

成纤维细胞重编程试剂盒

Episomal iPSC Reprogramming Kit for Fibroblasts

货 号: 621005 5 次
621010 10 次

储存温度: -15~-25 °C

注意事项: 避免反复冻融; 仅供研究使用, 不可用于临床治疗或诊断。

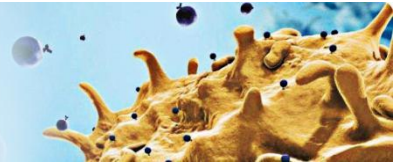
Episomal iPSC Reprogramming Kit 是一种高效的非基因插入整合型重编程系统, 可将体细胞重编程为诱导多能干细胞 (Induced pluripotent stem cells, iPSCs)。其利用多能性因子 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc 的非整合型质粒载体诱导体细胞生成无外源基因插入整合的 iPSCs, 对于重编程难度较大的悬浮细胞, 此系统重编程效率较高 (#611005), 如外周血单个核细胞 (Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)。

由于 Episomal iPSC Reprogramming Kit 重编程效率高、实验取材方便 (5-10 mL 外周血)、操作简单, 并且无外源基因插入整合等优点, 适合用于 iPSCs 疾病模型的建立、药物开发、细胞治疗以及其它再生医学研究领域。



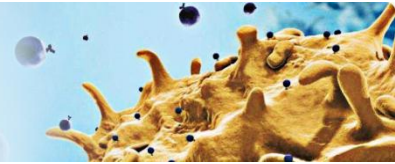
Precision BioMedicals Co., Ltd

金准生物医药科技(天津)有限公司

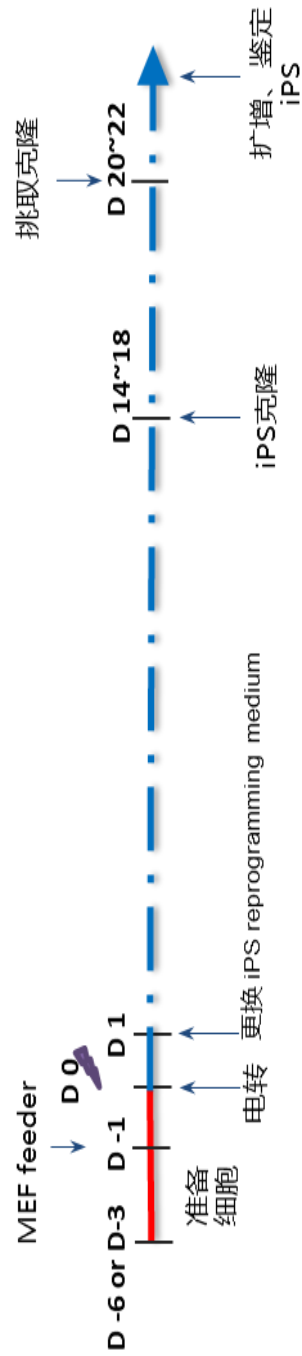


目录

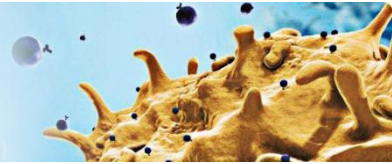
一、试剂、耗材和仪器准备.....	4 -
1.1 实验耗材.....	4 -
1.2 实验试剂.....	4 -
1.3 实验仪器.....	5 -
二、实验操作步骤.....	6 -
2.1 成纤维细胞的培养.....	6 -
2.2 成纤维细胞的重编程.....	6 -
2.3 iPSCs 细胞的挑取和扩增.....	9 -
2.4 iPSCs 的鉴定.....	10 -
2.5 iPSCs 传代、冻存、复苏.....	15 -
三、常见问题.....	17 -
参考文献.....	19 -
附录.....	20 -
附录一：培养皿的预包被.....	20 -
附录二：MEF 滋养层细胞的制备.....	22 -



实验流程图:



仅供研究使用，不可用于治疗或诊断。



一、试剂、耗材和仪器准备

1.1 实验耗材

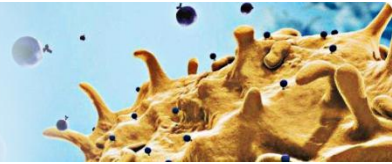
- 1) 血清移液管 (10 mL, 5 mL, 2 mL)
- 2) 枪头 (1 mL, 200 μ L, 20 μ L)
- 3) 离心管 (50 mL, 15 mL) (Corning)
- 4) Eppendorf 管 (1.5 mL) (Nuc)
- 5) 6 孔培养板 (Corning)
- 6) 0.22 μ m 无菌过滤器 (NovoBiotec #033022)
- 7) 分装管 (5 mL) (NovoBiotec #401003)

1.2 实验试剂

- 1) 成纤维细胞和 MEF 培养基:

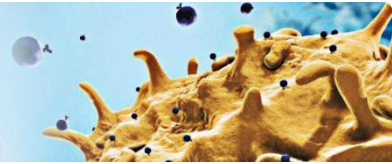
成份	体积 (浓度)
DMEM (high glucose) (PBM #609044)	500 mL
FBS (PBM #FBS141-500)	10%
L-glutamine (#214010)	1 \times
β -mercaptoethanol	0.1 mM
Pen Strep	1 \times
经 0.22 μ m 滤器无菌过滤后, 放置 4 $^{\circ}$ C 保存。	

- 2) iPS 重编程培养基: HapClutTM iPS reprogramming medium (PBM, #621050)
- 3) Matrigel (Corning,#354277)、Vitronectin (PBM, #VTN-500)
- 4) HapClutTM iPS Culture medium: (PBM, #622050)
- 5) MEF 细胞 (经丝裂霉素处理) (PBM, #904410)
- 6) 0.1% BSA
- 7) HapClutTM D-PBS (PBM, #201001)
- 8) 0.5 mM EDTA (PBM, #205010)
- 9) HapClutTM 0.1% Gelatin (PBM,#211050)
- 10) Human Dermal Fibroblasts Nucleofector[®] Kit (Lonza, #VPD-1001)
- 11) Y27632 (PBM,#215010)
- 12) Early iPS Freezing medium (PBM, #641010)
- 13) 0.25% Trypsin (PBM,#607025)
- 14) L-Glutamin (PBM,#214010)
- 15) Accutase (PBM,#608510)



1.3 实验仪器

- 1) 倒置相差显微镜 (带拍照系统)、荧光/共聚焦显微镜
- 2) CO₂ 培养箱、手术器械等
- 3) 生物安全柜 (安全等级为 II 级)
- 4) 低速离心机
- 6) 电转仪
- 7) 移液器
- 8) 4~8 °C 冰箱
- 9) -20 °C 冰箱
- 10) -80 °C 冰箱
- 11) 异丙醇梯度降温冻存盒
- 12) 液氮罐
- 13) 水浴锅

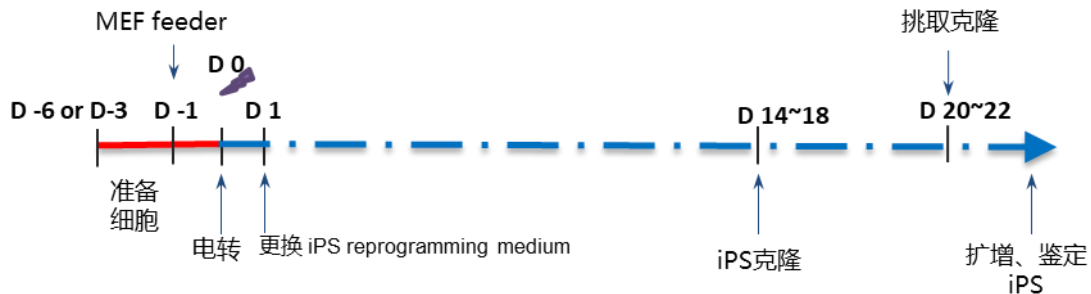


二、实验操作步骤

2.1 成纤维细胞的培养

贴壁细胞根据不同种属或细胞的特殊要求培养细胞，如成纤维细胞可以培养在 MEF 培养基。需要注意的是，在细胞重编程之前要确保细胞处于最佳的细胞生长状态或指数生长期，避免细胞生长过度或单层细胞密度较高；一般细胞传代后第二天下午，单层细胞愈合度达到 85%左右时最佳。细胞状态直接影响细胞的转染效率和重编程效率。

2.2 成纤维细胞的重编程



【Day -6~-2】: 扩增培养成纤维细胞

- 1) 将分离的成纤维细胞或冻存的成纤维细胞复苏。如果是原代的皮肤成纤维细胞，请在 P2 代时进行重编程；如果是细胞系，调整细胞的生长状态，复苏后传代一次进行重编程。
- 2) 待复苏的细胞培养 2~3 天，细胞生长到覆盖培养皿表面积 80~85%时，进行传代或准备用于细胞重编程。
- 3) 传代时细胞用 0.25%胰酶（含 EDTA）消化细胞，用 MEF 培养基终止酶的消化作用。
- 4) 细胞收集到 50ml 离心管中，1200rpm 离心 8 分钟，洗涤细胞一次，去除胰酶。
- 5) 离心收集的细胞团用成纤维细胞培养基重悬，传代或者电转质粒。

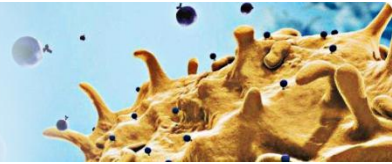
【Day -1】: MEF 滋养层细胞准备

- 6) 提前 30 min 用 1 mL 0.1% gelatin 处理包被一个新的培养孔（6 孔板），放置在 37 °C 培养箱 30 分钟。
- 7) 随后复苏 1 支丝裂霉素 C 失活的 MEF 滋养层细胞，离心去上清后，用 1 mL MEF 培养基重悬细胞计数， 1×10^5 细胞/孔（6 孔细胞培养板）接种到包被明胶的培养孔。接种细胞前，将包被的明胶从培养孔中吸出，用 D-PBS 洗涤一次，再接种 MEF 细胞。

【Day 0】: 转染细胞

温和处理细胞对于重编程的成功是必不可少的。

- 8) 在转染细胞前，提前 30 min 将 MEF 细胞的培养基更换为新鲜培养基，放置于 37 °C 培养箱预温备用。
- 9) 在室温条件下解冻 Episomal iPSC Reprogramming Kit，并将它们置于冰盒上备用。使用前，将解冻试剂盒短暂离心，收集试剂在管底部。
- 10) 根据所用电转仪器和试剂说明配制电转液（不同电转仪器和试剂要求不同，请根据说明书要求配制或



优化)。如配制 Human Dermal Fibroblasts Nucleofector® Kit (Lonza, #VPD-1001) 电转液用于重编程皮肤成纤维细胞(见下表), 并充分混合均匀。

名称	体积数量
Human Dermal Fibroblast Nucleofector® Solution	82µL
Supplement	18 µL
Episomal iPSC Reprogramming Kit	5~9 µL

- 11) 将扩增的细胞消化洗涤后, 充分混匀, 取适量细胞悬液, 使用血细胞计数器或自动细胞计数器计数细胞量, 以确定细胞的活力和总数。
- 12) 将 $2.5\sim 10\times 10^5$ 细胞转移到 5 mL 分装管中, $300\times g$ 离心 5 分钟。
- 13) 小心吸出大部分上清液, 剩余约 100-200 µL 上清液用 200 µL 移液器移除。
- 14) 将得到的细胞重悬于配制好的电转液中。
注意: 混匀时用手指轻轻弹管底部 3-5 次, 使细胞重新悬浮在电转液中。
- 15) 将混合液用移液器小心缓慢地转移至无菌电转杯中。
注意: 在移液过程中避免产生气泡; 若发现电转杯内有气泡, 小心地吸出, 再次重新加入样品, 杜绝气泡。
- 16) 打开 Lonza™ 电转仪装置, 将电转杯放入电转仪中, 检查确认无误后选择 U-020 程序, 点击触摸屏上的“开始”启动键。
注意: 触摸屏显示“完成”, 表示电转已完成。
- 17) 电转完成后, 从电转仪中取出电转杯, 将电转杯放置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱 5 分钟, 随后立即将细胞转移至含有 MEF 饲养细胞和 MEF 培养基的培养孔中(已提前预温至 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$), 并用预温的培养基清洗电转杯 1-2 次。细胞接种浓度为 1×10^5 /孔。
注意: 将细胞逐滴加入孔中, 使之均匀分布; 将电转杯在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中放置 5 分钟可提高细胞活性和电转效率; 将使用后的电转杯(视为危险生物废品)丢弃。
- 18) 将细胞培养板前后左右摇晃混匀, 放至已消毒处理的培养箱中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养一天。

【Day 1】: 半量换液 HapClut™ iPS reprogramming medium

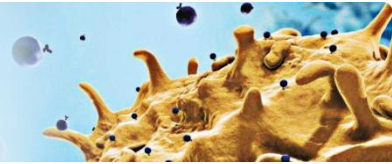
- 19) 将原有的 MEF 培养基吸出一半, 更换为新鲜室温(或 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预温)的 1.5 mL HapClut™ iPS reprogramming medium 培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养一天。

【Day 2, 4, 6】: 更换新鲜 HapClut™ iPS reprogramming medium

- 20) 将培养孔中原有的培养基吸出弃掉, 重新加入 2 mL 新鲜的 HapClut™ iPS reprogramming medium 培养基, 继续 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养。
注意: 每次换液时如无特殊说明, 默认在孔内留少许原有的培养基, 防止换液时孔内液体蒸发影响细胞状态。

【Day 5~6】: 准备新的 MEF 滋养层细胞

- 21) 用 HapClut™ 0.1% Gelatin 包被适当数量的细胞培养孔(6 孔板), 室温放置 30 分钟包被; 包被后将多余的明胶溶液吸出, 同时用 D-PBS 洗涤培养孔。



22) 将复苏的 MEF 细胞 (已经经过丝裂霉素处理) 接种到包被的 6 孔板中备用制备条件培养基或者 $0.5 \sim 0.8 \times 10^5$ MEF 细胞 (重编程培养基重悬 MEF 细胞) 接种入重编程细胞孔以提供营养支持。

23) (可选) 根据培养孔中细胞的生长密度情况, 可以将电转质粒后的成纤维细胞用 Accutase 消化后重新接种到新制备的 MEF 滋养层细胞中, 以保证新的 MEF 细胞对重编程的支持作用。每天一次更新新鲜 HapClut™ iPS reprogramming medium 培养基, 培养 16~20 天直至出现 iPS 克隆。

【Day 7~14】: 更换培养基

24) 每天一次更换条件培养基或 HapClut™ iPS reprogramming medium, 培养至 Day 16~Day 20 直至出现 iPS 克隆。

【Day 15~ Day 22】: 挑取克隆

25) 约在 16~18 天后, 在显微镜下可看见一定数量的克隆出现, 此时培养基更换成 HapCult™ iPS culture medium 培养基培养 iPSCs 即可。

注意: 当克隆足够大且足够多时, 比较适合挑取, 克隆成活率较高。

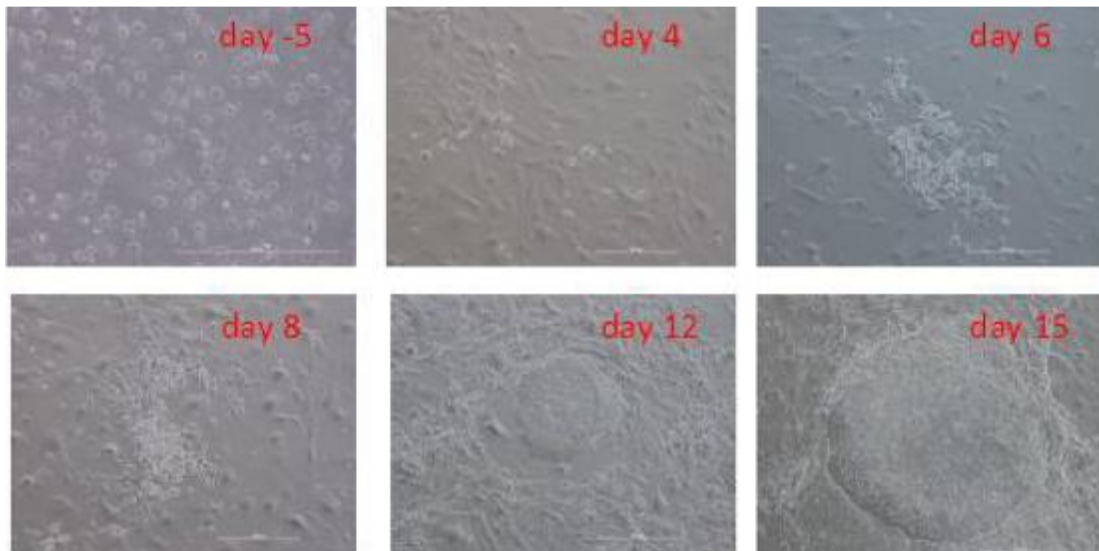


Fig.A 重编程 PBMCs 为 iPSCs 过程中不同时间点细胞形态图 (带滋养层细胞)

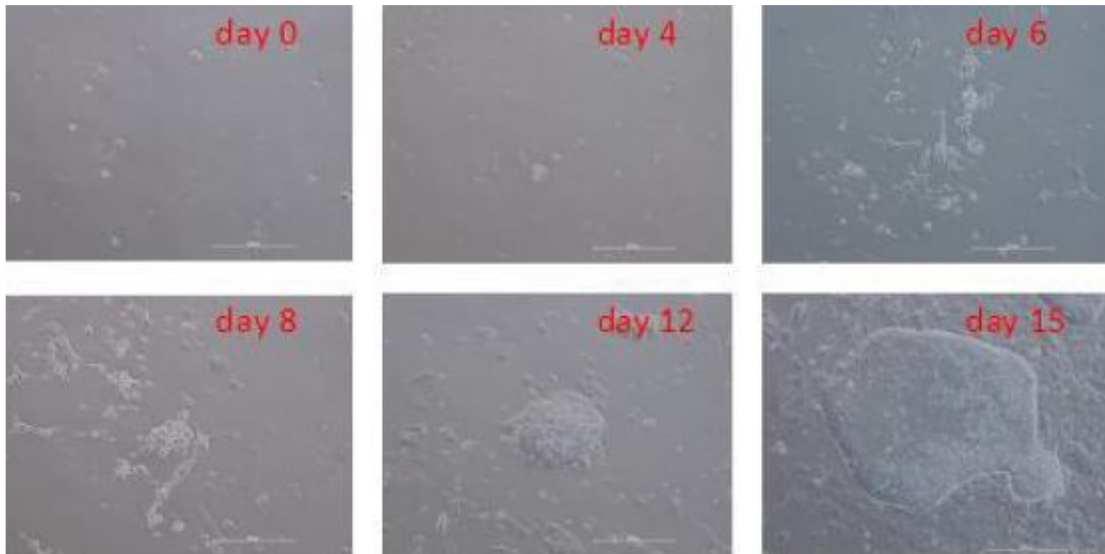
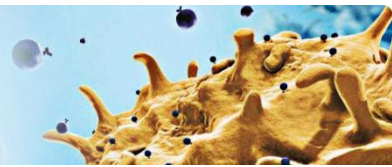


Fig.B 重编程 PBMCs 为 iPSC 过程中不同时间点细胞形态图 (无滋养层细胞)

2.3 iPSCs 细胞的挑取和扩增

- 1) 下列操作应该在无菌条件下,采用倒置显微镜操作,操作前在室温(15~25 °C)下预温 HapClut™ iPS Culture medium 和已包被的培养皿。
- 2) 提前包被培养皿,(见附录)。
- 3) 将含有重编程细胞的培养皿置于倒置显微镜下,并在 10×放大倍数下观察 iPS 克隆。
- 4) 使用装有 20 μL 微量吸管的移液器,将 iPS 克隆划成小块。
- 5) 用 20 μL 微量吸管刮擦并吸取克隆碎片。
- 6) 将克隆碎片接种到预先包被,并含有 HapCult™ iPS culture medium 培养基的 12 孔板中,放置 CO₂ 培养箱中培养。

注意: 为了促进 iPS 细胞克隆碎片的存活率和克隆效率,可向 HapCult™ iPS culture medium 培养基中加入小分子抑制剂 Y-27632,终浓度 10 μM,24 小时后用不含小分子抑制剂的培养基换液。

- 7) 当细胞长到覆盖培养皿底部 70%~90%时可以进行传代;吸走培养液,加入 1 mL 倍比稀释的 Accutase (0.5×),消化 2-4 分钟。
- 8) 显微镜下观察,待细胞变圆,细胞之间连接消失时,加入培养基稀释终止酶的消化作用,收集细胞到离心管中,1200rpm 离心 8 分钟,去上清。
- 9) 用 1 mL 含 Y-27632 的 HapCult™ iPS culture medium 培养基重悬,根据细胞密度按 1:4 至 1:6 比例传代至新的已准备的细胞培养孔中,放置 CO₂ 培养箱中培养。

注意: 轻轻吹打细胞至数个至数十个细胞一团,不要把细胞吹成单细胞。

- 9) 扩增后的 iPSCs 达到一定的数量后,可进行冻存或多能性鉴定等细胞功能实验检测。

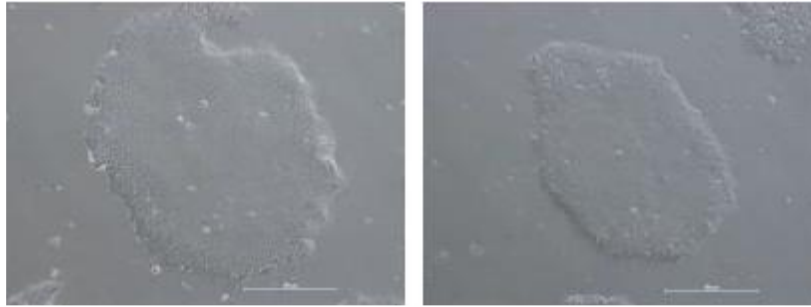
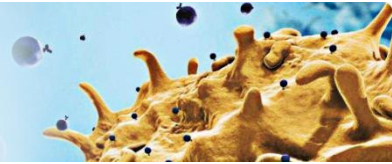


Fig.C iPSC 在 Matrigel 上培养形态图

2.4 iPSCs 的鉴定

A. 碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase, AP) 染色

碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase) 是一种在碱性条件下负责核苷酸、蛋白质、生物碱分子去磷酸化的水解酶。AP 在大多数类型的细胞中不表达，而在多能型干细胞中其表达水平较高，因此，AP 被看做是一种通用的多潜能干细胞的标志物，包括 ESCs、胚胎生殖细胞 (embryonic germ cells, EGCs) 和 iPSCs。干细胞可通过鉴定细胞的 AP 活性水平高低和其它多能性标志物的表达来确定细胞的多能性及分化状态。当固定的 ESCs 或 iPSCs 细胞被 AP 染色后，未分化的细胞会出现红色或紫色，而分化的细胞显示为无色。

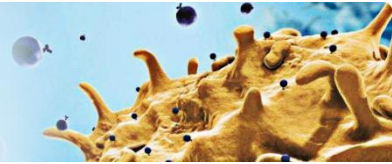
试剂准备:

- 1) Stemgent® Alkaline Phosphatase Staining Kit II
- 2) Kit 未提供的试剂准备:
PBS 缓冲液、固定液 (4%多聚甲醛)、TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween-20)

实验步骤:

- 1) 吸出 6 孔板中细胞培养液，用 PBST 润洗 2 次。
- 2) 加入 2 mL 固定液室温固定 1-2 min (不要固定超过 2 min, 过度固定会使得碱性磷酸酶失活)。
- 3) 吸出固定液，用 PBST 洗涤细胞 2 次 (避免细胞培养孔干燥)。
- 4) 准备碱性磷酸酶试剂：将试剂盒里的 A 液和 B 液 1:1 在 15 mL 离心管中混合均匀 (AP 染液每次在用之前提前 4 min 配置；每个孔 (6 孔板) 的细胞准备 1 mL 的 AP 染液)。
- 5) 吸出 PBST 后加入新鲜配置的 AP 染液 1 mL/孔。
- 6) 在室温下避光反应 10-20 min (密切观察细胞颜色的变换，当细胞颜色变亮时终止 AP 反应，避免非特异性染色反应)。
- 7) 吸出 AP 染色液，利用 PBS 洗涤细胞 2 次以终止 AP 染色反应。
- 8) 可观察到未分化的 hESC 变红或紫色，分化的细胞无色。将培养板在 2~8 °C 储存或者拍照后将其丢弃。

B. 多能性蛋白表达分析



多能性干细胞表达特异的多能性标志物, 这些多能性标志物包括细胞内的转录因子 (Nanog, Oct4, Sox2)和细胞表面阶段特异性胚胎抗原 (stage-specific embryonic antigens, SSEA) (SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4)以及肿瘤相关抗原 (tumor related antigen, TRA) (Tra-1-60, Tra-1-81)。值得注意的是在未分化的灵长类ES细胞以及人的hECs和hESCs表达SSEA-3和SSEA-4, 但不表达SSEA-1。未分化的小鼠ES细胞表达SSEA-1, 但不表达SSEA-3或SSEA-4。可通过免疫荧光染色鉴定多能性蛋白标志物的表达, 以判断PSC是否保持未分化状态。

试剂准备:

D-PBS (PBM #201001)

4%PFA (NovoBiotec # 421005)

Triton X-100 (NovoBiotec # 423010)

BSA

TRA-1-60 (Podocalyxin) Monoclonal Antibody (TRA-1-60), PE, eBioscience™ (#12-8863-82)

SSEA4 Monoclonal Antibody (eBioMC-813-70 (MC-813-70)), PE, eBioscience™ (#12-8843-42)

OCT3/4 Monoclonal Antibody (EM92), PE, eBioscience™ (#12-5841-82)

SOX2 Monoclonal Antibody (Btjce), Alexa Fluor 488, eBioscience™ (# 53-9811-82)

DAPI (NovoBiotec #425010)

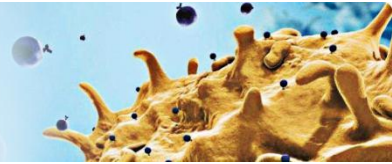
抗淬灭剂 (NovoBiotec #424010)

50%甘油 (NovoBiotec #642010)

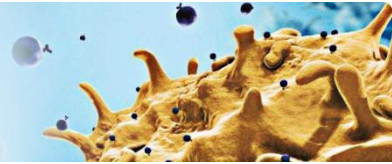
实验步骤:

- 1) 将圆盖玻片在工业乙醇中浸泡消毒, 用镊子轻轻夹起在酒精灯上灼烧 1 秒, 待火焰灭掉后, 轻轻放于 24 孔板中。
- 2) 加入 0.1% gelatin, 37 °C 30 分钟, 复苏 MEF 饲养细胞, 转天即可使用; 或者用稀释的 matrigel 处理, 室温 1 小时后, 即可使用, 或放入 4 度冰箱避光保存, 一周内使用。
- 3) 传代 iPS 细胞, 细胞数目要适当少于扩增传代, 常规培养 3~4 天, 在显微镜下观察克隆形态, 并且克隆之间不能连接。
- 4) 吸掉培养基, 用 PBS 洗涤 1~2 次, 加入 4% PFA 室温固定 30 分钟。
- 5) 染核 (如 NANOG OCT4), PBS 洗涤 15 分钟×3 次, PBST (PBS 加 0.1% Triton X-100)洗涤 20 分钟×3 次。
- 6) 染膜 (如 TRA-1-60), PBST 洗涤 5 分钟×2 次。
- 7) 用封闭液 (PBS 加 5%羊血清和 0.3% BSA) 室温封闭 1 小时。
- 8) 用封闭液稀释抗体: TRA-1-60 mouse 一抗、OCT3/4 一抗、SSEA4 一抗、SOX2-AF488 mouse 一抗 (稀释比例根据说明书要求)。
- 9) 一抗孵育(时间根据说明书要求)。
- 10) 染核, PBST 洗涤 15 分钟×3 次; 染膜, PBS 洗涤 15 分钟×2 次。
- 11) 用封闭液稀释荧光二抗 (稀释比例按照说明书), 从此开始需要避光操作, 如果一个孔的细胞染了多个一抗, 且一抗有用流式直标抗体, 则和直标抗体荧光素相同的二抗只能用于标记该抗体。

注意: 需要注意种属来源, 如果一个孔细胞只染了一个一抗, 那么在种属匹配的情况下二抗任选



- 12) 二抗 37 °C 孵育 1 小时。
- 13) 用 PBST 洗涤 15 分钟×3 次。
- 14) 用 Hoechst 或 DAPI 染核 5 分钟。PBS 洗 5 分钟×3 次
- 15) 在载玻片上滴加 7 μ L 抗淬灭剂 (或 50% 甘油), 用小镊子从 24 孔板中轻轻夹起爬有细胞的盖玻片, 用指甲油在盖玻片边缘轻摸一圈, 有细胞的一面朝载玻片, 将盖玻片轻轻放到抗淬灭剂上, 尽量不要有气泡。
- 16) 尽快到共聚焦显微镜上拍照。



实验结果:

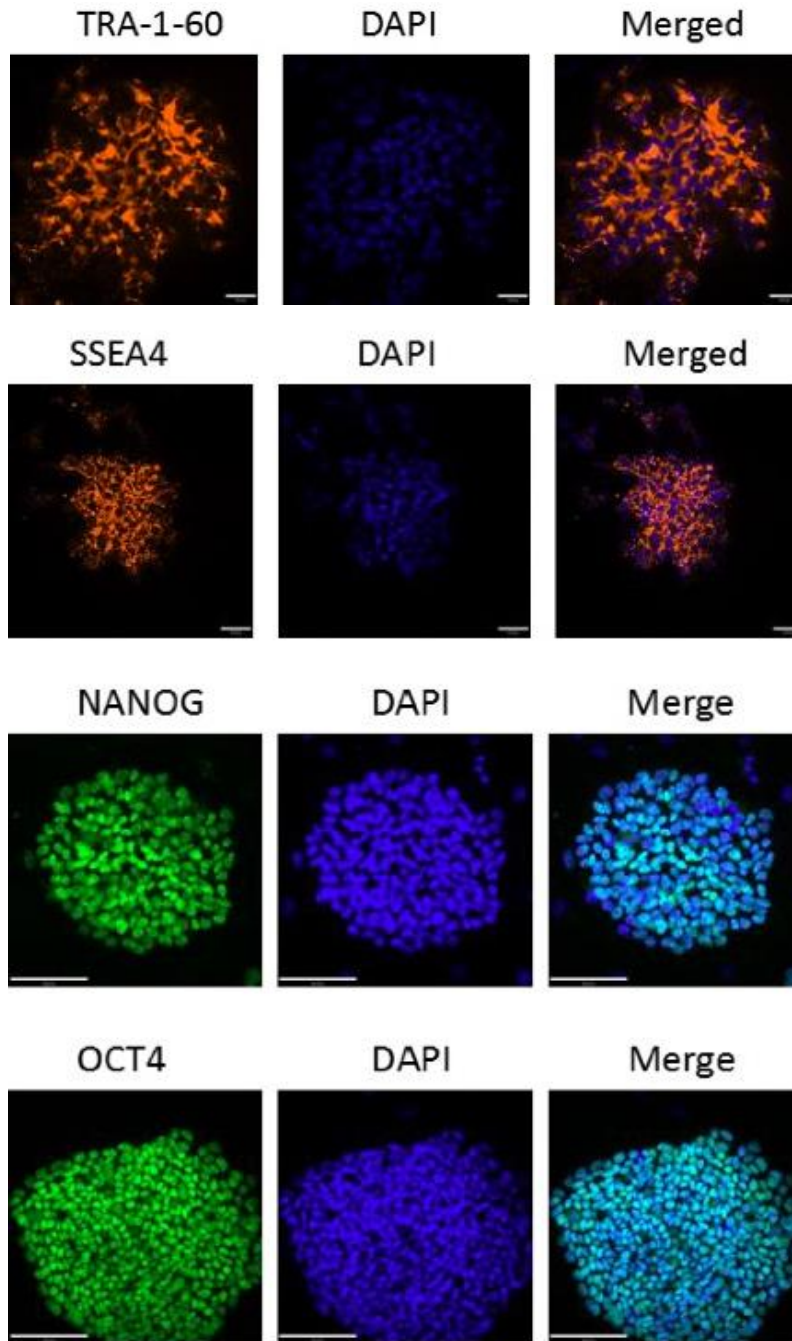


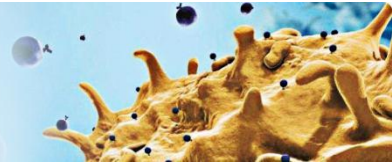
Fig.D iPSC 免疫荧光染色 (TRA-1-60, SSEA4, NANOG, OCT4, DAPI) 结果

C. iPSC 畸胎瘤三胚层形成实验

对于 mESCs, 嵌合体囊胚注射或四倍体囊胚注射生成嵌合体小鼠或四倍体囊胚注射小鼠的体内实验是证明细胞全能性的最可信实验, 而对于 hESCs, 由于伦理的原因这种实验是被明确禁止的。然而成年小

仅供研究使用, 不可用于治疗或诊断。

- 13



鼠含有支持 hESCs 生长并分化成多种组织和细胞类型的微环境，所以 hESCs 在小鼠体内形成畸胎瘤是一种不完美但可被用来验证 hESCs 全能性的替代实验。当 hESCs 通过皮下注射、肌肉注射或睾丸内注射的方法注射到成年免疫缺陷小鼠体内后，人胚干细胞将自发形成畸胎瘤样的组织块，其中包含内、中、外三个胚层的组织细胞，如外胚层的神经和皮肤细胞，中胚层的骨、血细胞和肌细胞，内胚层的肠组织细胞。而在畸胎瘤中形成三个胚层来源的分化细胞被认为是 hESC 全能性最好的指标。

试剂准备:

HapCult™ iPS culture medium、PBS、高浓度 Matrigel、NOD/SCID 小鼠、4%PFA

器材准备:

Dish (10 cm)、Cell Scraper (细胞刮)、50 mL 离心管、离心机、1 mL 注射器、冰盒。

实验步骤:

- 1) 将 iPSCs 种于 dish (10 cm)，待细胞生长至密度达 90%左右。
- 2) 用 Cell Scraper (细胞刮) 将细胞全部刮离 Dish，置于 50 mL 离心管中。
- 3) 用 PBS 冲洗 Dish 一遍，将细胞全部转移至 50 mL 离心管中。
- 4) 离心，200×g，5 分钟，弃上清。
- 5) 用高浓度 Matrigel 150-200 μL 重悬细胞沉淀，用事先置于冰上的 1 mL 注射器吸取细胞悬液，后注射器再次埋于冰上。
- 6) 将细胞悬液注射至 5~6 周的 NOD/SCID 小鼠大腿肌肉中，至少 10⁶/ injection。
- 7) 8 周左右以后，小鼠大腿处有肿块形成，剥开后才发现具有完整包膜的囊状实体肿瘤结构，通常在直径 2 cm 左右时剥离肿瘤，4% PFA 室温固定过夜，通过组织切片证实肿块为畸胎瘤，通过 H.E.染色发现形成的畸胎瘤包含三个胚层的结构。

实验结果:

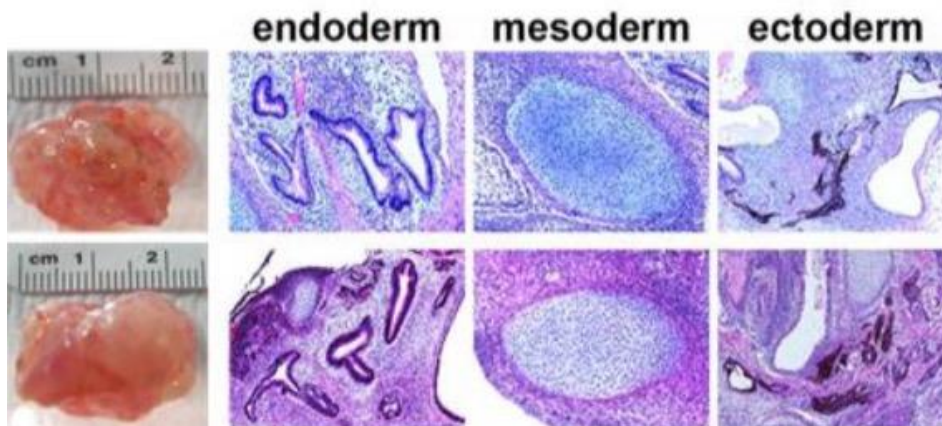
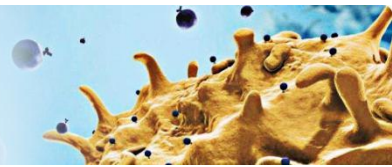


Fig.5 iPSC 注射免疫缺陷小鼠 8 周畸胎瘤(左 1)和三胚层 H.E.染色结果(左 2, 右 1, 右 2)



D. 核型分析

核型是指真核细胞的细胞核中染色体的数目和形态。核型描述有机体的染色体数，以及这些染色体在光学显微镜下的状态。核型研究对于细胞生物学和遗传学的都非常重要的，其结果可用于进化生物学和医学。核型分析可用于多种研究；如研究染色体畸变，细胞功能、分类关系和收集关于过去的进化活动的信息。

在常规培养、扩增和操作期间，hPSC 应保持正常的基因构成。虽然如此，但长期传代过程中仍可能出现染色体和遗传畸变，而这大概是因为它们为培养物中的亚群赋予了一种增殖优势。已有报告称，长期体外传代后，会重复出现特定的核型畸变，这说明这些染色体区域的某些基因的过度表达与自我更新有关。酶传代和高细胞密度等多种因素都可能导致培养物中 hESC 或 hiPSC 的核型不稳定。相应地，定期检查 hPSC 培养物以排除发生核型畸变的可能性至关重要。

2.5 iPSCs 传代、冻存、复苏

2.5.1 PSCs 的复苏:

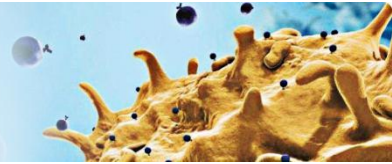
- 1) 准备 37 °C 水浴，提前包被培养孔 (见附录一)，并在 15 mL 离心管中加入 5 mL F12K (Gibco 11765-054) 培养液备用。
- 2) 从液氮中取出细胞，迅速放入 37 °C 水浴中解冻；在水浴中不断摇晃冻存管，以便快速解冻，直至冻存细胞管仅含微小冻块。
- 3) 在生物安全柜中，迅速将解冻的细胞转移到上述离心管中，200×g 离心 5 分钟。
- 4) 弃上清液，加入一定量含 Y27632 培养基轻轻重悬均匀，细胞不可用力吹，否则可能吹成单细胞而降低其存活率。
- 5) 按一定比例 (取决于细胞密度，通常 $2 \sim 3 \times 10^5$ 个左右)，均匀接种到 6 孔板里，用 HapCult™ iPS culture medium+Y27632 培养基补足培养液至 2 mL。

2.5.2 换液:

复苏或者传代细胞第二天，更换新鲜 HapCult™ iPS culture medium 培养液 2 mL。培养的人多能干细胞每天更换新鲜培养基。更换新鲜培养基是要迅速，避免细胞表面干燥。

2.5.3 传代:

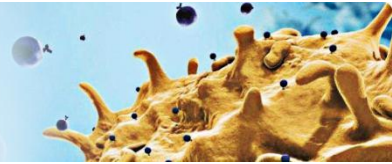
- 1) 提前包被细胞培养板或者培养皿用于细胞传代。(见附录一)
- 2) 当 hPSCs 在培养皿底部长到 70%-90% 时可以传代，吸走培养液，加入 37 °C 水浴预温的 0.5 mM EDTA 1 mL。
- 3) 消化 5~6 分钟，显微镜下观察，待细胞变圆，细胞之间连接消失时，吸走 EDTA。
- 4) 用 1 mL HapCult™ iPS culture medium (添加 Y27632) 培养基重悬，轻轻吹打细胞至数个至数十个细胞。



- 胞一团, 不要把细胞吹成单细胞, 可以在显微镜下观察,
- 5) 根据细胞密度按 1:10 至 1:5 比例传代至新包被的培养孔中 (同复苏细胞)。
 - 6) 为提高细胞传代的成活率, 可以向传代的细胞液中添加 10 μ M Y27632。
 - 7) 传代后的细胞均匀接种后, 第二天更换新鲜培养液。

2.5.4 冻存:

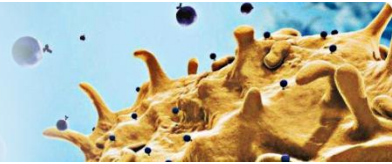
- 1) 当 hPSCs 在培养皿底部长到 70%-90%时可以传代或冻存; 吸走培养液, 加入 37 $^{\circ}$ C 水浴预温的 0.5 mM EDTA 1 mL 或者倍比稀释的 Accutase 消化细胞;
- 2) 细胞消化后 (同传代), 离心收集细胞;
- 3) 去掉上清, 用预冷的 iPS 早代冻存液重悬细胞, 细胞吹下即可, 不需要过度吹散, 因为复苏时也会吹打细胞, 放到冻存管中;
- 4) 将冻存管放到冻存盒中于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱梯度降温, 第二天转入液氮中长期保存。



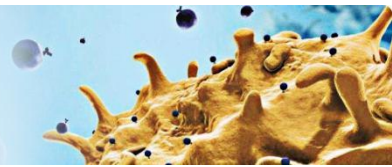
三、常见问题

由于不同个体来源的原代细胞存在差异性，同时不同实验操作人员的操作熟练程度以及受细胞培养经验等主观因素的影响，试剂盒的重编程效率将会受到一定的影响，如出现如下实验问题，请参考相应的实验解决方案调整，以期获得较好的实验结果。

问题	可能原因	解决方案
PBMCs 在培养时出现大量死亡	细胞本身活性不高; 细胞本身容易凋亡; 细胞密度过低。	1) 保证复苏后活细胞比例和数量，死亡细胞过多会影响活细胞的生长; 2) 由于个体差异性，有的细胞样本较容易发生凋亡，此时可尝试提前电转，不必培养 6 天，同时应设置合适的健康人来源细胞作为对照以排除试剂问题; 3) 增加细胞密度，悬浮细胞密度至少应为 $10^6/\text{mL}$ 。
PBMCs 数目不足	样本稀有，无法达到电转要求。	1) 电转体系和质粒量不变，降低细胞至 2×10^5 个，电转后细胞全部铺到 MEF 饲养细胞上。重编程效率约为正常情况的 50%，不同样本可能差异较大; 2) 更换其它重编程方法，如慢病毒、SendaiVirus 等。
电转后细胞死亡过多	电转前细胞死亡比例较高; 电转程序使用错误; 质粒毒性大。	1) 电转前应确定细胞活性，至少应为 60%，否则可能影响电转效率; 2) 确认电转程序，不同电转仪参数可能不同，有可能需要优化电转条件; 3) 电转后细胞活性 30% 左右为正常现象，如果过低，可能影响重编程效率; 4) 质粒应采用 Endofree (去内毒素) 试剂盒提取。
MEF 滋养层细胞死亡过多	MEF 滋养层细胞本身死亡导致; 电转后死细胞过多导致。	1) 适时补充新复苏的 MEF 饲养细胞; 2) 减少电转后细胞种入的细胞数; 3) 由细胞个体差异导致，尤其是疾病细胞，补充新 MEF 饲养细胞即可。
无克隆出现	电转前细胞 CD34 ⁺ 比例过低; 电转时质粒用错或少加一个或多个; 电转后细胞接种数目过少; 重编程	1) 一般情况下，经红系培养基培养 6 天后，CD34 ⁺ 比例应大于 1%，如果过低，则可能影响重编程效率; 2) 电转前应确定质粒浓度和质量，质粒应避免反复冻融，可以经过电泳检查质粒完整性，质粒中乙醇含量 (A230 值) 太高会严重影响电转和重编程效率，质粒浓度不宜过低，否则加入质

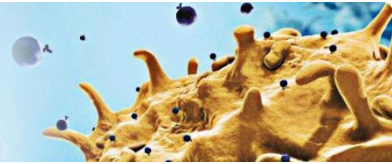


问题	可能原因	解决方案
	时间不足; 样本个体差异。	粒体积大于电转缓冲液体积 10%可能会影响电转效率, 质粒使用前需要混匀; 3) 适当增加电转后细胞接种数目, 在细胞数目允许的前提下, 可以尝试种多个密度以提高重编程成功率; 4) 不同样本所需重编程时间不同, 一般情况下电转后一周可以见集落出现, 两周可以见成熟 iPSC 克隆, 但是根据不同情况重编程时间可能需要延长; 5) 在排除上述可能的原因后, 由样本个体差异导致的无法重编程很难找到原因并解决问题, 可以尝试其他重编程方法, 比如 Sendai Virus 等;
克隆死亡多, 不致密, 状态差	电转后细胞接种数目过多; MEF 饲养细胞死亡; 重编程时间不足; 低氧设备损坏。	1) 对新样本进行重编程, 如果条件允许, 电转后建议接种不同密度的细胞到 MEF 饲养细胞上, 最大可能获得 iPSC 克隆数目合适的状态; 2) 适当补充新鲜 MEF 饲养细胞; 3) 延长重编程时间; 4) 仔细检查低氧设备是否漏气, 更换新的设备; 5) 由于样本个体差异导致, 此为根源问题, 很难解决, 只能尽量挑取状态良好的克隆
克隆挑取后无法存活	重编程时间不足; Matrigel 培养板处理不规范; 样本个体差异导致 iPSC 不成熟或重编程不完全。	1) 待克隆足够大后再进行克隆挑取; 2) 每个样本挑取多个克隆, 有部分克隆死亡属于正常现象, 从多个存活克隆中选取状态良好的进行扩增培养; 3) 重新准备 Matrigel 处理的培养板, 或者挑取克隆到 MEF 饲养细胞上, 可以增加克隆存活率; 4) 由于样本个体差异导致的 iPSC 克隆难存活的问题很难解决, 可以尝试接种到 MEF 饲养细胞上培养, 或者需要有针对性的分析和研究其原因, 不能一概而论。



参考文献

1. Su RJ, Baylink DJ, Neises A, Kiroyan JB, Meng X, Payne KJ, Tschudy-Seney B, Duan Y, Appleby N, Kearns-Jonker M, Gridley DS, Wang J, Lau KHW, Zhang XB: Efficient generation of integration-free iPS cells from human adult peripheral blood using BCL-XL together with Yamanaka factors. PLoS One. 2013, 8(5): e64496. doi:10.1371/journal.pone.0064496.
2. Su RJ, Neises A, Zhang XB: Generation of iPS cells from human peripheral blood mononuclear cells using episomal vectors. Methods Mol Biol. 2016;1357:57-69. (Corresponding author)
3. Wen W#, Zhang JP#, Xu J#, Su RJ, Neises A, Ji GZ, Yuan W, Cheng T*, Zhang XB*. Enhanced generation of integration-free iPSCs from human adult peripheral blood mononuclear cells with an optimal combination of episomal vectors. Stem Cell Reports. 2016 Jun 14;6(6):873-84.
5. Wen W, Zhang JP, Chen W, Arakaki C, Li XL, Baylink D, Botimer GD, Xu J, Yuan W, Cheng T*, Zhang XB*. Generation of integration-free induced pluripotent stem cells from human peripheral blood mononuclear cells using episomal vectors. J Vis Exp. 2017 Jan 1;(119). doi: 10.3791/55091.



附录

附录一：培养皿的预包被

A. 用 Matrigel 包被培养器皿

- 1) 4 °C 融化 Matrigel 后，在冰上分装 270-350 uL/管，-20 °C 冻存。
- 2) 在使用 Matrigel 包被培养板时，将分装的每管 4 °C 融化后，用 25 mL DMEM/F12 培养液稀释混匀。
- 3) 6 孔培养板或者 35 mm 培养皿，用 1 mL 稀释的 Matrigel 室温包被 1 小时，使用前用 D-PBS 洗涤后即可使用培养人胚胎干细胞或者 hiPS 细胞。推荐包被体积见下表

培养器皿	稀释的 Matrigel 体积
6 孔板	1 mL/孔
100 mm 培养皿	6 mL/培养皿
T-25 培养瓶	3 mL/瓶
T-75 培养瓶	8 mL/瓶

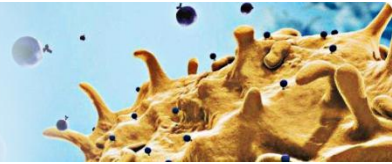
注意:

- a) Matrigel hESC-qualified Matrix 包被培养板时，Matrigel 需均匀铺开并完全覆盖培养板。否则在 Matrigel 包被不完全的地方，细胞将不能完全贴壁。为了避免包被不均匀，将涂过基质胶的培养板盖好以防止基质胶变干，并放置在室温 (15-25 °C) 超净台中 1 小时。如果急需使用，也可将培养板放在 37 °C 孵箱中 30 分钟。需确保超净台或孵箱的表面水平 (可使用气泡水平仪确认)，也不要将多个培养板叠放。
- b) 包被好的培养板可在 2-8 °C 保存最多一个星期 (需用 Parafilm™ 密封防止基质变干)，同时也要确保冰箱搁板表面水平。我们不建议使用局部包被不均匀或因保存不当而导致 Matrigel 变干的培养板。
- c) 融化冻存的 Matrigel 时请放置在 4 °C 冰箱过夜融化，在包被培养板的过程中也请放置在冰上操作，因 Matrigel 将在室温条件下形成固态胶。形成胶状的 Matrigel 可以放置在 4 °C 24-48 小时后重新转变成液体状态。

B. 用 Vitronectin 包被培养器皿

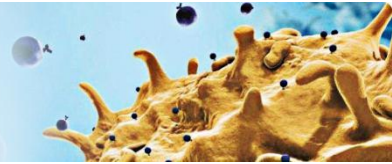
- 1) 在 Vitronectin 稀释缓冲液 (货号 #VDB-200) 中溶解 animal free-Vitronectin (human) (货号 # VTN-500)，使其终浓度达到 0.5 mg/mL (即：在管中加 1mL Vitronectin 稀释缓冲液配置母液)，使用前，将 Vitronectin 用稀释液稀释至 5 µg/mL。
- 2) 轻混合稀释的 Vitronectin，不要旋涡振荡。
- 3) 立即用稀释的 Vitronectin 包被非组织处理的培养皿。推荐包被体积见下表。

培养器皿*	稀释的包被基质体积
6 孔板	1 mL/孔
100 mm 培养皿	6 mL/培养皿
T-25 cm ² 培养瓶	3 mL/瓶
T-75 cm ² 培养瓶	8 mL/瓶



***应用 Vitronectin 包被培养皿时，要应用非组织处理培养皿**

- 4) 轻轻前后转动培养器皿，以使 Vitronectin 溶液均匀地分布在表面上。
注意：如果培养器皿表面未完全被 Vitronectin 溶液包被，则不应将其用于 hPSC 的培养。
- 5) 在使用前至少提前 1 小时于室温 (15-25 °C) 下进行孵育。避免 Vitronectin 溶液的蒸发。
注意：如果不立即使用，则必须将培养器皿进行密封 (如：使用 Parafilm® 封口膜)，以防止 Vitronectin 溶液的蒸发。包被后的皿可在 2-8 °C 下保存长达 1 周。在进行下一个步骤前，将保存过的包被培养器皿在室温 (15 - 25 °C) 下放置 30 分钟。
- 6) 轻轻将培养皿向一侧倾斜，让多余的 Vitronectin 溶液集中到边缘处。用一次性移液管或吸引器移除多余的溶液，确保包被表面不被划到。
- 7) 使用 Vitronectin 稀释缓冲液冲洗一次培养皿 (如 6 孔培养板，则添加 2 mL/孔)。
- 8) 吸出冲洗溶液并添加 iPS 维持培养基 (如 6 孔培养板，则添加 2 mL/孔) 继续后续实验。



附录二：MEF 滋养层细胞的制备

A. MEF 滋养层细胞的制备

试剂:

MEF 培养基: DMEM/High Glucose+10% FBS+1×Penicillin-Streptomycin;

细胞消化酶: 0.05% Trypsin EDTA;

丝裂霉素: Mytomycin C (工作浓度: 10µg/mL)

1×冻存液: (FBS 90%, DMSO 10%)

1) 取孕期 13.5 天的孕鼠处死, 浸泡在 75%乙醇中约 6-8 分钟。

以下步骤均在生物安全柜超净台中严格操作。

2) 将小鼠分层解剖, 从子宫中剥离取出胎鼠, 放置在灭菌的玻璃平皿中, 用 PBS 洗涤三次, 准确计数胚胎个数。

3) 去除 2/3 头和所有内脏组织, 转移至新的 50 mL 离心管中, 将组织剪碎至 1-3mm 以下的碎块, 最好成泥状。

4) 加 0.05%胰酶+EDTA (0.05% TE) 5 mL, 放至 37 °C 水浴锅 10-20 分钟, 每隔五分钟轻轻晃动, 使之充分消化。

5) 加 20 mL MEF 扩增培养基终止消化, 70 µm 筛网过滤去除未消化的组织, 200×g 离心 5 分钟收集细胞。

6) 弃上清, 加适量 MEF 扩增培养基, 反复吹打重悬细胞。

7) 将细胞悬液分装到 T-75 培养瓶中, 每瓶添加 10-12 mL MEF 扩增培养基, 于 CO₂ 培养箱中培养 2 至 3 天。

注意: MEF 细胞贴壁速度比较快, 要迅速操作。一般每 3 个胚胎可以接种到一个 T-75 的培养瓶中。

8) 待细胞生长密度达到 80~90%时, 常规消化传代, 继续于 CO₂ 培养箱中培养 2 至 3 天。此步骤可将细胞冻存, 以备日后使用。

9) 细胞传至第三代, 待生长密度达到 80~90%时, 用丝裂霉素 C (Mytomycin C, 10 µg/ml) 37 °C 处理三小时后, PBS 洗涤三次, 完全去除丝裂霉素 C。

10) 常规消化处理后, 添加适量 MEF 扩增培养基终止细胞消化, 收集细胞到 50 mL 离心管中并计数。

11) 细胞悬液 200×g 离心 5 分钟, 收集细胞。

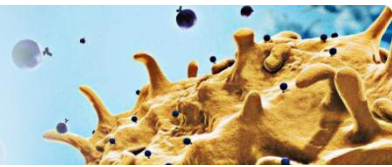
12) 弃上清, 添加适量冻存液重悬, 按一定数目进行细胞冻存。

注意: 一般情况下, 1.5~2×10⁶ 个细胞冻存一支可以复苏到 6 孔板的 6 个孔。

B. 明胶包被培养器皿

1) 用 0.1%明胶 (Gelatin)溶液覆盖培养器皿的整个表面, 并将器皿放置在 37 °C 下孵育 30 分钟或在室温下孵育 2 小时。

2) 在接种细胞之前, 轻轻将培养器皿向一侧倾斜, 让多余的明胶溶液汇集到边缘处, 用移液器吸除多余的



溶液，确保涂层的表面不被划到。

3) 包被的培养器皿在细胞培养之前，用 D-PBS 洗涤一次，去除残留的明胶液体。

C. 制备含 MEF 滋养层细胞的培养器皿

复苏 MEF 滋养层细胞，加入 2 mL 提前室温 (15 ~ 25 °C) 预温的 MEF 培养基，充分混匀，接种到已用明胶包被处理的 6 孔板中，放置 CO₂ 培养箱中培养过夜。

注意：根据具体实验需求安排复苏时间和接种浓度。