



hiPS 人诱导多能干细胞 SOP

细胞名称 Cell name	hiPS 人诱导多能干细胞
货号 NO.	DF-GMP-ZB11AGF-B-WZX-22
描述 Description	<p>诱导性多能干细胞 (Induced pluripotent stem cells , iPSCs) 技术是指通过导入特定的转录因子将终末分化的体细胞重编程为多能性干细胞。iPS 细胞的出现, 在干细胞研究领域、表观遗传学研究领域以及生物医学研究领域都引起了强烈的反响。</p> <p>采用仙台病毒介导的外源转录因子导入, 将人脐带血单核细胞诱导成 iPS 细胞。重编程转录因子: OCT4、SOX2、KLF4、MYC</p> <p>该细胞每管含有细胞数 $>5 \times 10^5$ cells/ml, 此细胞通过免疫荧光染色验证, 经测试不含有 HIV-1、HBV、HCV、支原体、细菌、酵母和真菌。</p>
种属 Species	人
性别 Gender	男
组织来源 Tissue	外周血来源
形态 Morphology	克隆状
培养特性 Culture Properties	贴壁
安全性 Safety	所有肿瘤和病毒转染的细胞均视为有潜在的生物危害性, 必须在二级生物安全台内操作, 并注意防护
推荐培养试剂 Recommended culture reagent	<p>培养基名称: mTeSR™1 basal Medium 货号: 85851 品牌: STEMCELL</p> <p>5X 补充剂名称: mTeSR™1 5Xsupplement 货号: 85852 品牌: STEMCELL</p> <p>包被液名称: Vitronectin (VTN-N) 货号: A14700 品牌: Gibco™</p> <p>消化液名称: ReLeSR™ 货号: 05872 品牌: STEMCELL</p> <p>ROCK1 抑制剂名称: Y27632 货号: 72304 品牌: STEMCELL</p> <p>稀释液: 不含钙镁的 DPBS (依赛洛森)</p> <p>温度: 37°C</p> <p>气相: 95%空气, 5%二氧化碳</p>
细胞复苏 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, 根据用量用不含钙镁的 DPBS 稀释后每孔加 1-1.25ml 包被液, 用封口膜封上, 放 4 度冰箱过夜后使用。包被好的六孔板可以在 4 度冰箱存放 2 个星期, 用之前 37 度回温 (Note 1)。 配置完全培养基 (Note 2 和 Note 3) 按 1 : 4 比例混合, 回温。 取一个细胞冻存管 (Note 4) , 一个细胞冻存管可复苏六孔板的 1 个孔。 准备 4 毫升的 medium, 加入 1 毫升细胞冻存液, 1500rpm, 3 分钟。 准备复苏专用培养基: 全培养基 6mL 中加入终浓度是 10uM 的抑制剂 Y27632 (母液浓度为 10mM 时 1 : 1000 稀释) , 充分混匀。



	<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>



常見問題及注意事項請參考以下附錄內容。

附錄：

Note 1：包被好的六孔板嚴格要求回溫時間要求在 30 分鐘以上，但不要太久。如果回溫時間不充分會**導致過多細胞飄起來不貼壁！**

Note 2：除非每次用量大，培養基用前請用 50ml 的離心管小量配置。整瓶配置導致每次回溫慢溫度不夠，另外也會因為回溫次數的增多損耗培養基的有效成分，導致後面細胞狀態變差。

Note 3：回溫時間要求在 30 分鐘以上，但不要太久。會導致**過多細胞不貼壁飄起來！**

Note 4：在 37 度水浴中輕緩地晃動，凍存快有米粒大地時候既可取出。

Note 5：換液前請用舊培養液輕吹細胞兩次，完全吸掉舊培養液，這樣可以徹底地去掉死細胞碎片，死細胞碎片也是導致分化的原因之一。

Note 6：換液前嚴格回溫 30 分鐘以上（但不要太久）。回溫不充分會容易導致死細胞增多！細胞出現分化！

Note 7：一定要每天換液！換液的時間間隔在 24 小時，誤差不能太大，過久換液，死細胞增多且會**出現分化！！**

以下僅供參考

如遇細胞分化比較嚴重可進行如下操作：

多能性幹細胞篩選

1. 在 hPSC 聯會度處於 50-80% 時可以使用 ReLeSR 進行多能性集落篩選，原理是傾向於分化或已經分化的集落的基质不能被 ReLeSR 酶解脫壁；
2. 準備室溫保存的 ReLeSR，由 4 攝氏度恢復到室溫的培養液，提前用 Matrigel 包被好的孔板；
3. 吸棄待篩選的 hPSC 孔內的培養液，加入適量體積的培養液清洗一次，加入 1 ml ReLeSR，室溫靜置計時約 50 秒，吸棄大部分 ReLeSR，此處應保留極少量的 ReLeSR 液體在孔內，使得其平放時可以在細胞表面形成一層液膜；
4. 將上述孔板置於 37 攝氏度培養箱內靜置 5 ~ 8 分鐘（對不同條件下培養的不同 hPSC 來說，有不同的最適孵育時間，第一次篩選需要做梯度實驗確定，一般來說 5 分鐘即可）；
5. 將上述孔板取出，加入 1 ml E8 培養液，左手持孔板一側，右側持續拍打孔板另一側約 1 分鐘（效果理想的話，拍打几下即可見到 hPSC 集落脫離孔板底部），收集脫離的 hPSC 集落，不要吹打；
6. 吸棄鋪皿孔板中的液體，加入培養液，按照適宜的比例直接加入第 5 步中脫離皿底的幹細胞集落（不需 ROCKi），搖勻後放入培養箱培養。

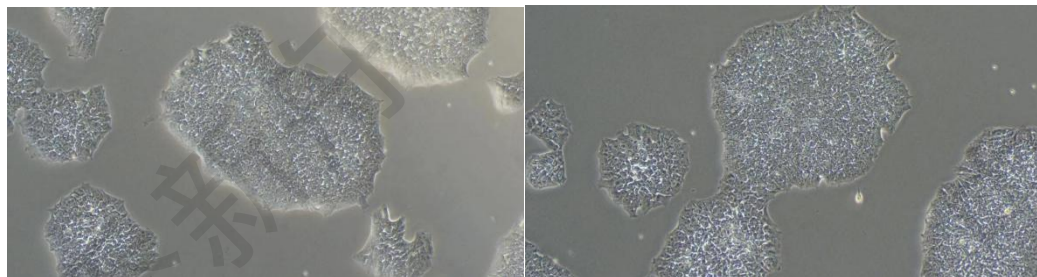


多能性幹細胞維持操作注意事項：

- 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%

