

ABW[®] 诱导多能干细胞培养方案

ABW[®] Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC) Culture Protocols

一、培养材料

1、试剂：ABW[®] Matrigengel (REF: 0827775) ; ROCK 抑制剂 (Y-27632) ; DMEM F12/DMEM; mTeSR1/E8 培养基; Accutase 解离剂、PBS(D-PBS)

2、耗材：无菌枪头；六孔板；无菌 EP 管。

二、培养准备

1、材料预冷：

a、将 ABW[®] Matrigengel 置于冰盒中，放入 4℃冰箱，使胶能过夜缓慢融化；

b、4℃预冷无菌离心管、无菌枪头、六孔板、DMEM F12/DMEM；

2、将 ABW[®] Matrigengel (REF: 0827775) 以 1：80 或 1：100 比例进行稀释：

a、将适量 4℃的 DMEM F12/DMEM 移入冷却的 15/50 mL EP 中；

b、使用移液器将预冷的枪头从 EP 管吸取 DMEM F12/DMEM 中移入分装好的 ABW[®] Matrigengel，再吸取转移至 EP 管内；重复几次，直到基质胶完全移入到 EP 管中。

c、按比例混合后作为储备基质胶混合液，进行后续铺板；

3、制作基质胶涂层

a、按 1mL/孔将基质胶混合液加入预冷的六孔板中，轻轻晃动以确保混合液均匀铺在板上；

b、将 6 孔板转移到 37℃孵育过夜（板材可以在孵育一小时后即可使用，但过夜孵育的涂层对细胞培养效果更佳）；

c.使用前吸去涂层上方液体。

4、配置 ROCK 抑制剂 (Y-27632) 工作液：使用无菌 PBS 将 Y-27632 溶解，配置成 10mM 溶液（1000X），工作浓度为 10μM；

5、配置含 ROCK 抑制剂 mTeSR1/E8 培养基：将 10mM 溶液加入 mTeSR1/E8 培养基至终浓度为 10μM。

注意：ABW[®] Matrigengel 在 >4℃时会逐渐聚合成胶，请严格把控操作温度，控制操作时间；稀释后的基质胶混合液同样需要冰上操作。



三、细胞培养

1、复苏 iPSC

- a.从液氮罐或干冰中取出 ipsc, 37°C水域中解冻, 解冻应迅速完成;
- b.用 75% 酒精消毒冻存管后转移到超净台/生物安全柜;
- c.将细胞溶液转移到新的 15ml EP 管中, 用 DMEM F12/DMEM 冲洗冻存管两次
- d.室温 300g 离心 5min(ipsc 对于 200-300g 的转速都有较好的耐受性, 建议使用 300g 来最大限度捕捉细胞, 标准程序下建议使用 200g) ;
- e.弃上清, 用 2mL 含有 ROCK 抑制剂的培养基轻柔地重悬 iPSC 后转移到用铺好板的孔中, 前后摇动使得细胞均匀分布 (建议将每瓶细胞 1×10^6 装在六孔板的一个孔内使细胞存活率最大化)
- f.将六孔板放回 37°C培养箱, (请在细胞被转移后立即执行, 避免细胞中央密度增加)
- g.次日撤去 ROCK 抑制剂, 即用无抑制剂的培养基替代含抑制剂的培养基培养细胞。

注意: 细胞培养过程中不提倡使用抗生素, 其会干扰细胞和其分化潜能; 培养环境应与其他细胞隔离, 两次传代后检测支原体; DMSO 在室温下对细胞有毒, 复苏步骤应快速完成

2、iPSC 传代

- a.将培养上清吸去, 用 1mL 的 PBS 清洗后加入 1mL Accutase;
- b.转移到 37°C培养箱 3 分钟, 或在显微镜下观察直到大部分细胞脱落 (若细胞仍然附着, 可将培养板放在手上, 另一手轻轻在你的手上拍打使板发生轻微震动从而使细胞脱落) ;
- c.传代前准备好基质胶涂布的六孔板
- d.倾斜培养板, 将 Accutase 溶液沿培养层表面转移两次, 分离结块并转移到离心管中
- e.用 DMEM F12/DMEM 冲洗培养层表面, 并与管中的细胞溶液合并 (使用 DMEM/F12 或用 PBS 洗涤, 建议使用至少 5%的培养基, 有利于随后的造粒和附着) ;
- f.室温下 300g 离心五分钟
- g.吸去上清, 用含有 ROCK 抑制剂的培养基进行重悬;
- h.将细胞加入到涂层板中, 轻轻摇动使细胞分布均匀;
- i.将培养板放入 37°C培养箱中孵育。



注意：IPSC 生长为单层后则会迅速分化并死亡，为了保持生长和多能性，需在其长满前进行传代。

3、iPSC 细胞冻存

a.准备细胞和解离液，在解离液解离细胞过程中，将培养基与 10%DMSO 混合，在冻存管上贴好标签，配置好冻存液（可选 20%血清或血清替代物提高存活率，也可以使用 90%胎牛血清+10%DMSO）；

b.分离细胞方法同传代，可以使用细胞计数器来配合进行细胞的冻存；

c. 以 1×10^6 冻存每管细胞，之后进行离心、抽吸培养基，然后在适当体积的冻存液中进行重悬；

d.将 1ml 重悬好的细胞冻存液加到 1.5ml 冻存管中，并进行程序性降温，在液氮罐中长期保存。

ABW BIO

禁止转载

