

# 重编程试剂盒

## Episomal iPSC Reprogramming Kit

货 号: 611005 5 次  
611010 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。

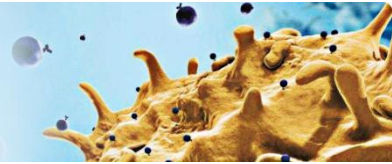
Episomal iPSC Reprogramming Kit 是一种高效的非基因插入整合型重编程系统, 可将体细胞重编程为诱导多能干细胞 (Induced pluripotent stem cells, iPSCs)。其利用多能性因子 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc 的非整合型质粒载体诱导体细胞生成无外源基因插入整合的 iPSCs, 对于重编程难度较大的悬浮细胞, 如外周血单个核细胞 (Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs), 此系统重编程效率较高。。

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。



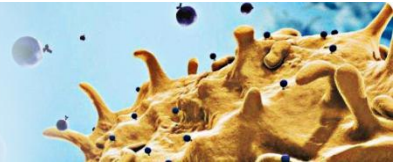
Precision BioMedicals Co., Ltd

金准生物医药科技(天津)有限公司

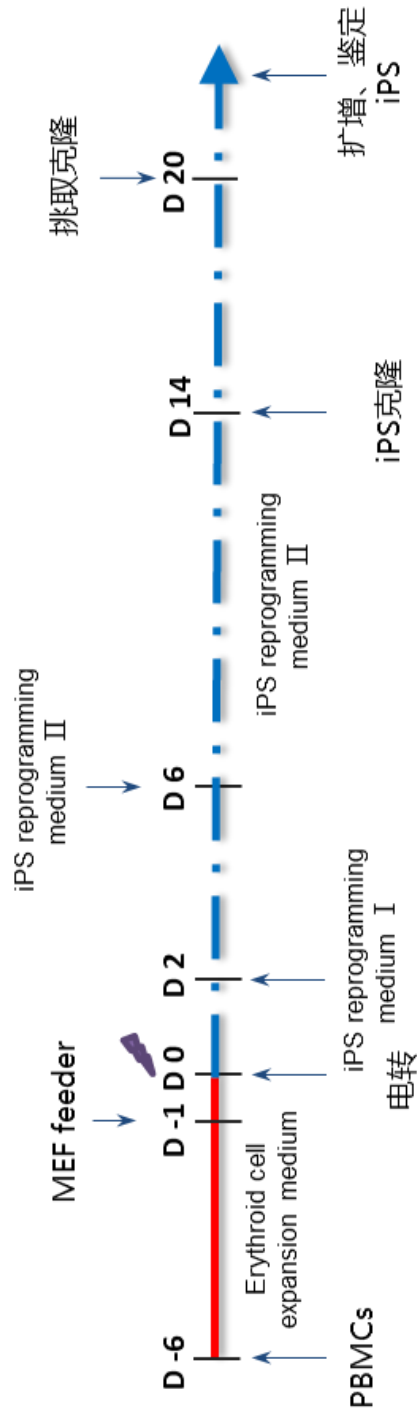


# 目 录

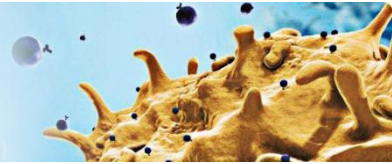
实验流程图: .....	1
<b>一、试剂、耗材和仪器准备 .....</b>	<b>2</b>
1.1 实验耗材 .....	2
1.2 实验试剂 .....	2
1.3 实验仪器 .....	3
<b>二、实验操作步骤 .....</b>	<b>4</b>
2.1 PBMCs 的分离 .....	4
2.2 PBMCs 的重编程 .....	4
2.3 iPSCs 细胞的挑取和扩增 .....	7
2.4 iPSCs 的鉴定 .....	7
2.5 iPSCs 传代、冻存、复苏 .....	12
<b>三、常见问题 .....</b>	<b>14</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>16</b>
<b>附录 .....</b>	<b>17</b>



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

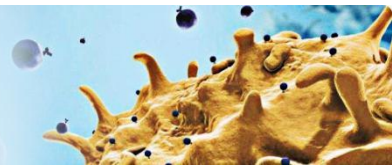
- 1) 血清移液管 (10 mL, 5 mL, 2 mL)
- 2) 枪头 (1 mL, 200 $\mu$ L, 20 $\mu$ L)
- 3) 密度梯度离心管 (SepTube™-50, PBM #601050, SepTube™-15, PBM #601015)
- 4) 离心管 (50 mL, 15 mL) (Corning)
- 5) Eppendorf 管 (1.5 mL) (Nuc)
- 6) CFU culture dish (35 mm) (PBM #501002)
- 7) 6 孔培养板 (Corning)
- 8) 0.22  $\mu$ m 无菌针头过滤器 (PBM #033022)
- 9) 分装管 (5 mL) (PBM #401003)

### 1.2 实验试剂

- 1) MEF 培养基:

成份	体积 (浓度)
DMEM (high glucose)	500 mL
FBS	10%
L-glutamine	1 $\times$
$\beta$ -mercaptoethanol	0.1 mM
Pen Strep	1 $\times$
经 0.22 $\mu$ m 滤器无菌过滤后, 放置 4°C 保存。	

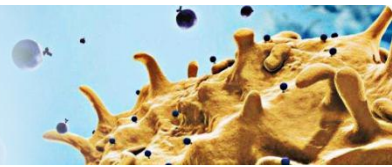
- 2) 红系培养基:  
HapClut™ Erythroid cell expansion medium (PBM #631050, 用于分离的 PBMCs 细胞培养)
- 3) iPS 重编程培养基:  
HapClut™ iPS reprogramming medium I (PBM #621050)  
HapClut™ iPS reprogramming medium II (PBM #624050)
- 4) NaBu (PBM#209010) (1000 $\times$ )
- 5) BMP4 (PeproTech #120-05)
- 6) Matrigel (Corning #354277)、Vitronectin (PBM # VTN-500)
- 7) iPS 维持培养基: HapClut™ iPS Culture medium: (PBM #622050)
- 8) MEF 细胞 (经丝裂霉素处理) (NovoBiotec #904410)
- 9) 0.1% BSA (PBM#212010)
- 10) HapClut™ D-PBS (PBM #201001)
- 11) 0.5 mM EDTA (PBM #205010)
- 12) Accutase (eBioscience #00-4555-56)



- 13) HapClut™ 0.1% Gelatin (PBM #211050)
- 14) Nucleofector™ Kits CD34 cell solution (Lonza, #VPA-1003) 或 P3 solution and the human CD34 cell
- 15) Y27632 (PBM#215010)
- 16) HapClut™ Glutamine (100×) (PBM #214010)
- 17) HapClut™ Penicillin-Streptomycin (PBM #213010)
- 18) iPSC 早期细胞冻存液: PSCs Freezing medium (PBM #641010)

### 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
- 5) 低氧培养盒(PBM #504001)
- 6) 电转仪 Nucleofector II (Lonza) 或者 4D Nucleofector System (Lonza)
- 7) 移液器
- 8) 4~8 °C 冰箱
- 9) -20 °C 冰箱
- 10) -80 °C 冰箱
- 11) 异丙醇冻存盒
- 12) 液氮罐
- 13) 水浴锅



## 二、实验操作步骤

### 2.1 PBMCs 的分离

确保血液样本、D-PBS、淋巴细胞分离液和离心机处于室温(15 - 25 °C),应用 SepTube®分离 PBMCs。将淋巴细胞分离液通过隔板中心的孔注入 SepTube®底部。注入分离液的体积请参考下表。

SepTube®	起始样本体积 (mL)	密度梯度分离液 (mL)
15	0.5-5	4.5
50	4-17	15

- 1) 抗凝血用等体积 D-PBS 稀释, 混合均匀。如: 5 mL 抗凝血用 5 mL D-PBS 稀释。
- 2) 保持 SepTub®管垂直, 通过血清移液管将稀释的样品沿管壁加入管中。样品将会和隔板上方的分离液混合, 但不会影响分离效果。

*注: 样品也可以直接倒入 SepTub®管中, 但要小心避免样品通过隔板中央的小孔直接进入隔板下方的分离液中。*

- 3) 在开启离心机制动器的情况下, 室温 1200×g 离心 10 分钟。

*注: 如果样品在体外超过 24 小时以上, 建议离心 20 分钟以上。*

- 4) 离心完成后, 可以将最上层不含细胞的 D-PBS 稀释液吸出弃掉, 或者直接将包含 MNCs 的上层稀释液直接倒入新的无菌离心管中。不要将 SepTub®管保持在倒置状态超过 2 秒, 避免底层的红细胞倒出。

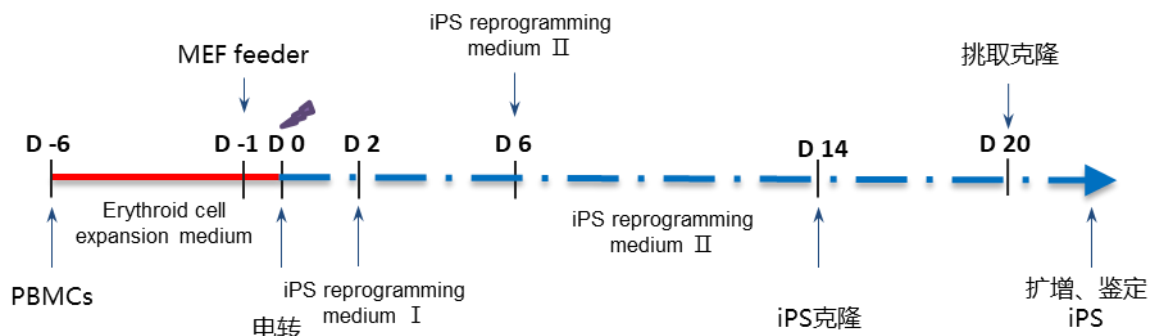
*注: 离心后, SepTub®隔板上表面可能存在少量红细胞, 但这些少量的红细胞不会影响下游的实验和细胞分离效果。如果 SepTub®隔板上表面发现有较多的红细胞, 可能是由于采血时间较长引起的, 此时可以继续 1200×g 离心 10 分钟, 以减少红细胞的存在。*

- 5) 向分离的 MNCs 中添加 0.5-1 倍体积 D-PBS (2 μM EDTA) +2% FBS, 混合均匀后取少量细胞计数; 其它剩余细胞室温 300×g 离心 8 分钟, 进行洗涤细胞。

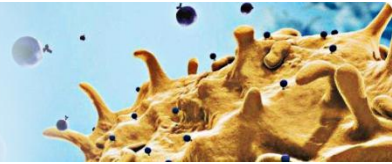
*注: 为去除分离 MNCs 中的血小板, 可以关闭离心机制动器, 室温 120×g 离心 10 分钟洗涤 MNCs。*

- 6) 去掉上清液。用适量的细胞冻存液重悬细胞并冻存或用造血扩增培养基重悬细胞进行扩增培养和重编程实验。

### 2.2 PBMCs 的重编程



#### 2.2.1 PBMCs 的重编程(MEF 滋养层方案) (Fig. A)

**【Day -6~-1】: 扩增 PBMCs**

- 1) 将分离的 PBMCs 或冻存的 PBMCs 复苏, 转移至含 5 mL 扩增培养基的 15 mL 离心管中, 混合均匀并进行细胞计数。
- 2) 将细胞悬液以 1200 rpm 离心 5 分钟洗涤, 弃上清液后, 根据细胞计数结果用适量红系培养基 (PBM #631050) 重悬细胞, 调整细胞密度为  $1\sim 5\times 10^6/\text{mL}$ 。
- 3) 将混合均匀的 PBMCs 接种 2 mL 到 CFU culture dish (35 mm) 中,  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中  $37\text{ }^\circ\text{C}$  培养 3 天。
- 4) Day-3 天时, 吸出 1 mL 上清 (可离心收集上清中的细胞), 补加 2 mL 红系培养基 (PBM #631050), 放置在  $37\text{ }^\circ\text{C}$  培养箱中继续培养 2 天。

*注意: PBMCs 在培养过程中会先死亡一部分, 数目会有所下降, 再出现小幅度增殖, 最终细胞数约为复苏时的 30%-50%。*

**【Day -1】: MEF 滋养层细胞准备**

- 5) 提前 30 min 用 2 mL 0.1% gelatin 处理包被一个新的培养孔 (6 孔板), 放置在  $37\text{ }^\circ\text{C}$  培养箱 30 分钟; 同时 PBMCs 培养孔进行半量换液红系培养基 (PBM #631050)。
- 6) 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 2 mL MEF 培养基重悬细胞计数,  $3\sim 5\times 10^5$  细胞/孔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 (见附录 2)。

**【Day 0】: 转染细胞**

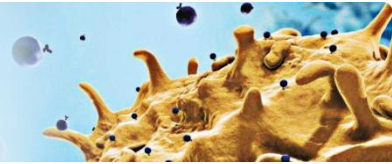
**温和处理细胞对于重编程的成功是必不可少的。**

- 7) 在转染细胞前, 提前 30 min 将 MEF 细胞的培养基更换为 1.5 mL 红系培养基 (PBM #631050), 放置于  $37\text{ }^\circ\text{C}$  培养箱预温备用。
- 8) 75%酒精消毒低氧盒, 放入超净台备用。
- 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, 收集试剂到管底部。
- 10) 配制 Human Stem Cell Nucleofactor Kit 电转液 (见下表), 并充分混合均匀。

名称	体积数量
Human Stem Cell Nucleofactor <sup>®</sup> Solution	57 $\mu\text{L}$
Supplement 1	13 $\mu\text{L}$
Episomal iPSC Reprogramming Kit	4 $\mu\text{L}$

- 11) 将扩增的 PBMC 混合均匀, 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  $2\times 10^6$  PBMCs 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  $\mu\text{L}$  上清液用 200  $\mu\text{L}$  (Tip) 移液吸头移除。
- 14) 将细胞重悬于配制好的电转液中。

*注意: 混匀时用手指轻弹管底部 3-5 次, 使细胞重新悬浮在电转液中。*



15) 将细胞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 U008 程序(也根据说明书要求操作选择相应的程序, 利用试剂盒配备的耗材), 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, 将无菌电转杯放置 37 °C 培养箱 5 分钟, 随后立即将细胞转移至含有 MEF 滋养层细胞和红细胞培养基 (PBM #631050) 的培养孔中 (已提前预温至 37 °C), 并清洗电转杯 1-2 次。

*注意: 将细胞逐滴加入孔中, 使之均匀分布; 将电转杯在 37°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。为提高细胞贴壁效率, 可以在细胞接种后将细胞培养板室温 300rpm 离心 30 分钟。*

18) 将细胞培养板放置于已消毒处理的低氧培养盒中; 密封低氧培养盒, 同时保持出气口和进气口处于开放状态; 打开低氧限压阀: 当流速稳定在 30 L/min 时, 连接低氧盒, 在充入低氧气体 (3% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 92% N<sub>2</sub>) 2 分钟后, 依次关闭低氧阀门、进气口、出气口 (*注意关闭的顺序, 先关闭低氧阀门, 进气口*), 将低氧盒放置在 37 °C 培养箱中低氧培养 2 天。

#### 【Day 2】: 添加 HapClut™ iPS reprogramming medium I

19) 在原有的培养基中每孔添加 2 mL iPS reprogramming medium I (37°C 预温) (不除去原有培养基), 同时添加 1× NaBu, 继续放置低氧盒中, 37 °C 培养箱中低氧培养 2 天。

#### 【Day 4】: 更换新鲜 HapClut™ iPS reprogramming medium I

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 iPS 重编程培养基 I (37°C 预温) 并添加 NaBu (1×), 继续放到低氧盒中 37 °C 低氧培养 2 天。

*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(500μL), 防止换液时孔内液体蒸发影响细胞状态或影响细胞贴壁。添加的 NaBu (1×) 可先在离心管中和新鲜培养基混合均匀后一起更换新鲜培养基。*

#### 【Day 5 ~ Day 14】: 添加 NaBu

21) 隔天换液, 将培养孔中旧的培养基去掉 (留有 300~500μL), 加入新鲜 2 mL 含 NaBu (1×) 的 iPS 重编程培养基 I (37°C 预温), 继续 37 °C 低氧培养, 直至出现克隆。

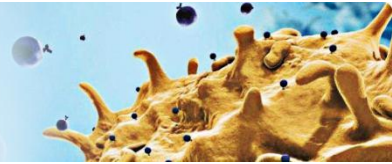
#### 【Day 9 ~ Day 14】: 更换 MEF-conditioned medium (MEF-CM) 培养基

22) 由于长时间培养, 失活的 MEF 细胞状态将变的不健康, 无法提供足够的支持条件, 细胞培养孔可在 MEF 细胞培养一周后更换 2mL MEF-CM。进行隔天换液, 直至克隆出现。或者向细胞培养孔中补充新的失活 MEF 细胞 (MEF 细胞复苏离心后用 HapClut™ iPS reprogramming medium I 重悬), 轻轻均匀接种 MEF 细胞, 以支持克隆的形成。

MEF-CM 制备: 复苏过夜培养的 MEF 细胞培养基更换为 HapCult™ iPS reprogramming medium I 培养一天, 第二天收集培养上清并更换新的 HapCult™ iPS reprogramming medium I, 如此每天换液继续培养并收集上清 5 天, 然后将收集的培养上清集中进行离心、过滤以去除细胞碎片, 分装 -20°C 冻存, 在使用前加入 bFGF 至终浓度为 50ng/mL。

#### 【Day 15 ~ Day 20】: 挑取克隆

23) 约在 14 天前, 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 培养基常规培养 iPSCs 即可。

**注意:** 当克隆足够大时, 比较适合挑取, 克隆成活率较高。

## 2.2.2 PBMCs 的重编程(无滋养层方案) (Fig. B)

### 【Day -6~-1】: 扩增 PBMCs

- 1) 将分离的 PBMCs 或冻存的 PBMCs 复苏, 转移至含 5 mL 扩增培养基的 15 mL 离心管中, 混合均匀并进行细胞计数。
- 2) 将细胞悬液以 1200 rpm 离心 5 分钟洗涤, 弃上清液后, 根据细胞计数结果用适量红系培养基 (PBM #631050) 重悬细胞, 调整细胞密度为  $1\sim5\times 10^6/\text{mL}$ 。
- 3) 将混合均匀的 PBMCs 接种 2 mL 到 CFU culture dish (35 mm) 中,  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中  $37^\circ\text{C}$  培养 3 天。
- 4) Day-3 天时, 吸出 1 mL 上清 (可离心收集上清中的细胞), 补加 2 mL 红系培养基 (PBM #631050), 放置在  $37^\circ\text{C}$  培养箱中继续培养 2 天。
- 5) Day-1 天时, 更换一半体积的红系培养基, 使得细胞在 Day 0 进行电转时生长处于最优状态。

**注意:** PBMCs 在培养过程中会先死亡一部分, 数目会有所下降, 再出现小幅度增殖, 最终细胞数约为复苏时的 30%-50%。

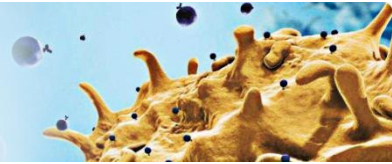
### 【Day 0】: 转染细胞

**温和处理细胞对于重编程的成功是必不可少的。**

- 6) 在转染细胞前, 提前 60 min 在 6 孔板中加入 1 ml Vitronectin (见附录 1) 包被培养孔 1 小时, 然后去除包被液, 加入红系培养基 1.5 ml, 在培养箱中平衡 30 分钟;
- 7) 75%酒精消毒低氧盒, 放入超净台备用。
- 8) 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, 收集试剂到管底部。
- 9) 配制 Human Stem Cell Nucleofactor Kit 电转液 (见下表), 并充分混合均匀。

名 称	体积数量
Human Stem Cell Nucleofactor <sup>®</sup> Solution	57 $\mu\text{L}$
Supplement 1	13 $\mu\text{L}$
Episomal iPSC Reprogramming Kit	4 $\mu\text{L}$

- 10) 将扩增的 PBMC 混合均匀, 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。
- 11) 将  $2\times 10^6$  PBMCs 转移到 5 mL 分装管中,  $300\times g$  离心 5 分钟。
- 12) 小心吸出大部分上清液, 剩余约 100-200  $\mu\text{L}$  上清液用 200  $\mu\text{L}$  (Tip) 移液吸头移除。
- 13) 将细胞重悬于配制好的电转液中。  
**注意:** 混匀时用手指轻弹管底部 3-5 次, 使细胞重新悬浮在电转液中。
- 14) 将细胞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。



15) 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 U008 程序(也根据说明书要求操作选择相应的程序, 利用试剂盒配备的耗材), 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。*

16) 电转完成后, 从电转仪中取出电转杯, 将电转杯放置 37 °C 培养箱 5 分钟, 随后立即将细胞转移至平衡好的红系培养基中(已提前预温至 37 °C)培养, 并清洗电转杯 1-2 次。为促进细胞贴壁, 可室温 300rpm 离心 30 分钟。

*注意: 将电转杯在 37 °C 培养箱中放置 5 分钟可提高细胞活性和电转效率; 将细胞逐滴加入孔中, 使之均匀分布; 将使用后的电转杯 (视为危险生物废品) 丢弃。*

17) 将细胞培养板放置于已消毒处理的低氧培养盒中; 密封低氧培养盒, 同时保持出气口和进气口处于开放状态; 打开低氧限压阀: 当流速稳定在 30 L/min 时, 连接低氧盒, 在充入低氧气体 (3% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 92% N<sub>2</sub>) 2 分钟后, 依次关闭低氧阀门、进气口、出气口 (*注意关闭的顺序, 先关闭低氧阀门和进气口*)。将低氧培养盒放置在 37 °C 培养箱中低氧培养 2 天。

#### **【Day 2】: 添加 BMP4 培养基**

18) 在原有的培养基中每孔添加 2 mL BMP4 培养基(DMEM+1% 人白蛋白 (或 2% FBS) +10ng/mL BMP4+1×Glutamine) (不去除原有培养基), 同时添加 NaBu(1×) (根据细胞培养孔总体积计算), 继续放置低氧盒中密封, 37 °C 培养箱中低氧培养 1 天。

#### **【Day 3】: 半量更换新鲜 HapClut™ iPS reprogramming medium II**

(注意不要剧烈晃动培养皿, 以免贴壁的细胞飘浮起来)

19) 小心弃掉部分培养基 50%, 加入 2 ml HapClut™ iPS reprogramming medium II 培养基 (添加 NaBu(1×))。

#### **【Day 4】: 更换新鲜 HapClut™ iPS reprogramming medium II**

20) 弃掉上清培养基, 更换 2 ml HapClut™ iPS reprogramming medium II 培养基 (添加 NaBu(1×)), 继续放到低氧盒中继续 37 °C 低氧培养 2 天。

*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 (500~300μL), 防止换液时孔内液体蒸发影响细胞状态或影响细胞贴壁。*

#### **【Day 6 ~ Day14】: 添加 NaBu**

21) Day 6 及以后, 隔天更换 2 ml HapClut™ iPS reprogramming medium II (添加 NaBu(1×)至克隆形成), 每次操作后均需充入低氧气体在低氧条件下 37 °C 低氧培养, 直至出现克隆。

#### **【Day 15 ~ Day 20】: 挑取克隆**

22) 约在 14 天前, 在显微镜下可见一定数量的克隆出现, 此时培养基更换成 HapCult™ iPS culture medium 培养基常规培养 iPSCs 即可。

*注意: 当克隆足够大时, 肉眼观察可见, 比较适合挑取, 克隆成活率较高。*

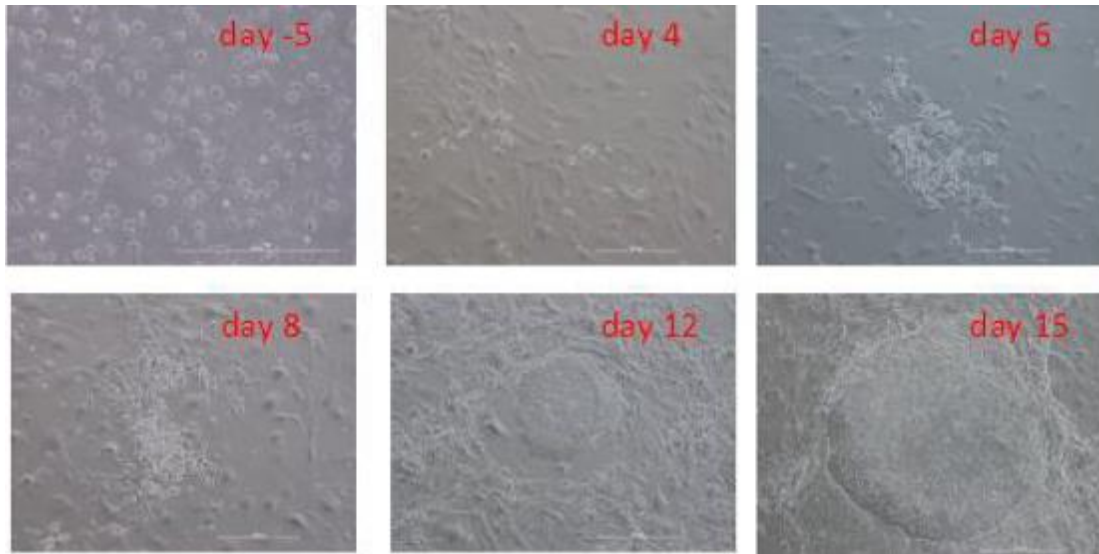
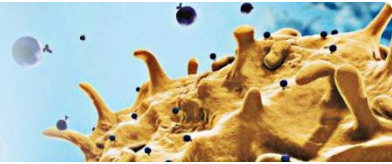


Fig.A PBMCs 重编程 iPSCs 过程中不同时间点细胞形态图 (带滋养层细胞)

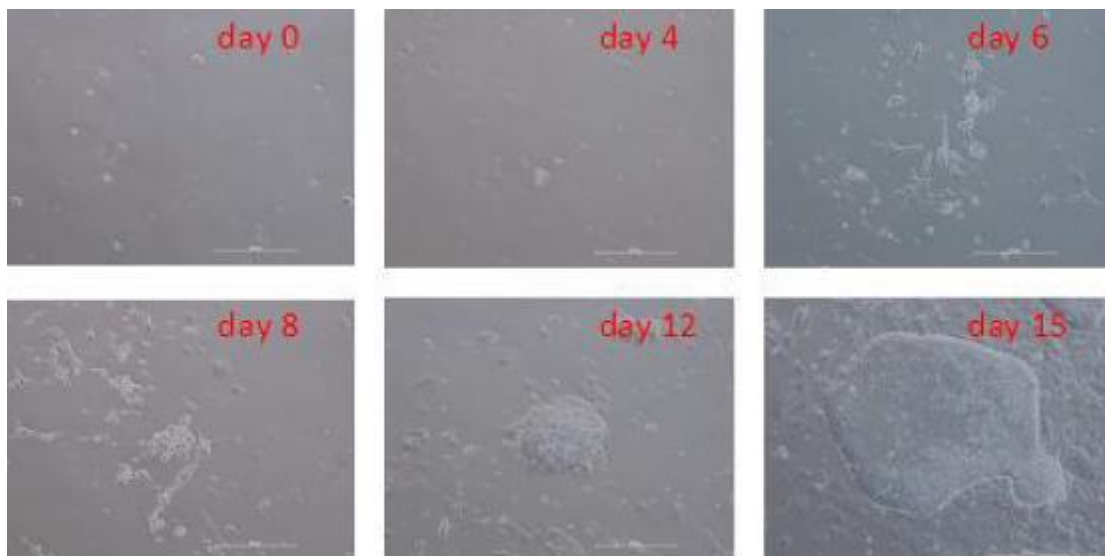


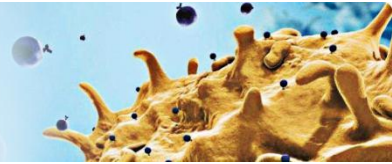
Fig.B PBMCs 重编程 iPSC 过程中不同时间点细胞形态图 (无滋养层细胞)

### 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 HapCult™ iPS culture medium 培养基和已包被的培养皿。
- 2) 提前一天准备 MEF 包被培养板或 Matrigel/Vitronectin 包被培养板 (见附录)。
- 3) 将含有重编程细胞的培养板置于倒置显微镜下, 并在 10×放大倍数下观察 iPS 克隆 (也可以等到克隆足够大, 用肉眼可见时直接挑取单克隆)。
- 4) 使用装有 200μL 或 20 μL (Tip) 吸头的移液器, 将 iPS 克隆划成小块。

仅供研究使用, 不可用于治疗或诊断。

- 11 -



- 5) 用 200  $\mu\text{L}$ (Tip)吸头刮擦并吸取克隆碎块到无菌 1.5mL EP 离心管中。
- 6) 向 1.5mL 离心管中加入等体积的 Accutase (#00-4555-56) 消化克隆细胞团, 使得刮划的大细胞团块变成小而均匀细胞团 (5~50 细胞/团)。
- 7) 将小细胞团接种到预先准备的 MEF 上或 Matrigel/ Vitronetin 包被的培养孔中 (含有 HapCult™ iPS culture medium 培养基的 12 孔板, 添加 Y-27632 至终浓度  $10\mu\text{M}$ ) 放置于  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。  
*注意: 为了促进 iPS 细胞团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  $10\mu\text{M}$ , 24 小时后用不含小分子抑制剂的培养基换液。*
- 8) 当细胞克隆生长到足够大时 (大约 4~6 天) 可以进行传代培养(Fig. C); 吸走培养液, 加入 0.5~1mL  $0.5 \times$  Accutase (#00-4555-56) (D-PBS 等体积稀释) 消化细胞 2~4 分钟。或者加入 1 mL  $37^\circ\text{C}$  水浴预温的 0.5 mM EDTA, 消化 5-6 分钟。
- 9) 显微镜下观察, 待细胞克隆边缘翘起, 细胞之间连接松散时, 吸走 EDTA 或 Accutase (#00-4555-56), 用 1 mL 含 Y-27632 ( $10\mu\text{M}$ ) 的 HapCult™ iPS culture medium 培养基轻柔吹打半贴壁的细胞, 根据细胞克隆多少按 1:5 至 1:10 比例传代至新的已准备的细胞培养孔中, 放置  $\text{CO}_2$  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, 不要把细胞吹打成单细胞。*
- 10) 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。

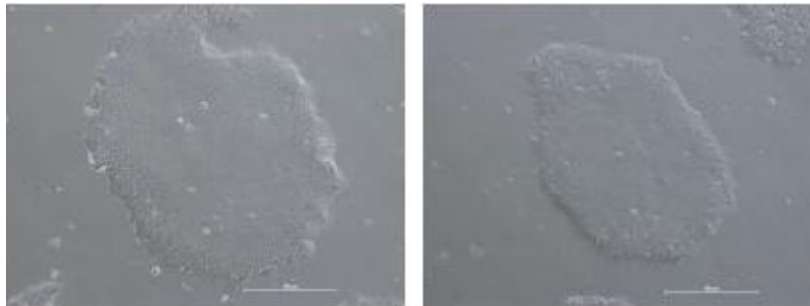


Fig.C iPSC 在 Matrigel 上培养形态图

## 2.4 iPSCs 的鉴定

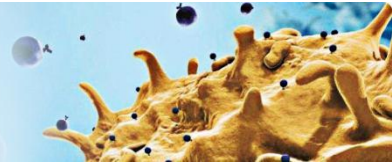
### A. 碱性磷酸酶 (Alkaline Phosphatase, AP) 染色

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 未提供的试剂需要实验室准备:  
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 hESCs 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, 未分化的灵长类 ES 细胞以及人的 hECs 和 hiPSCs 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和自我更新的能力。

### 试剂准备:

D-PBS (PBM # PBM #201001); 4%PFA (PBM # 421005); Triton X-100 (PBM # 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 (PBM #425010)  
抗淬灭剂 (PBM #424010)  
50%甘油 (PBM #642010)

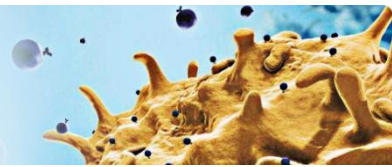
### 实验步骤:

#### 【Day 0】

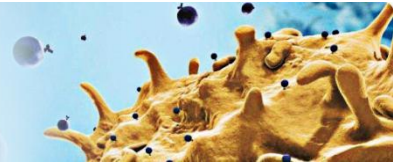
- 1) 将圆盖玻片在工业乙醇中浸泡消毒, 用镊子轻轻夹起在酒精灯上灼烧 1 秒, 待火焰熄灭冷却后, 轻轻放于 24 孔板中。
- 2) 加入 0.1% gelatin, 37 °C 包被 30 分钟, 复苏 MEF 饲养细胞, 第二天即可使用; 或者用稀释的 matrigel 处理, 室温包被 1 小时后, 即可使用, 或放入 4 度冰箱避光保存, 一周内使用 (见附录: 培养皿包被)

#### 【Day 1】

- 3) 传代 iPS 细胞, 细胞接种数目要适当少于常规扩增传代培养, 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) 吸出培养基, 用 D-PBS 洗涤 1~2 次, 加入 4% PFA 室温固定 30 分钟。
  - 5) 抗体标记核内蛋白 (如 NANOG OCT4) (根据抗体说明书稀释并标记), D-PBS 洗涤 15 分钟×3 次, PBST (PBS 加 0.1% Triton X-100) 洗涤 20 分钟×3 次。
  - 6) 抗体标记细胞膜表面蛋白 (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 μL 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:

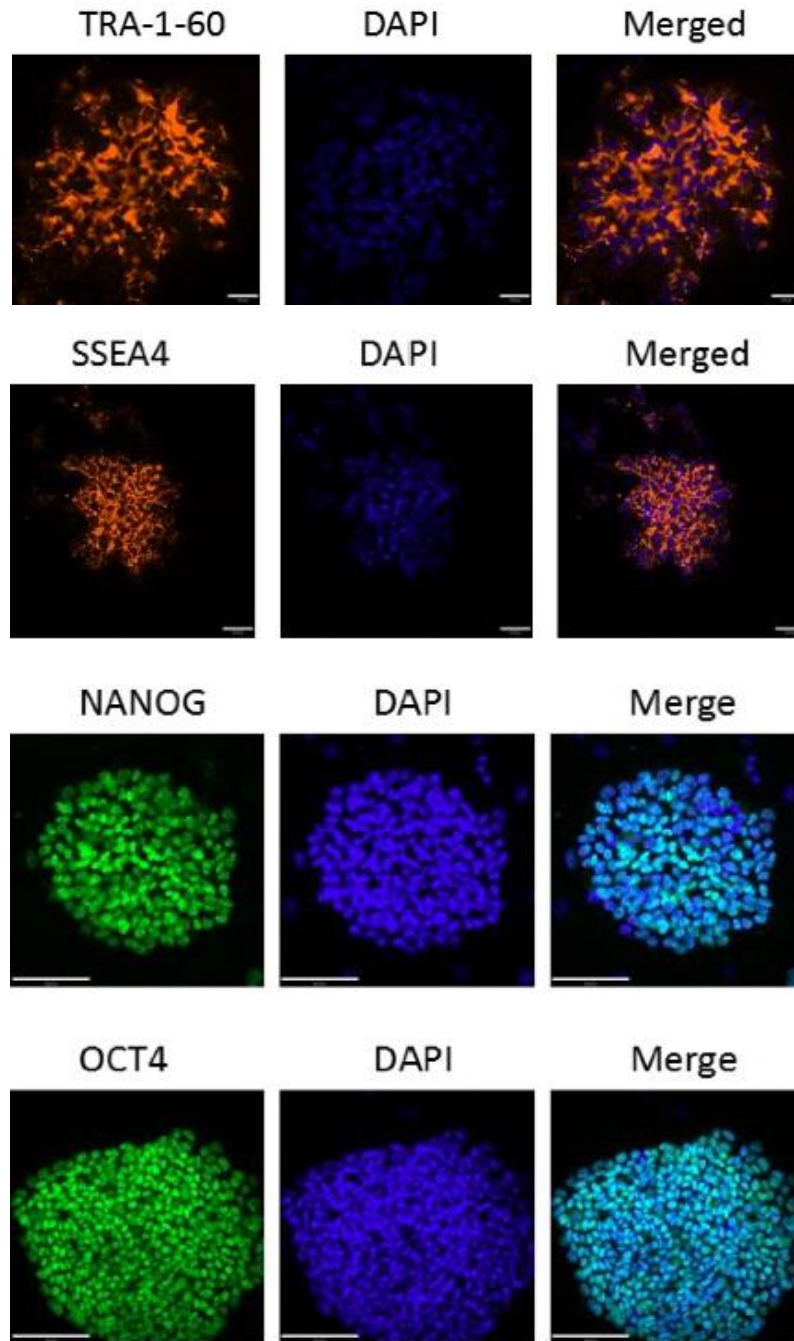


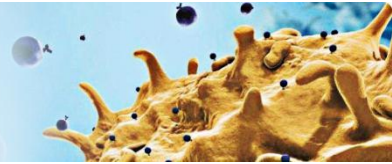
Fig.D iPSC 免疫荧光染色 (TRA-1-60, SSEA4, NANOG, OCT4, DAPI) 结果

### 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金标准, 而对于 hESCs, 由于伦理的原因这种实验是被明确禁止的。然而成年小鼠含有

仅供研究使用, 不可用于治疗或诊断。

- 15 -



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 培养基、PBS、高浓度 Matrigel、NOD/SCID 小鼠、4%PFA

#### 器材准备:

细胞培养皿(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 种于细胞培养皿 (10 cm)，待细胞生长至面积达 80~90%左右。
- 2) 用 Cell Scraper (细胞刮) 将细胞全部刮离细胞培养皿或者 0.5× Accutase (#00-4555-56) 消化细胞，收集于 50 mL 离心管中。
- 3) 用 PBS 冲洗培养皿一遍，将细胞全部转移至 50 mL 离心管中，大约  $5 \times 10^6$  细胞。
- 4) 离心，200×g，5 分钟，弃上清。
- 5) 每  $1 \sim 2 \times 10^6$  细胞用 200  $\mu$ L 高浓度 (DMEM/F12 培养基 1:1 稀释) Matrigel (冰上) 重悬，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中。
- 6) 将细胞悬液注射至 5~6 周的 NOD/SCID 小鼠大腿肌肉中，每个位点至少注射  $10^6$  细胞 (200 $\mu$ L)。
- 7) 接种细胞 8 周左右以后，小鼠大腿处有肿块形成，剥开后可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:

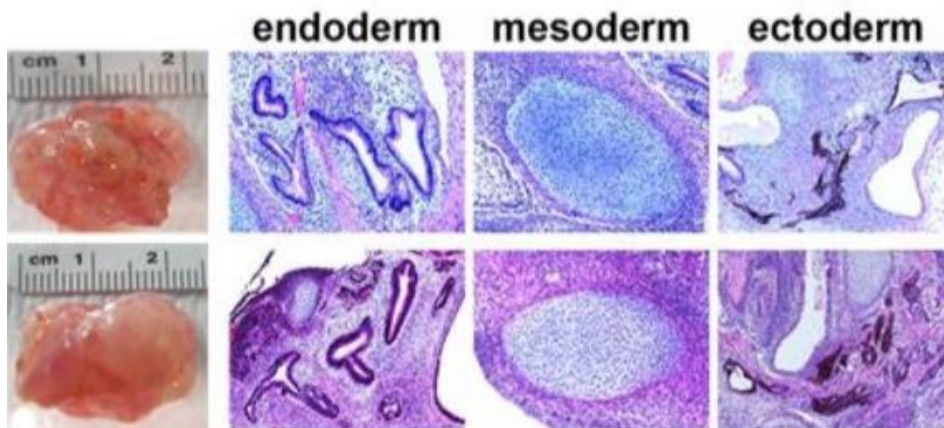
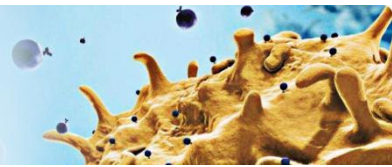


Fig.5 iPSC 注射免疫缺陷小鼠 8 周畸胎瘤(左 1)和三胚层 H.E.染色结果(左 2, 右 1, 右 2)



## 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:

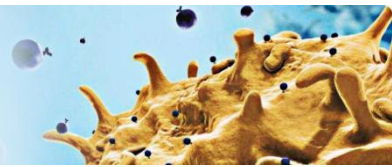
- 1) 准备 37 °C 水浴，提前包被培养孔（见附录一），并在 15 mL 离心管中加入 5 mL 培养液备用。
- 2) 从液氮中取出细胞，迅速放入 37 °C 水浴中解冻；在水浴中不断摇晃冻存管，以便快速解冻，直至冻存细胞管仅含微小冰晶。
- 3) 在生物安全柜中，迅速将解冻的细胞转移到上述含培养基的离心管中，300×g 离心 5 分钟。（注意不要用 Tip 反复抽吸细胞悬液，避免将细胞团打散成为单细胞悬液）
- 4) 弃上清液，加入一定量含 Y27632（10μM）培养基轻轻重悬均匀，细胞不可用力反复吹打重悬，否则可能将细胞团打散成单细胞而降低其存活率。
- 5) 按一定比例（取决于细胞密度，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 含 Y27632（10μM）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/孔。培养的人多能干细胞每天更换新鲜培养基。更换新鲜培养基时要迅速，避免细胞表面干燥。

### 2.5.3 传代:

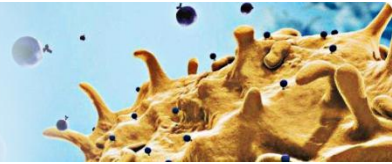
- 1) 提前包被细胞培养板或者培养皿用于细胞传代。（见附录一）
- 2) 当 hPSCs 在培养皿底部生长面积达 70%-90% 时或细胞克隆比较大，可以进行传代扩增培养。吸出培养上清液，加入 1mL 0.5×稀释的 Accutase (#00-4555-56)（D-PBS 等体积稀释）消化细胞 2~4 分钟或加入 37 °C 水浴预温的 1mL 0.5 mM EDTA 消化 5 分钟左右。



- 3)显微镜下观察,待细胞克隆边缘翘起,细胞之间连接松散时,吸走消化液。
- 4)用1 mL HapCult™ iPS culture medium 含 Y27632 (10 $\mu$ M) 培养基轻轻吹打贴壁的细胞克隆,使其分散成数个至数十个细胞的细胞团,不要把细胞吹散成单细胞,可以在显微镜下观察。
- 5)根据细胞克隆多少按 1:5 至 1:10 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 $\mu$ 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:

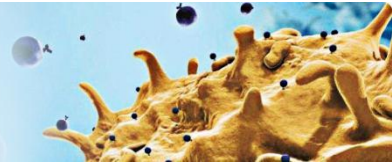
- 1)当 hPSCs 在培养皿底部生长面积达 70%-90%或细胞克隆比较大时,吸出培养上清液,加入 1mL 0.5 $\times$  稀释的 Accutase (#00-4555-56) (D-PBS 等体积稀释)消化细胞 2-4 分钟或加入 37  $^{\circ}$ C 水浴预温的 1mL 0.5 mM EDTA 消化 5 分钟左右;
- 2)细胞消化后(同传代),收集细胞团到离心管中,300g 离心 5-8 分钟;
- 3)去掉上清,用预冷的 iPS 早期冻存液重悬细胞,细胞团不需要过度吹打,避免形成单细胞状态降低细胞存活率。加入冻存液的细胞迅速分装到冻存管中,做好标记:注明细胞克隆名称、代数、日期和操作人员姓名;
- 4)将含有细胞的冻存管迅速放到冻存盒(处于室温)中于-80  $^{\circ}$ C 冰箱梯度降温,第二天转入液氮中长期保存。



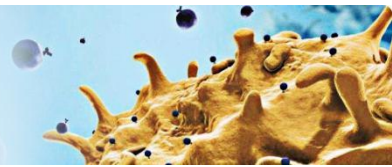
### 三、常见问题

由于不同个体来源的 PBMCs 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客观因素的影响,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,细胞密度至少应为 $10^6$ /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 $2 \times 10^5$ 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;
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 <sup>+</sup> 比例过低;电转后细胞接种数目过少;重编程时间不足;样本个体差异。	1) 一般情况下,经红系培养基培养 6 天后,CD34 <sup>+</sup> 比例应大于 1%,如果过低,则可能影响重编程效率; 2) 质粒应避免反复冻融,可以经过电泳检查质粒完整性,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,可以尝试接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

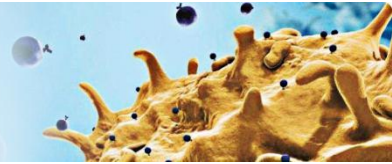


问题	可能原因	解决方案
		<p>见集落出现，两周可以见成熟 iPSC 克隆，但是根据不同情况重编程时间可能需要延长；</p> <p>5) 在排除上述可能的原因后，由样本个体差异导致的无法重编程很难找到原因并解决问题，可以尝试其他重编程方法，比如 Sendai Virus 等；</p>
克隆死亡多，不致密，状态差	电转后细胞接种数目过多；MEF 饲养细胞死亡；重编程时间不足；低氧设备损坏。	<p>1) 对新样本进行重编程，如果条件允许，电转后建议接种不同密度的细胞到 MEF 饲养细胞上，最大可能获得 iPSC 克隆数目合适的状态；</p> <p>2) 适当补充新鲜 MEF 饲养细胞；</p> <p>3) 延长重编程时间；</p> <p>4) 仔细检查低氧设备是否漏气，更换新的设备；</p> <p>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</p>
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。	<p>1) 待克隆足够大后再进行克隆挑取；</p> <p>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；</p> <p>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；</p> <p>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。</p>



## 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。(注意必须在冰上操作)
- 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 洗涤后即可用于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干燥，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 保存最多一周 (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

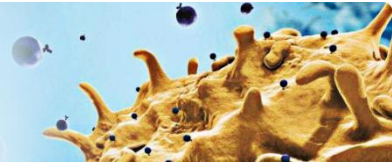
- 1) 在 Vitronectin 稀释缓冲液 (货号 #VDB-200) 中溶解 animal free-Vitronectin (human) (货号 # VTN-500)，使其终浓度达到 0.5 mg/mL (即：在管中加 1 mL Vitronectin 稀释缓冲液配置母液)，使用前，将 Vitronectin 用稀释液稀释至 5 µg/mL。
- 2) 轻混合稀释的 Vitronectin，不要旋涡振荡。
- 3) 立即用稀释的 Vitronectin 包被非组织处理的培养皿。推荐包被体积见下表。

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 <sup>2</sup> 培养瓶	3 mL/瓶
T-75 cm <sup>2</sup> 培养瓶	8 mL/瓶

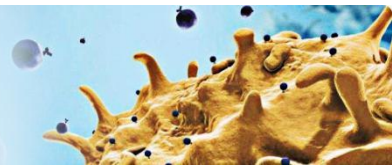
\*应用 Vitronectin 包被培养皿时，要应用非组织处理培养皿

仅供研究使用，不可用于治疗或诊断。

- 22 -



- 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, 离心洗涤 2~3 次。

4) 将组织剪碎至 1-3mm 以下的碎块, 最好成泥状。

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

6) 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。

7) 弃上清, 加适量 MEF 扩增培养基, 重悬细胞。

8) 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 CO<sub>2</sub> 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。*

9) 待细胞生长面积达到 80~90%时, 常规消化传代, 继续于 CO<sub>2</sub> 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。

10) 细胞传至第三代, 待生长面积达到 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。

11) 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。

12) 细胞悬液 200×g 离心 5 分钟, 收集细胞。

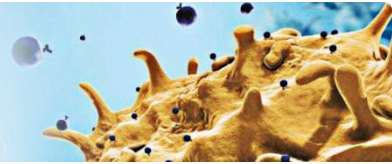
13) 弃上清, 添加适量冻存液重悬, 按一定数目进行细胞冻存。

*注意: 一般情况下, 1.5~2.5×10<sup>6</sup> 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)溶液覆盖细胞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。(一般对于 6-well Tissue-Treated 细胞培养板, 每孔加入 2mL)

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刮划到。



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

37°C 水浴复苏丝裂霉素 C 失活的 MEF 滋养层细胞; 离心去上清后, 加入 2 mL 提前室温 (15~25 °C) 预温的 MEF 培养基重悬细胞, 充分混匀后进行细胞计数; 根据细胞总数加入 MEF 培养基调整细胞密度为  $2 \times 10^5$ /mL $3 \sim 5 \times 10^5$  细胞/孔接种到已用明胶包被处理的 6 孔板中, 放置 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养过夜备用。

**注意:**

- a. 根据具体实验需求安排复苏时间和接种浓度。
- b. 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。
- c. 由于复苏冻存丝裂霉素 C 失活的 MEF 滋养层细胞时, 未知细胞状态是否良好, 建议以 3 种不同细胞数量接种细胞培养孔, 以便第二天接种新的细胞时, 可以选择处于较好的细胞状态的培养孔。