



hiPS 人誘導多能幹細胞 SOP

細胞名稱 Cell name	hiPS 人誘導多能幹細胞
貨號 NO.	DF-GMP-ZB11ALD-G-QX-22
描述 Description	<p>誘導性多能幹細胞 (Induced pluripotent stem cells , iPSCs) 技術是指通過導入特定的轉錄因子將終末分化的體細胞重編程為多能性幹細胞。iPS 細胞的出現，在幹細胞研究領域、表觀遺傳學研究領域以及生物醫學研究領域都引起了強烈的反響。</p> <p>採用仙台病毒介導的外源轉錄因子導入，將人臍帶血單核細胞誘導成 iPS 細胞。重編程轉錄因子：OCT4、SOX2、KLF4、MYC</p> <p>該細胞每管含有細胞數 $>5 \times 10^5$ cells/ml，此細胞通過免疫熒光染色驗證，經測試不含有 HIV-1、HBV、HCV、支原體、細菌、酵母和真菌。</p>
種屬 Species	人
性別 Gender	女
組織來源 Tissue	臍血來源
形態 Morphology	克隆狀
培養特性 Culture Properties	貼壁
安全性 Safety	所有腫瘤和病毒轉染的細胞均視為有潛在的生物危害性，必須在二級生物安全台內操作，並請注意防護
推薦培養試劑 Recommended culture reagent	<p>培養基名稱： mTeSR™1 basal Medium 貨號：85851 品牌：STEMCELL</p> <p>5X 補充劑名稱： mTeSR™1 5Xsupplement 貨號：85852 品牌：STEMCELL</p> <p>包被液名稱： Vitronectin (VTN-N) 貨號：A14700 品牌：Gibco™</p> <p>消化液名稱： ReLeSR™ 貨號：05872 品牌：STEMCELL</p> <p>ROCK1 抑制劑名稱：Y27632 貨號：72304 品牌：STEMCELL</p> <p>稀釋液： 不含鈣鎂的 DPBS (依賽洛森)</p> <p>溫度： 37°C</p> <p>氣相： 95% 空氣，5% 二氧化碳</p>
細胞復蘇 Cell Thawing	<ol style="list-style-type: none"> 六孔板事先包被好。操作：包被液 Vitronectin (VTN-N)100X，根據用量用不含鈣鎂的 DPBS 稀釋後每孔加 1-1.25ml 包被液，用封口膜封上，放 4 度冰箱過夜後使用。包被好的六孔板可以在 4 度冰箱存放 2 個星期，用之前 37 度回溫 (Note 1)。 配置完全培養基 (Note 2 和 Note 3) 按 1：4 比例混合，回溫。 取一個細胞凍存管 (Note 4)，一個細胞凍存管可復蘇六孔板的 1 個孔。 準備 4 毫升的 medium，加入 1 毫升細胞凍存液，1500rpm，3 分鐘。 準備復蘇專用培養基：全培養基 6mL 中加入終濃度是 10uM 的抑制劑 Y27632 (母液濃度為 10mM 時 1：1000 稀釋)，充分混勻。



	<p>6. 离心后去上清,加入复苏专用培养基 6ml,铺 3 个孔,第二天换成不加抑制剂 Y27632 的完全培养基 (Note 5)。</p> <p>每天换液 (Note 6 和 Note 7) : 细胞密度比较稀的时候每孔换液 1.5ml, 细胞密度较浓或培养基颜色变黄时, 每孔换液 2 毫升, 细胞密度很浓时每孔换液 3 毫升, 换液的时候吸旧培养基轻吹孔底 1-2 次, 完全吸走旧的培养基, 加入新的培养基。</p>
<p>传代 Subculturing</p>	<p>生长的细胞当克隆变得较大而与相邻的克隆开始融合时, 这时可进行传代。</p> <p>1.配置完全培养基 (Note 2 和 Note 3) : 培养基和 5X 补充剂按照体积比 4:1 的量混合, RT 回温。事先包被 6 孔板。</p> <p>2.吸掉完全 medium, 加入 1ml/孔的 ReleS, RT, 3 分钟。</p> <p>3.准备包被孔, 将包被液吸出, 加入 1.5ml 新鲜完全培养基。</p> <p>4.用从孔边缘吸掉 ReleS, 细胞仍然成片, 只是不贴附在孔底, 加入 1ml 的完全培养基, 吹匀吹散细胞, 吸取一定量的细胞液, 按照一定稀释比例加入到新包被好的装有新鲜完全培养基的孔中。加入细胞液后用枪立刻轻吹一次混匀, 防止细胞局部密度过于大。</p> <p>注: 稀释比例根据传的代数而定。 第一次传代 1:3, 第二次传代 1:6, 第三次传代 1:9, 第 4 次传代 1:12, 第 5 次传代 1:15</p> <p>5.每天换液: 细胞密度比较稀的时候每孔换液 1.5ml, 细胞密度较浓时每孔换液 2 毫升, 细胞密度很浓时每孔换液 3 毫升, 换液时吸旧培养基轻吹孔底 1-2 次, 吸走旧培养基和悬浮的死细胞, 加入新的培养基。</p>
<p>冻存</p>	<p>1. 吸掉完全 medium, 加入 1ml/孔的 ReleS, RT, 3 分钟;</p> <p>2. 洗掉所有 ReleS, 加入冻存液 (10%DMSO in FBS), 吹匀后 1 毫升/冻存管, -80 度冷冻保存。</p>
<p>保存 Storage</p>	<p>液氮存储</p>
<p>供应限制 Product Use</p>	<p>仅供研究之用</p>
<p>常见问题及解决方案 Questions and solutions</p>	<p>1.在收到细胞后先观察培养瓶是否破裂, 漏液等, 如遇到上述问题请及时拍照并与我们联系。</p> <p>2.贴壁细胞: 培养瓶不开封, 显微镜下检查细胞状态, 瓶口酒精擦拭后平躺放置在培养箱。1-2 小时后观察, 如细胞大部分又贴回瓶底, 表明细胞活力正常, 剩余少量漂浮的细胞可以去掉, 留 8-10ml 培养液培养观察, 细胞生长至汇合度到达 85%左右, 进行消化传代; 如细胞仍不贴壁, 将细胞离心收集转到新培养瓶, 原培养瓶加部分培养液继续培养, 注意观察。如细胞仍不能贴壁, 请用台盼蓝染色鉴定细胞活力, 并请及时拍照 (多倍数多视野), 包括染色照片, 并联系我们。 (以上仅为贴壁细胞处理方法)</p> <p>3.悬浮细胞: 培养瓶不开封, 显微镜下检查细胞状态, 瓶口酒精擦拭后平躺放置在培养箱。1-2 小时后观察, 将整瓶细胞及培养液分批离心 (1000rpm, 5min), 加入适量培养基, 根据离心后的细胞量进行放回培养或分瓶培养。 (以上仅为悬浮细胞处理方法)</p> <p>4.半悬细胞: 培养瓶不开封, 显微镜下检查细胞状态, 瓶口酒精擦拭后平躺放置在培养箱。1-2 小时后观察, 将整瓶细胞培养液上层悬浮细胞离心 (1000rpm, 5min), 重悬细胞后加入原培养瓶培养至传代。细胞数量较大, 可将贴壁细胞消化下来, 与上层悬浮细胞混匀传代。重悬上层悬浮细胞时必须保持下层贴壁细胞的营养条件, 防止贴壁细胞缺乏营养。 (以上仅为半悬细胞处理方法)</p> <p>如遇到细胞培养问题请及时拍照并与我们联系, 我们的技术人员会一直跟踪指导。</p>



常见问题及注意事项请参考以下附录内容。

附录：

Note1：包被好的六孔板严格要求回温时间要求在 30 分钟以上，但不要太久。如果回温时间不充分会导致**过多细胞飘起来不贴壁！**

Note 2：除非每次用量大，培养基用前请用 50ml 的离心管小量配置。整瓶配置导致每次回温慢温度不够，另外也会因为回温次数的增多损耗培养基的有效成分，导致后面细胞状态变差。

Note 3：回温时间要求在 30 分钟以上，但不要太久。会导致**过多细胞不贴壁飘起来！**

Note 4：在 37 度水浴中轻缓地晃动，冻存快有米粒大地时候既可取出。

Note 5：换液前请用旧培养液轻吹细胞两次，完全吸掉旧培养液，这样可以彻底地去掉死细胞碎片，死细胞碎片也是导致分化的原因之一。

Note 6：换液前严格回温 30 分钟以上（但不要太久）。回温不充分会容易导致死细胞增多！细胞出现分化！

Note 7：一定要每天换液！换液的时间间隔在 24 小时，误差不能太大，过久换液，死细胞增多且会出现**分化！！**

以下仅供参考

如遇细胞分化比较严重可进行如下操作：

多能性干细胞筛选

1. 在 hPSC 联会度处于 50-80%时可以使用 ReLeSR 进行多能性集落筛选，原理是倾向于分化或已经分化的集落的基质不能被 ReLeSR 酶解脱壁；
2. 准备室温保存的 ReLeSR，由 4 摄氏度恢复到室温的培养液，提前用 Matrigel 包被好的孔板；
3. 吸弃待筛选的 hPSC 孔内的培养液，加入适量体积的培养液清洗一次，加入 1 ml ReLeSR，室温静置计时约 50 秒，吸弃大部分 ReLeSR，此处应保留极少量的 ReLeSR 液体在孔内，使得其平放时可以在细胞表面形成一层液膜；
4. 将上述孔板置于 37 摄氏度培养箱内静置 5 ~ 8 分钟（对不同条件下培养的不同 hPSC 来说，有不同的最适孵育时间，第一次筛选需要做梯度实验确定，一般来说 5 分钟即可）；
5. 将上述孔板取出，加入 1 ml E8 培养液，左手持孔板一侧，右侧持续拍打孔板另一侧约 1 分钟（效果理想的话，拍打几下即可见到 hPSC 集落脱离孔板底部），收集脱离的 hPSC 集落，不要吹打；
6. 吸弃铺皿孔板中的液体，加入培养液，按照适宜的比例直接加入第 5 步中脱离皿底的干细胞集落（不需 ROCKi），摇匀后放入培养箱培养。

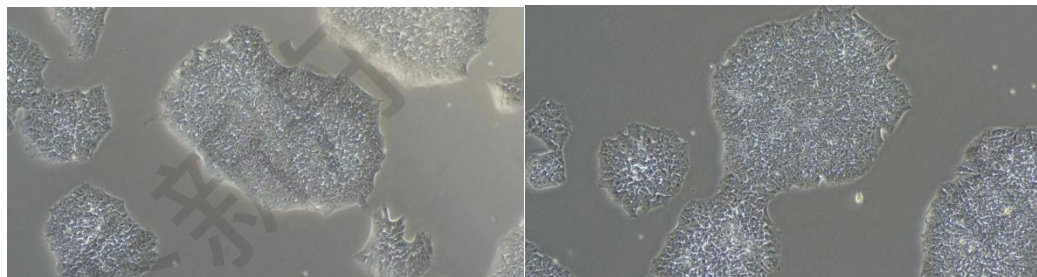


多能性幹細胞維持操作注意事項：

- 1 多能性幹細胞聯會度低於 20%時可以隔天換液；
- 2 聯會度在 20~50%時需要每天換液，可 12 孔板每孔 0.9 ml medium，6 孔板每孔 1.8 ml medium；
- 3 聯會度在 50 ~ 80%時需要每天換液，可 12 孔板每孔 1 ml medium，6 孔板每孔 2 ml medium；
- 4 聯會度達到 80%時可以進行傳代、凍存或多能性集落篩選。

不同聯會度下的細胞形態：

聯會度 50%



聯會度 80%

