



使用SRV™ iPSC-2载体从PBMC诱导iPS细胞的实验方案
(TKB_P-003-03)

目录

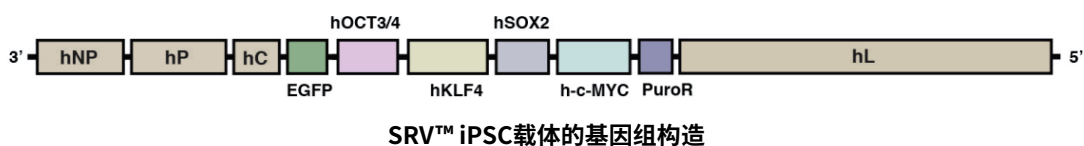
I . 关于SRV™ iPSC Vector	p.1
II . 关于使用SRV™ iPSC Vector的iPS细胞诱导方案	p.2
(3) 使用SRV™ iPSC-2载体从人PBMC诱导iPS细胞的实验方案	p.3
III. 通过RT-PCR检测SRV™来源RNA的方法	p.7
IV. Q&A	p.8

I. 关于SRV™ iPSC Vector

Tokiwa Bio株式会社开发的隐形RNA载体 (Stealth RNA Vector™, 简称SRV™) 是以负链单链RNA病毒的研究为基础、重新对RNA基因组进行二次设计后获得的抑制了细胞毒性的用于基因转染和表达的载体。单个SRV™的RNA基因组可同时搭载多个(最多10个)基因, 且能够在人和动物的各种细胞内长期稳定地表达。

由于SRV™不含合成病毒颗粒所必需的基因, 因此也不存在从导入了基因的细胞中产生传染性二次粒子的风险。另外, SRV™是通过其本身拥有的RNA依赖性RNA polymerase (RdRp) 来使基因表达保持稳定的, 因此抑制RdRp便可将SRV™完全从细胞中消除。SRV™的这些性质对于通过基因表达进行的细胞重编程而言是十分理想的选择。

SRV™ iPSC Vector是将人来源的4个转录因子 (OCT3/4、KLF4、SOX2、c-MYC) 和EGFP基因搭载在1个SRV™的基因组上, 以此诱导各种体细胞高效地生成iPS细胞的工具。转录因子通常会同时被导入细胞, 并以相同的比率表达, 实现高效率与高重复性的细胞重编程。因此, 其他技术所无法重编程的细胞, 如外周血中的单核细胞等也可以通过上述方法建立iPS细胞。



SRV™ iPSC Vector根据抑制RdRp所诱导的载体清除系统的不同, 分为以下两种类型。无论使用哪一种都能够以EGFP为标志物, 监测向目标细胞导入的基因和iPS细胞内载体的消失。另外, 在添加载体后3~7周之内就能得到载体已经完全被清除的iPS细胞。

SRV™ iPSC-1 Vector: 使用siRNA*清除载体的类型, 适用于成纤维细胞来源的iPS细胞诱导

SRV™ iPSC-2 Vector: 初始化后自动清除载体的类型, 适用于外周血或脐带血中的单核细胞来源的iPS细胞诱导。

*从细胞中清除SRV™ iPSC-1 Vector时, 需要使用 siRNA (siTB1) 和转染试剂。
由于试剂盒中不包含siTB1, 因此请根据以下信息自行订购合成物。

siTB1 有义链: 5' - CAAUAGUUCACGCGUGAAAGug - 3'
反义链: 5' - CUUUCAGCGUGAACUUAUUGcu - 3'
(小写字母为突出端, 请在退火处理后进行使用)

在清除使用SRV™ iPSC Vector建立的iPS细胞中的载体时, 虽然能够通过确认EGFP荧光的消失轻松监测, 但为了达到更彻底的检测效果, 可以使用RT-PCR法确保从iPS细胞中提取的所有RNA都已经检测不出SRV™来源的RNA。(参考「III. 通过RT-PCR检测SRV™来源RNA的方法」)

使用过程中的注意事项

- 本产品是日本“根据转基因生物等的使用等规范确保生物多样性相关法律(卡塔赫纳协定)”的对象产品。
- 由于需要在Biosafety Level 2 (BSL2)实验室标准下进行操作, 因此请务必使用符合BSL2标准的安全柜。
- 本产品为研究用试剂, 不可用于医疗、诊断等非研究目的。

II. 使用SRV™ iPSC Vector的iPS细胞诱导方案

• 关于培养条件

此方案是以StemFit® AK02N为培养基、iMatrix-511为涂层剂,在无饲养层条件下进行的iPS细胞诱导方法。(有关试剂请遵照各生产厂家提供的使用说明进行使用)

使用饲养细胞、或其他培养基和涂层剂在无饲养层条件下进行iPS诱导时,SRV™的感染方法也是同样的,但其他条件则需要根据情况自行决定。需要注意的是以血液细胞为目标细胞时,根据培养基和涂层剂的不同,也有可能出现无法诱导细胞集落的情况。

另外,由于涂层剂容易干燥,因此在更换培养基时需要动作迅速。

【培养基】

StemFit® AK02N (AJINOMOTO, AK02N)

StemFit® Basic02 (AJINOMOTO, BASIC02): 以成纤维细胞为目标细胞时使用

【涂层剂】

iMatrix-511, 0.5 mg/mL (nippi, 892012): 添加0.5 µg/cm²

涂层方法

1. 使用PBS(-)稀释iMatrix-511,添加至培养板中
2. 在37°C、5% CO₂的孵化箱中反应1 h以上,使用前去除涂层液后添加培养基操作时请注意动作要迅速,避免涂层干燥。

各平板中每孔容量的示例

培养板	iMatrix-511	PBS(-)	培养基用量
48孔板	0.9 µL	200 µL	250 µL
24孔板	1.8 µL	400 µL	500 µL
12孔板	3.6 µL	800 µL	750 µL
6孔板	9.6 µL	1.5 mL	1.5 mL

• 关于载体的解冻

请用室温水解冻载体,使用前放于冰块中保存。

如有无法一次性使用完毕的情况,请在最开始的解冻时适当进行分装,然后在-80°C下冷冻保存。

请注意反复融冻会导致载体的滴度降低。

• 各目标细胞的对应方案

根据载体与目标细胞的组合不同,推荐的方案也有所不同。请根据具体情况选择最合适的方案。

- (1) 使用SRV™ iPSC-1 Vector的人皮肤成纤维细胞来源iPS细胞诱导方案
- (2) 使用SRV™ iPSC-2 Vector的人外周血单个核细胞(PBMC)、单核细胞(MNC)来源iPS细胞诱导方案
- (3) 使用SRV™ iPSC-1 Vector的人CD34阳性细胞来源iPS细胞诱导方案
- (4) 使用SRV™ iPSC-2 Vector的人CD34阳性细胞来源iPS细胞诱导方案

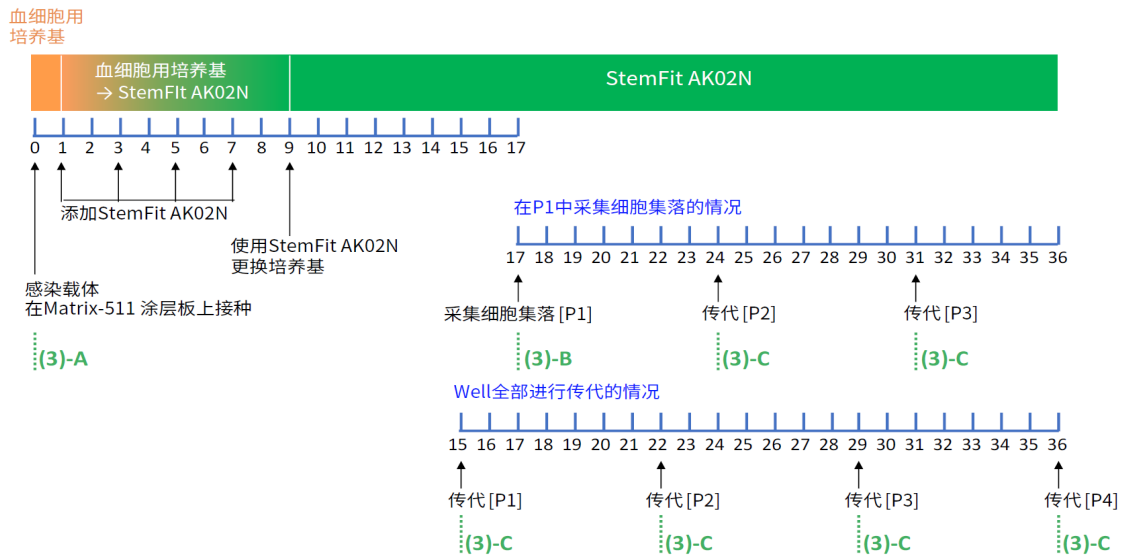
本方案无法保证一定能够从用户的目标细胞中诱导出iPS细胞。

方案中记载的所需天数为参考数字,请根据各个实验室的具体情况进行调整后再行实施。

另外,请务必在阅读「IV.Q&A」后再开始实验。

(3) 使用SRV™ iPSC-2载体从人外周血单个核细胞和单核细胞诱导iPS细胞的实验方案

实验流程



A. 细胞集落的诱导

【所需材料】

细胞: PBMC (市场上贩卖的试剂、从外周血分离纯化的产物)

试剂: SRV™ iPSC-2 Vector (> 3 × 10⁷ CIU (cell infectious unit) /mL)

载体、含有载体的培养基以及附着有载体和载体培养基的枪头、离心管和培养板全部需要在经过紫外线辐照后,再进行高压灭菌处理。

血细胞用培养基A **[在RPMI1640中添加10% FBS]

RPMI1640 (Nacalai Tesque,30264-85)

10% FBS

血细胞用培养基B **[在RPMI1640中添加15% KSR-XF]

RPMI1640 (Nacalai Tesque,30264-85)

15% KSR-X [GIBCO™ CTS™ KnockOut™ SR XenoFree Medium (ThermoFisher SCIENTIFIC, 12618013)]

血细胞用无血清培养基

AIM V™ Medium (ThermoFisher SCIENTIFIC, 12055091) **

iPS细胞用培养基

StemFit® AK02N (AJINOMOTO, AK02N) **

PBS(-)

iMatrix-511, 0.5 mg/mL (nippi, 892012)

台盼蓝试剂

**血细胞用培养基与接种用培养基(根据目的进行选择)

条件	血细胞用培养基	接种用培养基
有血清	A : 10%FBS/RPMI1640	10%FBS/RPMI1640, AK02N, AIM V
无血清	B : 15%KSR-XF/RPMI1640	AIM V

根据所使用的培养基,集落的诱导效率略有不同

器材：培养板(感染细胞的接种密度越高, 集落出现得越早, 集落数变得更多。)

6孔板 or 12孔板：在P1中采集细胞集落的情况

48孔板：孔全部进行传代的情况

15/50 mL锥形管、1.5 mL离心管(带盖)

吸液器、移液枪、吸管、枪头

细胞计数仪

离心机：由于单核细胞容易粘附在试管内, 请使用水平转子而非角转子。

注意：特别是使用无血清培养基时, 细胞更容易粘附在试管内, 避免在操作中损失细胞。

【实验步骤】

Day 0

1. 冻存细胞

在水浴锅中快速解冻, 添加至血细胞用培养基中离心 ($300 \times g$, 10 min, 4°C) 后, 重悬于适当的CD34阳性细胞用培养液中, 并计数细胞数量。

当日分离纯化的细胞

悬浮在适量的CD34阳性细胞用培养基中, 并计算细胞的数量。

2. 1. 中准备的细胞以 1×10^5 cells/tube 在1.5 mL离心管中加入分装后, 进行离心 ($300 \times g$, 5 min, 4°C)。

3. 请深度去除上清后, 轻敲使细胞分散。

4. 从SRV™ iPSC-2 Vector的滴度中计算载体量, 使1. 中接种的细胞数的MOI=3。

1×10^5 cells \times MOI=3 \rightarrow 计算 3×10^5 CIU所需载体量

例) 当 3×10^7 CIU/mL时, 结果为10 μL 。

5. 计算所需血细胞培养基的量, 使其与4. 计算出的载体量总计为20-33 μL 。

使感染的细胞密度为 $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cells/mL。

6. 用室温水快速解冻载体后稍加离心, 使用前放置于冰上。

7. 向3. 所准备细胞中加入4. 5. 计算结果的培养基与载体, 吹打2, 3次混匀。

8. 已加入细胞的1.5 mL离心管放入 37°C 培育箱中, 静置2 h, 中途轻敲2, 3次。

9. 加入1 mL血细胞培养基后离心 ($300 \times g$, 5 min, 4°C)。

10. 除去含有载体液的上清液, 轻敲细胞使其松动。

11. 重复9. 10. 两次。(共清洗三次)

12. 向已涂层iMatrix-511的培养板中添加接种用培养基**。

6孔板：1.5 mL/well

12孔板：750 μL /well

48孔板：200 μL /well

13. 向11. 所准备的感染细胞中加入血细胞用培养基50 μL , 全部添加到12. 的孔板中, 同时使其充分悬浮。

14. 摇动平板使细胞均匀分散, 在 37°C 、5% CO_2 的孵育箱中进行培养。

Day 1, 3, 5, 7

15. 添加原来培养基量的2/3量的StemFit AK02N。

6孔板：1 mL/well

12孔板：500 μL /well

48孔板：167 μL /well

Day 9以后

16. 每天或每隔1天使用StemFit AK02N更换培养基。

6孔板：1.5 mL/well

12孔板 : 750 μ L/well

48孔板 : 250 μ L/well

Day 15以后

细胞集落扩大、稳定成型后, 进行以下操作。

在P1中采集细胞集落时 → B. 伴随siRNA转染的传代

全部孔进行传代时 → C. 传代

B. 伴随siRNA转染的传代

【所需材料】

细胞: iPS细胞重编程诱导中的EGFP弱阳性、阴性细胞集落

试剂: iPS细胞用培养基

StemFit® AK02N (AJINOMOTO, AK02N)

PBS(-)

iMatrix-511, 0.5 mg/mL (nippi, 892012)

Accutase (ICT, AT104)

CultureSure® Y-27632, 10 mM (FUJIFILM Wako, 036-24023)

器材: 培养板 - 24孔板、96孔板 (采集用)

15/50 mL锥形管

吸液器、移液枪、吸管、枪头

【实验步骤】

1. 向所需量的维持培养基中加入其1/1000的10 mM Y-27632并混合 (最终浓度为10 μ M)。

= [AK02N + Y 培养基]

2. 向96孔板中加入50 μ L的[AK02N + Y 培养基]。

3. 使用P10的移液枪, 在显微镜下对细胞集落进行物理剥除并吸出, 收集在2. 准备的培养板中。

4. 向已涂层iMatrix-511的24孔板中添加500 μ L/well的[AK02N+Y培养基]。

5. 使用移液枪对3. 中收集的细胞集落进行数次吹打后, 转移到4. 的培养板中。

采集细胞集落的次日、次日以后

6. 使用不含Y-27632的AK02N培养基进行培养基的更换。

细胞数增加、细胞集落扩大后进行传代。 → C. 传代

C. 传代

【所需材料】

细胞: iPS细胞重编程诱导中的EGFP阴性细胞集落、混有EGFP阳性细胞的细胞集落

试剂: iPS细胞用培养基

StemFit® AK02N (AJINOMOTO, AK02N)

PBS(-)

iMatrix-511, 0.5 mg/mL (nippi, 892012)

Accutase (ICT, AT104)

CultureSure® Y-27632, 10 mM (FUJIFILM Wako, 036-24023)

台盼蓝溶液

器材: 培养板 - 6孔板(使用2孔)

15/50 mL锥形管、1.5 mL离心管

吸液器、移液枪、吸管、枪头

细胞计数仪

【实验步骤】

1. 向所需量的维持培养基中加入其1/1000的10 mM Y-27632并混合(最终浓度为10 μ M)。
=[AK02N + Y 培养基]
2. 去除iPS细胞诱导培养板中的培养基, 使用PBS(-)清洗干净后加入适量的Accutase。
48孔板: 120 μ L/well
24孔板: 200 μ L/well
12孔板: 300 μ L/well
6孔板: 500 μ L/well
3. 在37°C的孵育箱中反应5 min。
4. 用吸管吸放并剥离细胞(如细胞难以剥离, 则再次进行孵育)后, 收集在1.5 mL离心管中。然后使用AK02N(添加量为2. 中Accutase的1.5倍)清洗板孔, 收集在同一离心管中。
5. 离心(200 x g, 5 min, 4°C)并去除上清后, 轻敲使细胞分散。
6. 添加适量的[AK02N+Y培养基], 使细胞充分悬浮后计算细胞数量。
7. 向已涂层iMatrix-511的培养板中添加1.5 mL/well的[AK02N+Y培养基], 按照 $0.1 \times 10^4 \sim 1.3 \times 10^4$ cells/well接种细胞。
24孔板: 0.25×10^4 cells/well
12孔板: 0.5×10^4 cells/well
6孔板: 1.3×10^4 cells/well
(如需尽快去除EGFP阳性细胞, 则按照 0.1×10^4 cells/well在24孔板上进行接种即可)
8. 接种后立即摇动平板使细胞均匀分散, 在37°C、5% CO₂的孵育箱中进行培养。

传代次日

9. 使用不含Y-27632的AK02N培养基进行培养基的更换。

传代后第3天及以后

10. 每天或每隔1天使用AK02N更换培养基。

细胞数增加、细胞集落扩大后进行扩增培养。根据需求进行以下操作。

- 确认载体去除情况(参考「III. 通过RT-PCR检测SRV™来源RNA的方法」)
- 探讨iPS细胞的性质(免疫染色、流式细胞仪等)
- 细胞保存

III. 通过RT-PCR检测SRV™来源RNA的方法

【所需材料】

细胞：SRV™ iPSC-1,2 Vector诱导的iPS细胞

试剂：RNA提取试剂盒 - RNeasy PLUS Mini Kit (QIAGEN, 74134)

cDNA合成RT-PCR试剂盒 - SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (ThermoFisher SCIENTIFIC, 18091050)

PCR - PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (TaKaRa, R010A)

器材：热循环仪

【实验步骤】

1. 使用RNeasy PLUS Mini Kit, 按照试剂盒的方案从SRV™ iPSC-1,2 Vector诱导的iPS细胞中提取total RNA。
2. 使用SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System, 按照试剂盒的方案从total RNA (0.5 μg) 中合成cDNA。逆转录引物则选择试剂盒附带的Random Hexamer作为RT-primer进行使用。
3. 关于cDNA 1.0 μL, 在total volume 10 μL时使用PrimeSTAR HS DNA Polymerase, 按照以下的条件进行PCR。引物序列请参考下表。

PCR条件		
temperature (温度)	Time (时间)	Cycles (循环)
98°C	10秒	循环35次
55°C	5秒	
72°C	30秒	

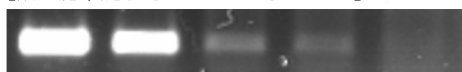
primer sequence (引物序列)		PCR product size (PCR产物大小)
MOP104	ATATGGAGTACGAGAGGACC	500bp
MOP105	CCTCAGGTTGGAGAGAGTCA	

【实验示例】

以下实验示例为将已确认不含SRV™ Vector的iPS细胞与SRV™ Vector阳性细胞混合后所进行的研究。阳性细胞是由不含SRV™ Vector的iPS细胞被含有上述primer sequence的SRV™ control Vector感染后生成的。

准备已建立TIG3细胞来源的iPS细胞 1×10^6 个, 改变细胞数 (1000、100、10、1、0个) 并向其中添加阳性细胞后提取total RNA。RT-PCR后, 进行以载体基因为目标的PCR。实验结果显示, 从含有1个感染细胞的细胞群中提取的total RNA中也确认到了目标PCR产物的扩增。

【从细胞中提取的total RNA的RT-PCR】



【将含有目标序列的plasmid DNA作为模板的PCR】



Lane No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PCR产物	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

从细胞中提取的total RNA的RT-PCR			
Lane No.	非感染细胞	感染细胞数	PCR产物
1	1×10^6 个	1000个	+
2		100个	+
3		10个	+
4		1个	+
5		0个	-

将含有目标序列的plasmid DNA作为模板的PCR		
Lane No.	Plasmid copy数	PCR产物
6	20000 copy	+
7	2000 copy	+
8	200 copy	+
9	20 copy	+
10	0 copy	-

IV. Q&A

II - (3) 关于使用SRV™ iPSC-2 Vector的人外周血单个核细胞和单核细胞细胞由来iPS细胞诱导方案

Q1 为什么接种了感染细胞,但细胞非常的少?

A1 在操作中有细胞损失的可能性。由于单核细胞在用角转子离心时容易粘附在试管内,所以请使用水平转子离心。此外,请注意用无血清培养基制备细胞时会更容易损失细胞。

Q2 不容易形成集落怎么办?

A2 感染10天后集落才会形成,还请耐心等待。

Q3 想在P1时采集10个以上的细胞集落,接种1孔可以吗?

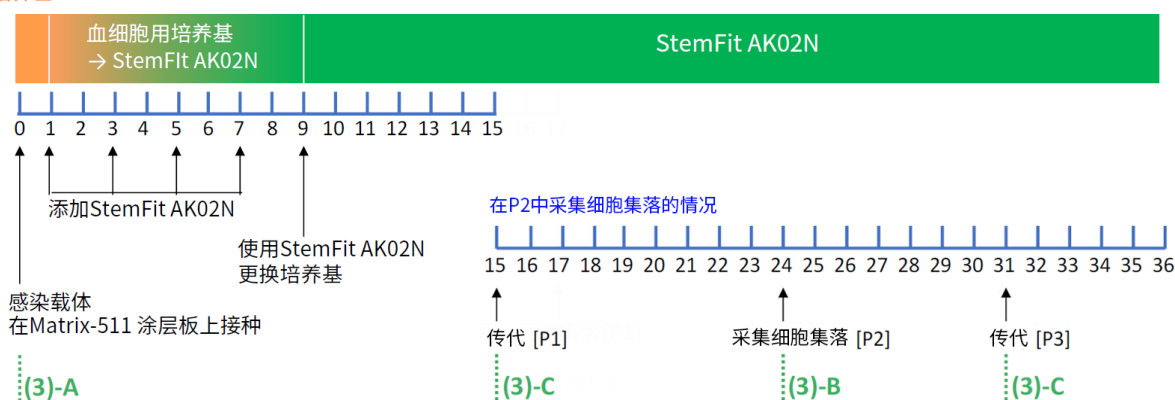
A3 1×10^5 cells/well接种2孔以上会比较好。

Q4 想在P1时采集细胞集落,但有EGFP阳性细胞混入?

A4-1 此时即使混入了一部分EGFP阳性细胞,之后也能够通过传代减少其数量。

A4-2 P1时将孔中细胞全部剥离,转移6孔板中进行传代会减少混入的EGFP阳性细胞,在P2时可简单采集细胞集落。P1的细胞数请按照 $0.1 \times 10^4 \sim 0.5 \times 10^4$ cells/well进行接种。

血细胞用
培养基



Q5 EGFP阳性细胞一直不消失怎么办?

A5-1 采集细胞集落时请选择EGFP阴性集落。

A5-2 因为能使用与SRV™ iPSC-1 Vector相同的siRNA,请尝试导入siRNA。(参考实验方案(1)-B)

富士胶片和光(广州)贸易有限公司

广州市越秀区先烈中路69号东山广场30楼3002-3003室
北京 Tel: 13611333218 上海 Tel: 021 62884751
广州 Tel: 020 87326381 香港 Tel: 852 27999019
询价: wkgz.info@fujifilm.com
官网: labchem.fujifilm-wako.com.cn

官方微信



目录价查询



2212TBCU01