, 细胞长满, 此时细胞为 P0 代的 hPSC 定向分化 MSC。

TIPS: P0 代的 hiMSC 细胞可以冻存。

5.12 P1 代细胞开始可以按照 5000 cells/cm² 细胞的比例进行传代培养。

5.13 P2 代获得的 hiMSC 细胞可用于各项科学研究试验。

TIPS: 如需要冻存, 则继续下述消化步骤。

- 5.14 弃去上清，每孔加入 2 mL 1×DPBS 洗一遍后加入 2 mL Nuwacell[®] Solase 置于 37°C，5% CO₂ 浓度，饱和湿度的培养箱中孵育 3-5 分钟。当 hiMSC 脱离培养皿底部时，收集细胞于 15 mL 离心管中，200×g 离心 5 分钟。
- 5.15 弃除上清，加入 1 mL/孔 Nuwacell[®] hMSC 无血清培养基重悬 hiMSC，取适量细胞悬液用于计数。根据计数结果，按 2X10⁶/mL 细胞密度重悬于 Nuwacell[®] hMSC 冻存液中，液氮保存。

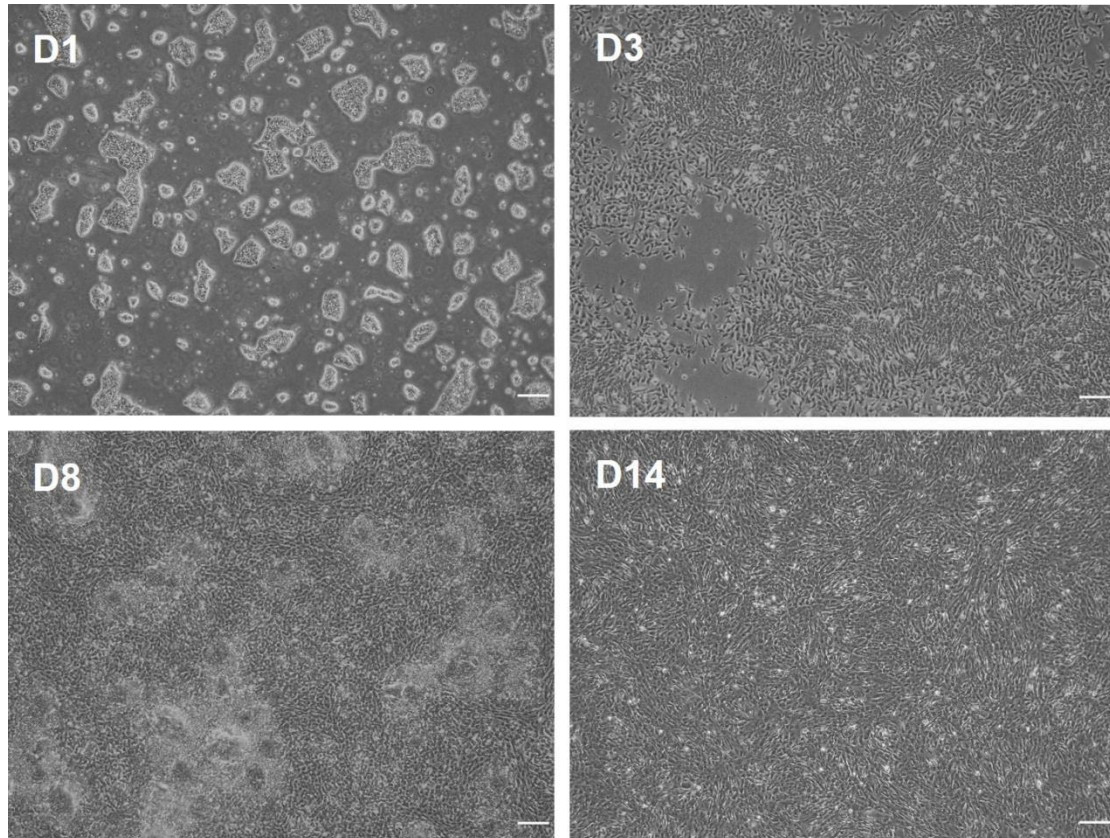


图 1：hPSC-MSC 分化试剂盒分化的 MSC 细胞形态图示。

图示分别为分化过程中 DAY 1、3、8、14 时的细胞形态。标尺：200μm。

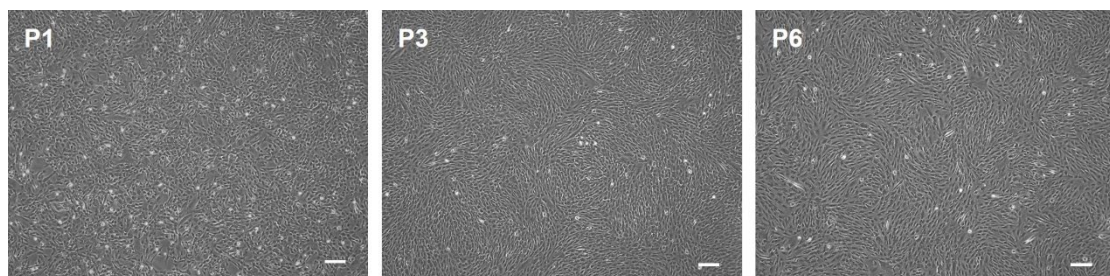


图 2：分化得到的 hPSC-MSC 细胞连续培养形态图示

图示分别为 hPSC-MSC 生长到 P1、P3、P6 代的细胞形态（汇合度 80-85%）。

标尺：200μm。