人 iPS 细胞 DYP0530 说明书

目录编号: SCSP-1302

细胞名称：DYP0530

细胞描述：将人皮肤细胞诱导成 iPS 细胞，重编程转录因子 OCT4、SOX2、KLF4、MYC

来源性别： 男性

疾　　病：帕金森症

年　　龄：63 岁

细胞来源：2013 年引进

生物安全等级：BSL-2

培养液：见【培养方案】

冻存日期/冻存代数：详见 冻存管/培养瓶 标识

冻存管建议复苏培养体系：1 个 T25 培养瓶

参考传代周期：4–5 天

参考传代比例：1:4

参考换液频率：每天

冻存液：见【培养方案】

细胞状态：克隆状，贴壁生长

支原体检测结果：阴性

STR 鉴定结果：

D5S818: 11,12；
D13S317: 11,11；
D7S820: 10,12；
D16S539: 10,11；
vWA: 17,18；
THO1:7,7；
Amelogenin: X,Y；
TPOX: 8,11；
CSF1PO: 10,12.

中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库/干细胞库

【培养方案】：使用 STEM CELL 公司 mTeSR1 配套培养体系进行培养

1. 试剂和材料

mTeSR™1 培养基试剂盒（产品号#85850）包括：

成分	规格	存放条件
mTeSR™1 基础培养基（#85851）	400 mL	2-8 ℃
mTeSR™1 5X 添加物（#85852）	100 mL	-20 ℃

所需的其他试剂和材料

产品	品牌/货号
Cryostor CS10	STEM CELL/07930
温和分离液	STEM CELL/07174
DPBS(不含钙镁离子)	GIBCO/14190
DMEM/F12	GIBCO/11330
Y27632	STEM CELL/ 72302
BD Matrigel hESC-qualified Matrix	CORNING/354277（BD 该系列产品已被 CORNING 收购）
细胞刮	如，CORNING/3010
另需细胞培养板/瓶/皿，15ml 离心管和移液管等细胞培养耗材。	

2. 试剂的制备

2.1 mTeSR1 的制备

2.1.1 在室温 (15 - 25° C) 下或冰箱内 (2 - 8° C) 过夜解冻 mTeSR™1 5X 添加物（成分编号 #05852）。 如需要，可在无菌条件下将 5X 添加物分装为适量的工作等份，并在 -20° C 下冻存。冷冻的分量须在 3 个月内用完。解冻后的分量应在 1 天内制备成完全的 mTeSR™1 培养基。请勿在解冻后再次冷冻。

2.1.2 在无菌条件下将 100 mL 的 5X 添加物全部解冻后加入到 400 mL 的基础培养基中，形成总共 500 mL 的容量。充分混匀。完全的 mTeSR™1 培养基 在(2 - 8° C) 下储存时可维持稳定状态最多 2 周，或在-20° C 下冷冻时可维持稳定状态最多 6 个月。在室温(15 - 25° C) 下或冰箱内(2 - 8° C) 过夜解冻冷冻的培养基，不要长时间放在 37° C 水浴内加热培养液。

如果在无菌条件下制备，完全的 mTeSR™1 培养基可直接使用，但如需要，也可使用 0.2 μm 的低蛋白结合过滤器过滤培养基。

2.2 Matrigel 工作液配制和包被

应分装和冷冻保存 BD Matrigel™ hESC-qualified matrix（BD 产品号#354277)。有关分装的完整说明和建议，请查阅与 BD Matrigel™ 同时提供的产品说明书。分装后的小包装可在-70° C 下最多储存 6 个月。

将一份 BD Matrigel™ 加入到 25 mL 的 DMEM/F12 中，这足以包被四个 6 孔培养板（1 mL / 孔）或三个 100 mm 培养皿（8 mL / 培养皿）。

（1） 将 25 mL 的稀释培养基（DMEM/F12；产品号#11330 ）分装入离心管放在冰上。

（2） 将一份分装后的 BD Matrigel™自-70° C 取出 ，在冰上解冻，直到成为液体，然后将解冻后的 BD Matrigel™ 加入到冷稀释培养基（在 50 mL 的试管中）中，充分混匀。如需要，可用冷培养基冲洗 EP 管。

（3） 立即用稀释后的 BD Matrigel™ 溶液包被组织培养板。对于 6 孔培养板，每个孔使用 1 mL 稀释后的 BD Matrigel™；对于 100 mm 培养板，每个培养板使用 8 mL 稀释后的 BD Matrigel™。旋动培养板，以使 BD Matrigel™ 溶液均匀地分布在表面上。

要包被其他尺寸的组织培养皿，则按照需要包被的培养皿的表面积决定稀释后的 BD Matrigel™用量。

（4） 使用前，包被的培养板应放在培养箱(37° C) 下至少 1 个小时。请勿让培养板脱水。在培养板可供使用之前，请勿移除 BD Matrigel™ 溶液。

如果不立即使用，培养板必须密封，以防止脱水（如利用 Parafilm®）。包被后的培养板可在 2 - 8° C 下最多储存 7 天。

如果 BD Matrigel™溶液并未完全覆盖表面，则无法实现最佳的 hPSC 培养；因此，不建议使用含有溶液已蒸发区域的培养板。

（5） 轻轻地将培养板向一个角落倾斜，使过剩的 BD Matrigel ™ 溶液汇聚在那个角落。用一次性移液管或通过抽取移除溶液。确保移液枪头不刮到已包被的表面。立即加入 mTeSR™1 培养基和细胞。

如果已将培养板在 2 - 8° C 下储存，则在移除 BD Matrigel™溶液之前，将培养板在培养箱 (37° C) 下放置 30 分钟。

本库建议的配制 Matrigel 工作液方法:

Matrigel (CORNING, 货号 354277) 根据瓶子上的批号上 CORNING 网站 http://www.corning.com/worldwide/en.html 下载 quality certificate. 了解分装体积（dilution factor），一般情况下稀释比例为 1：80 左右，即 5ml matrigel 稀释到 395ml DMEM/F12 中。

1. 稀释前将 Matrigel 放入 4 度冰箱过夜融化。
2. 将适量体积的 DMEM/F12（GIBCO, 11330）放 4 度冰箱预冷。
3. 将融化的 matrigel 和 DMEM/F12 从冰箱取出并打开盖子，10ml 移液管吸吹 DMEM/F12 几次以冷却移液管，并吸取少量 DMEM/F12 加入 matrigel 瓶中混匀,将 matrigel 转移到 DMEM/F12 培养液中，并吹打混匀。（因为 matrigel 遇 15 度以上温度就会成凝胶粘在原装玻璃瓶壁和移液管壁上，故 matrigel 从冰箱拿出来以后尽快打开盖子并转移到预冷的培养液中，吸取 matrigel 的移液管一定要冷却。）
4. DMEM/F12 重新放入 4 度冰箱过夜，使 matrigel 充分溶解。
5. 第二天将稀释好的 matrigel 吹打混匀，分装，-80 度或者-20 度保存，三个月之内都可以使用。
6. 冷冻的 matrigel 工作液应放入 4 度冰箱融化，混匀后铺皿。不能放入水浴锅温育或在室温下久置。因许多使用者反映按照产品说明书上的冰上操作有带入微生物污染的风

险，故可以采用以上方法稀释 matrigel。如果稀释好的 matrigel 3 个月之内用不完，可以按照产品说明书上的方法，根据 dilution factor 推荐的分装体积分装 matrigel 原液到 EP 管中，每次要使用前取一管用 25ml DMEM/F12 稀释，稀释过程中的注意点同上。

2.3 配制 Y27632 溶液

Y27632 粉末溶解在 DPBS 中，配成浓度为 10mM 的储存液，0.22um 滤膜过滤除菌。分装后冷冻于-20° C，6 个月内使用。

Y27632 提高复苏和传代后的克隆形成率，所以只在复苏步骤和传代步骤添加，换液时不添加 。

由于 Y27632 可以提供克隆的成活率，但是会使 hiPS 细胞呈梭形，故 ROCK Inhibitor Y27632 仅在复苏和传代时添加（1:1000，即：终浓度为 10μM），日常换液不用添加。

3. 解冻复苏 hES /hiPS

在开始操作程序之前，将所有试管、加热后的培养基和培养板准备好，以确保尽快完成解冻程序。

（1） 快速在 37° C 水浴槽中解冻 hPSC，方法是轻柔持续地摇动冷冻管，直到只剩下一个小冷冻团。从水浴槽中取出冷冻管，用 70% 乙醇擦拭，以进行消毒。

（2） 使用一个 1 mL 的移液管将冷冻管中的内容物转移至一个 15 mL 锥形试管中，过程必须轻柔防止吹散细胞团。

（3） 将 5 – 7 mL 温暖的 mTeSR™1 逐滴加入试管中，在加入培养基的同时轻柔混匀。

（4） 在室温(15 – 25° C) 下，以 300 x g 离心细胞 5 分钟。

（5） 吸出培养基，使细胞团保持完整。使用一个 1 mL 的移液管，轻轻地将细胞重新悬浮在 1 – 2 mL 的 mTeSR™1 中，确保维持细胞的团块状态。根据最终培养细胞的液体体积，加入 ROCK inhibitor Y27632, 终浓度为 10uM

（6） 轻轻地将培养板/皿向一个角落倾斜，使过剩的 BD Matrigel™ 溶液汇聚在那个角落，从而从已包被的组织培养板中移除 BD Matrigel™。使用一次性移液管或通过抽取移除溶液。确保移液枪头不刮到已包被的表面。

如果已将培养板在 2 – 8° C 下储存，则在移除 BD Matrigel™溶液之前，将培养板在培养箱 (37° C) 下 放置 30 分钟。

（7） 将含有细胞聚集体的培养基转移至 BD Matrigel™ 包被的培养器皿上。一般一支冻存管细胞复苏到一个 T25 培养瓶或 6 孔板中的 2 个孔。

（8） 将培养板放在 37° C 培养箱中，然后快速地左右、前后移动培养板，以均匀地将细胞团分布在各个孔内。在 37° C、5% CO2 和 95% 湿度的条件下培养细胞。

（9） 每天更换培养基(不需要再添加 Y27632)。在解冻后大约 5 – 7 天内检查可进行传代的未分化集落（有密集的中心）。

如果在解冻后仅观察到很少的未分化集落，则可能需要只选择这些集落进行传代，并将它们重新放在新的 BD Matrigel™包被的培养板大小相同的孔中。

（10） 每天换液。

4. 用 mTeSR1 对 hES/hiPS 进行传代

在 mTeSR™1 中生长的细胞当集落变得较大、中心变得密集和明亮（对比其边缘）而

相邻的集落开始融合时，这时可进行传代。根据接种的细胞团的大小和密度，传代周期为 5 天左右。如果太早对集落进行传代或传代太过频繁，则细胞可能吸附不好、产量将会减少且细
胞可能分化。如果太晚对集落进行传代，培养物将开始显示分化迹象（特点是细胞类型出现不同的形态）。

（1） 分装足够的 mTeSR™1 以传代细胞。将分装的 mTeSR™1、温和分离液（产品号#07174）和 DMEM/F-12 加热至室温(25° C 左右)。

（2） 使用显微镜观察确定分化的区域。用毡制粗头笔或透镜标志器在培养板底部标记这些区域。如果培养物品质优异，分化的区域不会超过培养孔的 20%。

（3） 用移液枪头刮除或抽取，去除分化区域。

（4） 从 hPSC 培养物中吸出培养基，然后用 DPBS（不含钙镁离子）冲洗。

（5） 向每个培养瓶内加入温和分离液(每个 T25 加 3ml)，覆盖底面，在室温下静置 1 分钟。

（6） 吸掉温和分离液，然后用 6ml DMEM/F-12 轻轻的洗涤培养皿一次。

（7） 向培养瓶内加适量 mTeSR™1，并用细胞刮（如 Corning 产品号#3010）将细胞集落刮离培养瓶底。

（8） 将分离的细胞聚集体转移至一个 15 mL 锥形试管中，并加入适量 mTeSR™1 冲洗培养瓶，以收集残留的细胞聚集体。将冲洗液一并收集到 15 mL 离心管内。
轻轻吹打细胞聚集体 2-3 次，调整培养基的体积，以实现适当的分配。根据最终培养细胞的液体体积，加入 ROCK inhibitor Y27632, 终浓度为 10uM。

（9） 将细胞聚集体与 mTeSR™1 接种至新的 BD Matrigel™ 包被的培养板上。
一般传代周期为 5 天左右，传代比例为 1：3-1：6。如果集落过于密集或过于稀疏，则下一次传代时相应地调整传代比例。请注意，这些指导基于中科院干细胞库 hESC H1 和 H9 以及 hiPS DYR0100 和 DYP0530 细胞系的生长特征，在其他不同的细胞系和实验室之间可能会存在差异。

（10） 快速前后和左右多次移动培养板，以使细胞分散在各个孔的表面。将培养板放在 37° C 培养箱中。确保新接种的集落均匀地分布在 BD Matrigel™包被的培养板的整个表面。细胞团分布不均匀有可能导致 细胞分化。

（11） 每天换液。

5. 冷冻 hESC 或 hiPS 细胞

（1）用显微镜观察需要冻存的培养物，确定已分化的区域。用毡制粗头笔或透镜标志器在培养板底部标记这些区域。
如果培养物品质优异，分化的区域不会超过培养孔的 20%。

（2）用移液枪头刮除或抽取，去除分化区域。

（3）从培养孔中吸出残留的培养基，然后用 DPBS（不含钙镁离子）冲洗。

（4）向每个培养瓶内加入温和分离液(每个 T25 加 3ml)，覆盖底面，在室温下静置 1 分钟。

（5）吸掉温和分离液，然后用 6ml DMEM/F-12 轻轻的洗涤培养皿一次。

（6）向培养瓶内每个孔内加适量 mTeSR™1，并用细胞刮（如 Corning 产品号#3010）将细胞集落刮离培养瓶底。

（7）将分离的细胞聚集体转移至一个 15 mL 锥形试管中，并加入适量 mTeSR™1 冲洗培养瓶，以收集残留的细胞聚集体。将冲洗液一并收集到 15 mL 离心管内。小心地尽量将细胞团保持到最大。

（8）在室温(15- 25° C) 下，以 300 x g 离心装有细胞聚集体的 15 mL 离心管 5 分钟。离心细胞时，准备和标记冻存管。

（9）轻轻地吸出上清液，小心保持细胞团完整。

（10）使用预冷的(2 -8° C) CryoStor™CS10 轻轻地重新悬浮细胞团，然后将细胞悬液转移至冷冻管中。

（11）将冷冻管置于程序降温盒内（大约-1° C /min）-80° C 冷冻细胞过夜，然后转移至液氮长期储存。