

以下试剂和方法来自 ATCC，仅供参考。若选用其它品牌的培养液请与您的试剂提供商联系。

hiPS 无饲养层完全培养液 (ATCC, ACS-3002)，hiPS 无饲养层消化液 (ATCC, ACS-3010)，hiPS 无饲养层冻存液 (ATCC, ACS-3020)，基质胶 (ATCC, ACS-3035)，ROCK Inhibitor Y27632 (ATCC, ACS-3030)

### 复苏:

1. 将人 iPS 细胞冻存管从液氮中取出，置于 37°C 水浴中使之迅速融解，取出后拿到超净台内用 75% 酒精擦拭冻存管旋口处及外壁，防止污染。
2. 用 1 ml 移液器轻柔地将冻存管内液体转移到 15 ml 离心管中。
3. 在上述离心管内逐滴加入温育好的 4 ml hiPS 无饲养层完全培养液，一边加一边晃动离心管。
4. 离心 1000 rpm，5 min。
5. 将上清丢弃，轻弹离心管底部使细胞团松散。
6. 加入 1ml 含有 ROCK Inhibitor Y27632 的 hiPS 无饲养层完全培养液，非常轻柔地吹打 2-3 次。不可过度吹打，避免细胞被分散成单细胞。
7. 将铺过基质胶的培养皿从培养箱取出，吸掉多余的液体，加入含有 ROCK Inhibitor Y27632 的培养液 3 ml。
8. 将第 6 步中离心管内的细胞悬液转移到皿内，使细胞铺散均匀，置 37°C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。
9. 24h 后，换新鲜的不加 ROCK Inhibitor Y27632 的 hiPS 无饲养层完全培养液。
10. 每天换液。ROCK Inhibitor Y27632 仅在复苏和传代时添加 (1:1000)，日常换液不用添加。

### 传代:

1. 将所需的所有试剂均在 37°C 水浴温热。
2. 将培养皿内的培养液弃掉，用 DPBS 漂洗 2 遍，弃掉。
3. 加入 2 ml hiPS 无饲养层消化液。
4. 37°C 孵育 10-15 分钟，期间注意观察，直到每个克隆的边缘都向中心卷起。
5. 将 hiPS 无饲养层消化液吸掉，轻轻地加入 4ml DMEM:F12 培养液并晃动培养皿，吸掉。
6. 加入 2 ml 含有 ROCK Inhibitor Y27632 的培养液，用 1 ml 移液器吹打皿底或用无菌的细胞刮使细胞脱落。避免吹打过度。
7. 将细胞转移至 15 ml 离心管，并再次加入 3 ml 含有 ROCK Inhibitor Y27632 的培养液将培养皿冲洗一次，收集到离心管内。
8. 离心 1000 rpm，5 min。
9. 将上清丢弃，轻弹离心管底部使细胞团松散。
10. 加入 2 ml 含有 ROCK Inhibitor Y27632 的 hiPS 无饲养层完全培养液，非常轻柔地吹打 2-3 次。不可过度吹打，避免细胞被分散成单细胞。

11. 将细胞分到预铺了基质胶的培养皿内培养。
12. 每天换液，4-5 天传代一次，传代比例为 1:2-1:6。当出现下列任何一种情况时，需要进行传代：细胞汇合度达到 90%；干细胞克隆过大，中央细胞生长不良；克隆有开始分化的迹象。

冷冻：

1. 参照传代步骤 1-9，hiPS 无饲养层冻存液 4℃保存，不需要预热。
2. 在离心管内加入 2 ml 细胞冻存液，轻轻吹打，避免过度吹打。
3. 将细胞悬液分装到贴好标签的冻存管内，每管 0.5 ml。
4. 将冻存管放入程序降温仪，置-80℃。
5. 24h 后，冻存管转入液氮保存。