



使用SRV™ iPSC-1 载体诱导人皮肤成纤维细胞来源iPS细胞的方案
(TKB_P-001-03)

目录

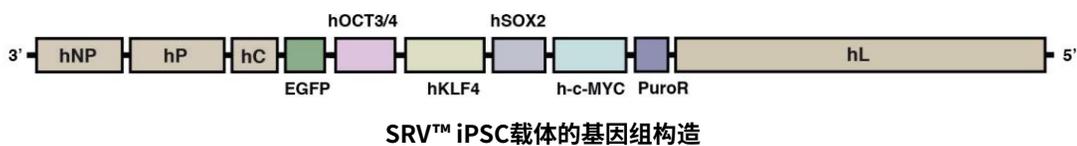
I . 关于SRV™ iPSC Vector	p.1
II . 关于使用SRV™ iPSC Vector的iPS细胞诱导方案	p.2
(1) 使用SRV™ iPSC-1 Vector诱导人皮肤成纤维细胞成为iPS细胞的方案	p.3
III. 通过RT-PCR检测SRV™来源RNA的方法	p.8
IV. Q&A	p.9

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

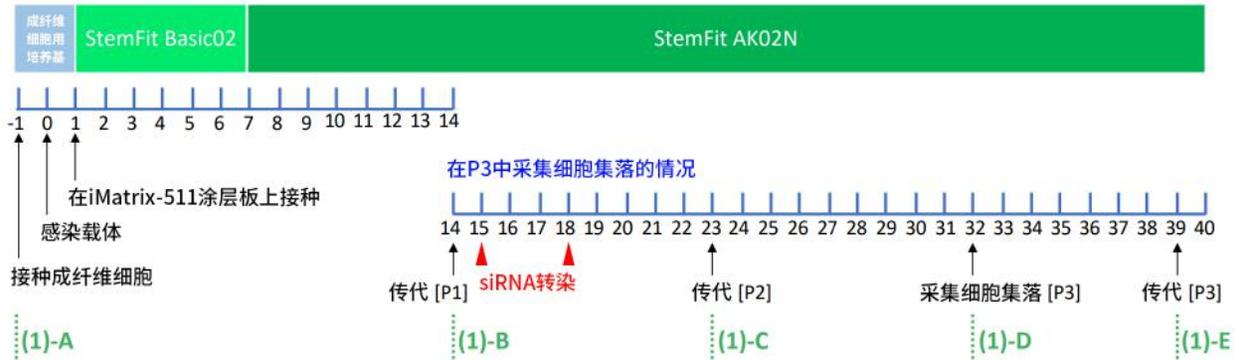
本方案无法保证一定能够从用户的目标细胞中诱导出iPS细胞。

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。

(1) 使用SRV™ iPSC-1载体的人皮肤成纤维细胞来源iPS细胞诱导方案

实验流程



A. 细胞集落的诱导

【所需材料】

细胞：人皮肤成纤维细胞

试剂：SRV™ iPSC-1 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。

成纤维细胞用培养基（也可以使用符合实验目的或适合细胞的无血清培养基等其他培养基）

DMEM/10%FBS

iPS细胞用培养基

StemFit® Basic02 (AJINOMOTO, BASIC02)

StemFit® AK02N (AJINOMOTO, AK02N)

PBS(-)

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

TrypLE™ Select Enzyme (ThermoFisher SCIENTIFIC, 12563011)

台盼蓝试剂

器材：培养板

感染——12孔板

iPSC诱导——24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】

Day -1

1. 在12孔板上按照1 × 10⁵ cells/well进行接种，使成纤维细胞的密度在次日达到70~80%。

Day 0

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

1 × 10⁵ cells × MOI=3 → 计算3 × 10⁵ CIU所需载体量

例) 当3 × 10⁷ CIU/mL时，结果为10 μL

3. 计算所需培养基的量，使其与2. 中计算出的载体量总计为500 μL。

4. 用室温水快速解冻后稍加离心,使用前放置于冰上。
5. 去除在1.中准备的细胞的培养基,根据2.3.的计算结果加入载体以及培养基。
6. 室温(推荐放置于安全柜)孵育2 h后,在37°C、5% CO₂的条件下培养一晚。
7. 去除载体液,使用1 mL PBS(-)清洗3次后,加入300 μL的TrypLE Select,在37°C的孵育箱中反应5 min。
8. 加入500 μL的成纤维细胞用培养基,用吸管吸放并剥离细胞后收集在1.5 mL离心管中。
9. 离心(200 x g, 5 min, 4°C)并去除上清后,将细胞悬浮在300 μL的培养基中并计算细胞数量。
10. 向已涂层iMatrix-511的24孔板(x 2孔)中添加500 μL的StemFit Basic02,将感染细胞按照0.5 x 10⁴, 1.0 x 10⁴ cells/well进行接种。

(虽然具体接种密度视细胞的状态而定,但在24孔板上按照0.25 x 10⁴ cells以上的密度接种便能获得细胞集落)

11. 接种后立刻摇动平板使细胞均匀分散。
12. 在37°C、5% CO₂的孵育箱中进行培养。

Day 2以后

13. 从接种后第2天起,每隔1天使用StemFit Basic02更换培养基。
14. 从感染后第7天起,每天或每隔1天使用StemFit AK02N更换培养基。

Day 14以后

细胞集落扩大、稳定成型后,挑选状态良好的板孔进行传代。 → B. 伴随siRNA转染的传代

B. 伴随siRNA转染的传代

【所需材料】

细胞:混有iPS细胞重编程诱导中的EGFP阳性细胞的细胞

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, 10mM (FUJIFILM Wako, 036-24023)

Opti-MEM™ I Reduced Serum Free Medium (ThermoFisher SCIENTIFIC, 31985070)

Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent (ThermoFisher SCIENTIFIC, 13778075)

10 μM siTB1 (序列描述见p.1)

台盼蓝试剂

器材:培养板 - 24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】

Day 14以后

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 μM)。
=[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200 μL的Accutase。
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300 μL的AK02N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300 μL [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24孔板 (x 2孔) 中添加 500 μL 的[AK02N+Y培养基], 按照 0.75×10^4 , 1×10^4 cells/well接种细胞。
8. 接种后立刻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。

传代次日

9. 使用500 μL 不含Y-27632的AK02N培养基进行培养基的更换。
10. 进行siRNA转染。Final为40 nM。

向opti-MEM中添加siRNA并混合→加入Lipofectamine RNAiMAX再次混合→室温静置20 min→添加至细胞

24孔板	10 μM siRNA	RNAi MAX	Opti-MEM	AK02N
每孔的量	2.5 μL	1.25 μL	125 μL	500 μL

传代后第3天

11. 使用AK02N更换培养基。

传代后第4天

12. 使用AK02N更换培养基后, 与传代后第2天同样进行siRNA的转染。

传代后第6天

13. 使用AK02N更换培养基。

传代后第8天及以后

14. 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, 挑选状态良好的板孔进行传代。→ C. 为采集细胞集落进行的传代

C. 为采集细胞集落进行的传代

【所需材料】

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

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 μM)。
=[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 200 μL 的Accutase。
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。重新使用300 μ L的AK02N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300 μ L[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6孔板 (x 2孔) 中添加1.5 mL/well的[AK02N+Y培养基], 按照 0.2×10^4 , 0.4×10^4 cells/well接种细胞。(由于需要进行采集, 因此推荐在6孔板中按照 $0.1 \times 10^4 \sim 0.5 \times 10^4$ cells/well进行接种。)
8. 接种后立刻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, 进行细胞集落的采集。→ D. 采集细胞集落

D. 采集细胞集落

【所需材料】

细胞: iPS细胞重编程诱导中的EGFP阴性细胞集落

试剂: iPS细胞用培养基 - StemFit® AK02N (AJINOMOTO, AK02N)

PBS(-)

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

CultureSure® Y-27632, 10mM (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吸放后, 转移到4. 的培养板中
采集细胞集落的第2天、第2天以后
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。→ E. 传代

E. 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, 0.5mg/mL (nippi, 892012)
Accutase (ICT, AT104)
CultureSure® Y-27632, 10mM (FUJIFILM Wako, 036-24023)
台盼蓝溶液

器材: 培养板 - 24孔板/12孔板/6孔板 (根据实验目的选择)
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。
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[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阳性细胞时, 按照 0.1×10^4 cells/well在24孔板上进行接种即可)
8. 接种后立刻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	

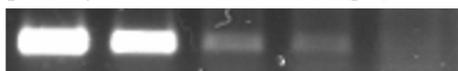
primer sequence (引物序列)		PCR product size (PCR产物大小)
MOP104	ATATGGAGTACGAGAGGACC	500bp
MOP105	CCTCAGGTTGGAGAGAGTCA	

【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 - (1) 关于使用SRV™ iPSC-1 Vector的人皮肤成纤维细胞由来iPS细胞诱导方案

Q1 在已涂层的平板上接种细胞的第2天往后,为什么很多细胞都脱落了?

A1 当基因被导入细胞后,由于转录因子呈高表达状态,所以细胞会变得容易从平板上脱落;出现上述情况时,请将原本为室温2 h的感染时间缩短0~30 min,或增加接种细胞数。

Q2 siRNA的转染必须要在传代次日进行吗?

A2 去除Y-27632并进行培养基的更换必须在传代次日进行,而siRNA的转染在传代的次日、也就是细胞处于分散状态时进行效果是最好的,因此推荐在传代次日进行siRNA的转染。
另外,请注意应该避免在传代当天进行siRNA的转染,否则会对细胞造成巨大伤害。

Q3 可以在P1进行细胞集落的采集吗?

A3 虽然也可以在P1进行细胞集落的采集,但因为难以判断此阶段的细胞集落是否来源于单个细胞,并且考虑到此时需要导入siRNA进行转染所以并不建议。

Q4 可以在P2进行细胞集落的采集吗?

A4 虽然此阶段的细胞集落会混有一部分EGFP阳性细胞,但可以进行采集。
请在P1时,于6孔板中按照 $0.75 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^4$ cells/well进行接种,然后和(1)-B同样进行siRNA的转染(试剂量为4倍)。等待细胞集落扩大后,选择EGFP阴性或EGFP较弱的细胞集落进行采集。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。

Q5 我想要建立10份克隆该怎么做呢?

A5 将感染细胞在24孔板上进行10孔接种即可实现。之后请按照方案的流程,从每孔中挑选1个细胞集落。

Q6 不采集细胞集落也不进行克隆也可以建立iPS细胞吗?

A6 可以。
在P2的siRNA转染(1次)时追加进行传代,继续传代会导致EGFP阳性减少,直至只剩下EGFP阴性的细胞集落。



Q7 EGFP阳性细胞一直不消失怎么办?

A7 请追加进行siRNA转染。(参考方案(1)-B)

万一出现了经过上述操作依旧观察不到EGFP阳性细胞减少的特殊情况,请在采集细胞集落时选择EGFP阴性细胞集落进行采集。

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



2212TBAU01