

在涂有 Vivogel™ StemCoat 的组织培养板上培养和维持人胚胎干细胞 (ESCs) 和诱导多能干细胞 (iPSCs)

应用指南

产品编号 #: VM003-10

产品规格: 10mL

应用简介

基于诱导多能干细胞 (iPSC) 的模型在人类发育和疾病研究中具有巨大潜力。在无饲养层条件下维持和扩增人多能干细胞 (人胚胎干细胞[ES]和人诱导多能干细胞[iPS]) 可以消除饲养细胞固有的生物变异性 (培养系统中未定义的成分), 并提高实验的可重复性。理想的 iPSC 研究环境包括专门适用于 iPSC 细胞的培养表面和无血清、成分明确的培养基。**Vivogel™ StemCoat** 作为一种高质量的培养表面与培养基组合, 为 iPSC 的无饲养层扩增提供了完整的支持环境。

Vivogel™ Matrix 是从小鼠肉瘤组织中提取的可溶性基底膜, 包含层粘连蛋白 (糖蛋白)、IV 型胶原、巢蛋白 (糖蛋白)、基底膜蛋白聚糖 (硫酸乙酰肝素蛋白聚糖) 等多种细胞外基质蛋白及必需生长因子。**Vivogel™ Matrix** 已广泛应用于干细胞培养、血管生成实验和组织工程等领域。**Vivogel™ StemCoat** 是专为支持 iPSC 的贴附和扩增而优化的产品, 每批次产品均经过验证, 能够与 mTeSR™1 (产品编号 85850, STEMCELL Technologies) 配合使用, 维持高质量的人 ES 和 iPS 细胞。

本指南展示了 **Vivogel™ StemCoat** 在 mTeSR™1 培养基中支持 iPSC 连续传代超过 20 次的 ability。在 **Vivogel™ StemCoat** 涂布的培养器皿中维持的细胞高表达多能性标志物 (如 Oct-3/4 和 SSEA-3), 并且通过畸胎瘤实验证实这些细胞能够分化为三胚层, 进一步证明了其多能性。

产品参数

浓度: 8-12 mg/mL

来源: 小鼠肉瘤组织

缓冲液: DMEM (含酚红) / DMEM (无酚红, PRF), 含 10 µg/mL 庆大霉素

储存条件: 长期保存需置于 -80°C; 4°C 保存超过 24 小时的产品不可使用。建议收货后分装, 避免反复冻融。

操作指南

A.a. Vivogel™ Matrix 的通用操作规范

按需从 -20/-80°C 解冻分装的 **Vivogel™ Matrix**。所有操作需在冰上进行, 并使用预冷的枪头与离心管。通过分装为一次性使用的小份以减少冻融次数。**注意:** 所有接触 **Vivogel™ Matrix** 的耗材或培养基需预冷至冰上温度, 解冻的 **Vivogel™ Matrix** 将在 10°C 以上的温度下快速固化。

A.b. 关键材料与试剂

产品名称	供应商	产品编号
mTeSR™1 完全培养基	STEMCELL Technologies	85850
Vivogel™ StemCoat	Vivomatter Biotech	VM003
温和细胞离解试剂	STEMCELL Technologies	100-0485
TrypLE™ select 重组酶	Thermo Fisher Scientific	12563011
CTS™ PSC 冻存培养基	Thermo Fisher Scientific	A4239301
Y-27632 (ROCK 抑制剂)	Sigma-Aldrich	Y0503
庆大霉素	Thermo Fisher Scientific	15750060
DPBS		
细胞培养板/瓶		
细胞刮刀		
50/15 mL 离心管		
台盼蓝		

B.a. 使用 Vivogel™ StemCoat 涂布培养器皿

与完整的干细胞培养基（如 mTeSR™1 完全培养基）配合使用时，请根据分析证书上提供的稀释系数准备 **Vivogel™ StemCoat** 的分装。分装体积通常为 270-350 μ L。

- 冰上解冻一份 **Vivogel™ StemCoat**。
- 将 25 mL 预冷的 DMEM/F-12（含 15 mM HEPES）加入 50 mL 离心管中，并保持在冰上。
- 将解冻的 **Vivogel™ StemCoat** 加入预冷的 DMEM/F-12 中（在 50 mL 离心管中），充分混匀。如有需要，可用预冷培养基冲洗分装管。
- 立即使用稀释后的 **Vivogel™ StemCoat** 溶液涂布组织培养板/瓶。推荐涂布体积请参见表 1。
- 轻轻摇晃培养板/瓶，使 **Vivogel™ StemCoat** 溶液均匀分布在表面。
注：如果培养板/瓶表面未被 Vivogel™ StemCoat 溶液完全覆盖，则不可用于人 ES 或 iPS 细胞培养。
- 在室温（15-25°C）下孵育至少 1 小时后再使用。避免 **Vivogel™ StemCoat** 溶液蒸发。
注：如不立即使用，需密封培养器皿以防止 Vivogel™ StemCoat 溶液蒸发（例如使用 Parafilm® 密封），涂布后的培养器皿可在 2-8°C 下保存最多 1 周。使用前需将保存的涂布培养器皿恢复至室温（15-25°C）30 分钟，然后继续步骤 7。
- 将培养板/瓶轻轻倾斜，使多余的 **Vivogel™ StemCoat** 溶液汇集在边缘。使用移液管或吸液器移除多余溶液，确保涂布表面不被刮伤。
- 立即加入完全培养基（例：使用 6 孔板时每孔加入 2 mL）。

表 1. 使用稀释后的 Vivogel™ StemCoat 溶液涂布推荐体积

培养器皿	溶液体积
6-孔板	1 mL/孔
100 mm 培养皿	6 mL/皿
T-25 cm ² 培养瓶	3 mL/瓶
T-75 cm ² 培养瓶	8 mL/瓶

C. 人 ES 和 iPS 细胞的传代

在 **Vivogel™ StemCoat** 涂布的培养器皿中培养的人 ES 和 iPS 细胞可以通过多种方法进行传代，包括酶解法和非酶解法。一下将介绍这些方法。温和的细胞离解试剂（STEMCELL Technologies）和 TrypLE™ Select 重组酶（Thermo Fisher Scientific）均与 **Vivogel™ StemCoat** 兼容。温和的细胞离解试剂用于无酶解法，生成的细胞团可能较为脆弱，应尽快重新接种。无酶法的优点在于其操作简便、细胞回收率高且能保护细胞表面蛋白的完整性（有助于细胞重新贴附基质）。

C.a. 温和的细胞离解试剂（非酶解法）

温和的细胞离解试剂（GCDR）是一种无酶试剂，用于通过手动刮取获得细胞团的方式传代人 ES 和 iPS 细胞。熟悉以下操作步骤后，可通过调整细胞团大小或接种密度来控制传代时间。以下为从 6 孔板的一个孔传代细胞的步骤。若使用其他培养器皿，请相应调整体积。

1. 传代前至少 1 小时，用 **Vivogel™ StemCoat** 涂布新板（参见 **B.b.**部分）。
2. 分装足够的完全培养基并预热至室温（15-25℃）。
3. 使用显微镜观察分化区域，并用记号笔在孔板底部标记。
4. 用移液枪头或吸液器刮除分化区域。避免将培养板从培养箱中取出超过 15 分钟。
注：若分化区域少于 5%，可不进行选择；若培养质量高，选择区域不应超过孔的 20%。
5. 吸去孔中的培养基，加入 1 mL GCDR。
6. 室温孵育 6-8 分钟。
7. 吸去 GCDR，加入 1 mL 完全培养基。用玻璃移液管或细胞刮刀轻轻刮取细胞团。
注：尽量减少细胞团的破碎。
8. 将脱落的细胞团转移至 15 mL 离心管中。可选：用额外的 1 mL 完全培养基冲洗孔以收集剩余的细胞团。
注：无需离心细胞团。
9. 使用 2 mL 移液管轻轻吹打细胞团混合物 2-5 次，根据需要打散细胞团。50-200 μm 大小的均匀细胞团悬液为最佳；避免生成单细胞悬液。
10. 将细胞团混合物以所需密度接种到涂布好的孔中，孔内需预先加入完全培养基。若细胞团密度合适，可每 4-7 天按 1:10 至 1:50 的比例传代（即 1 孔的细胞团可接种至 10-50 孔）。若细胞团过密或过稀，下次传代时调整比例。
注：尽快将细胞团转移至新培养器皿中以最大化细胞活力和贴附率。
11. 将培养板放入 37℃ 培养箱中，快速前后左右移动培养板以使细胞团均匀分布。24 小时内不要扰动培养板。
注：细胞团分布不均可能导致人 ES 和 iPS 细胞分化增加。
12. 每天更换完全培养基，观察细胞生长情况直至下次传代。

C.b. TrypLE™ Select 重组酶（酶解法）

TrypLE™ 为现有胰蛋白酶方案的直接替代品。以下为从 6 孔板的一个孔传代细胞的步骤。若使用其他培养器皿，请相应调整体积。

1. 传代前至少 1 小时，用 **Vivogel™ StemCoat** 涂布新板（参见 **B.b.**部分）。

2. 显微镜下观察细胞。若需成像，可通过更换培养基去除死细胞。期间建议使用培养基而非 DPBS，因为长时间 DPBS 孵育可能导致细胞脱落。
3. 弃去培养基。
4. 用 1 mL DPBS 洗涤一次并吸去。
5. 每孔加入 300 μ L 0.5X TrypLE™ Select 重组酶并均匀覆盖表面。
6. 将培养板置于 37°C、5% CO₂培养箱中孵育 1 分钟。
7. 1 分钟后取出培养板，轻轻重新分布 TrypLE™ Select 重组酶。
8. 继续孵育 3 分钟（总计 4 分钟）。
9. 取出培养板，显微镜下观察细胞（细胞应呈分离且圆形状态。4 分钟孵育会破坏细胞间连接，但细胞仍贴附于基质。注意：更长时间孵育会导致细胞脱落）。
10. 吸去 0.5X TrypLE™ Select 重组酶。
11. 用 2 mL/孔 DPBS 洗涤一次（轻轻加入 DPBS，因细胞易脱落）。
12. 每孔加入 1 mL 培养基。
13. 用细胞刮刀刮取细胞。
14. 显微镜下确认细胞已脱落。
15. 吹打细胞 10 次以完全解离，将细胞悬液转移至 15 mL 离心管中（防止细胞重新贴附）。
16. 使用自动细胞计数器（Countess）（iPSC 程序：灵敏度 5，最小尺寸 8，最大尺寸 30，圆形度 75）通过台盼蓝染色计数细胞。
17. 将 13,000 个活细胞接种到涂有 **Vivogel™ StemCoat** 的 6 孔板（10 cm²）中（立即均匀分布细胞以避免贴附不均）。
18. 将培养板置于 37°C、5% CO₂培养箱中培养。
注：每天更换培养基。若培养基变橙或黄色，需立即更换。通常在 8 天（ ± 1 天）内可获得约 1×10^6 个细胞（100 倍扩增）。

D. 细胞的冻存与复苏

在 **Vivogel™ StemCoat** 涂布的培养器皿中维持的人多能干细胞可通过细胞团或单细胞形式冻存，使用 CTS™ PSC 冻存培养基（Thermo Fisher Scientific）等冻存液。适用于本手册中描述的常规细胞团传代方法。以下复苏方案适用于冻存前在 mTeSR™1 中维持的人 ES 和 iPSC 细胞。

D.a. 以细胞团形式冻存细胞

注：打开冻存液瓶前，用 70%乙醇或异丙醇擦拭瓶外。

以下为使用 CTS™ PSC 冻存培养基冻存在 **Vivogel™ StemCoat** 涂布的 6 孔板中培养的细胞的步骤。应在细胞正常传代时进行冻存。每管应包含 1 孔 6 孔板的细胞团。若使用其他培养器皿，请相应调整体积。

1. 解冻并预冷 CTS™ PSC 冻存培养基至 2-8°C。
2. 使用无酶传代法（至步骤 8，**C.a.**部分）或酶解法（至步骤 15，**C.b.**部分）传代细胞。
3. 室温（15-25°C）下 300 \times g 离心 5 分钟。
4. 轻轻吸走弃置上清，注意不要扰动细胞沉淀。
5. 用 1 mL/孔的预冷（2-8°C）CTS™ PSC 冻存培养基轻轻重悬细胞沉淀，尽量减少细胞团破碎。
6. 使用 2 mL 移液管将 1 mL 细胞团混合物转移至标记好的冻存管中。
7. 可以采用以下任一方法冻存细胞团：
 - 标准慢速程序降温法，以约 -1°C/分钟降温，随后长期保存于 -196°C（液氮）或更低温度。不建议长期保存于 -80°C。
 - 多步降温法：-20°C 保存 2 小时，随后 -80°C 保存 2 小时，最后长期保存于 -196°C（液氮）或更低温度。

D.b. 以单细胞形式冻存细胞

注：打开冻存液瓶前，用 70%乙醇或异丙醇擦拭瓶外。

以下为冻存在 **Vivogel™ StemCoat** 涂布的 6 孔板中培养的细胞的步骤。若使用其他培养器皿，请相应调整体积。应在细胞正常传代时进行冻存。

1. 使用前将培养基、温和细胞离解试剂 (GCDR) 和 DPBS (不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}) 预热至室温 (15-25°C)。
2. 用 1 mL DPBS (不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}) 洗涤待传代的孔。
3. 吸去洗涤液, 加入 1 mL GCDR, 37°C 孵育 8-10 分钟。
注: 使用不同细胞系或其他传代试剂时, 孵育时间可能不同。
4. 用移液管上下吹打以确保单细胞悬液, 将细胞转移至 15 mL 离心管中。用 2-4 mL 培养基冲洗孔并加入离心管。
5. 使用台盼蓝染色进行活细胞计数。
6. 室温 (15-25°C) 下 $300 \times g$ 离心 5 分钟。
7. 小心吸去上清, 留少量培养基以免扰动细胞沉淀。轻弹离心管重悬细胞沉淀。
8. 加入预冷 (2-8°C) CTS™ PSC 冻存培养基, 使细胞悬液浓度为 1×10^6 个细胞/mL, 充分混匀。
9. 将 1 mL 单细胞悬液转移至每个冻存管中。

D.c. 以细胞团形式复苏细胞

人 ES 和 iPS 细胞应复苏至 **Vivogel™ StemCoat** 涂布的培养器皿中 (参见 B.b.部分)。通常, 按上述方法冻存的一管细胞可成功复苏至 1-2 孔 6 孔板中。

1. 复苏前准备好所有试管、预热的完全培养基 (15-25°C) 和涂布好的培养器皿, 以确保复苏过程快速完成。
2. 用 70%乙醇或异丙醇擦拭细胞冻存管外壁。
3. 在生物安全柜中, 拧松管帽四分之一圈以释放内部压力, 然后重新拧紧。
4. 在 37°C 水浴中轻轻摇晃冻存管快速解冻细胞。当剩余少量冻存细胞团时取出冻存管。不要涡旋振动细胞。
5. 用 70%乙醇或异丙醇擦拭冻存管外壁。
6. 使用 2 mL 移液管将冻存管内容物转移至 15 mL 离心管中。
注: 使用 2 mL 移液管而非 1 mL 移液器可减少细胞团的破碎。
7. 逐滴加入 5-7 mL 预热的完全培养基至 15 mL 离心管中, 轻轻混匀。
8. 室温 (15-25°C) 下 $300 \times g$ 离心 5 分钟。
9. 吸去培养基, 保留细胞沉淀。用 2 mL 移液管轻轻重悬细胞沉淀于 1 mL 完全培养基中, 注意保持细胞团状态。
10. 将 0.5 mL 细胞混合物转移至涂布好的 6 孔板中 (每孔含 mTeSR™1, 即每管可接种 2 孔)
注: 根据冻存的细胞团数量调整接种孔数。通常复苏后需接种更多细胞团。
11. 将培养板放入 37°C 培养箱中, 快速前后左右移动培养板以均匀分布细胞团。24 小时内不要扰动培养板。
注: 细胞团分布不均可能导致人 ES 和 iPS 细胞分化增加。
12. 每天更换 mTeSR™1 培养基, 观察细胞生长情况直至下次传代。通常在复苏后 6-7 天检查是否有未分化的细胞团 (中心密集) 可供传代。
注: 若复苏后仅观察到少量未分化细胞团, 可选择这些细胞团传代并重新接种至新涂布的孔中 (即不进行分盘)。

D.d. 以单细胞形式复苏细胞

人 ES 和 iPS 细胞应复苏至 **Vivogel™ StemCoat** 涂布的培养器皿中 (参见 B.b.部分)。通常, 按上述方法冻存的一管细胞可成功复苏至 1-2 孔 6 孔板中。

1. 复苏前准备好所有试管、预热的完全培养基 (15-25°C) 和涂布好的培养器皿, 以确保复苏过程快速完成。
2. 在完全培养基中加入 Y-27632 (ROCK 抑制剂) 至终浓度 10 μM 。
3. 用 70%乙醇或异丙醇擦拭细胞冻存管外壁。
4. 在生物安全柜中, 拧松管帽四分之一圈以释放内部压力, 然后重新拧紧。
5. 在 37°C 水浴中轻轻摇晃冻存管快速解冻细胞。当剩余少量冻存细胞团时取出冻存管。不要涡旋振动细胞。
6. 用 70%乙醇或异丙醇擦拭冻存管外壁。

7. 使用 1 mL 移液器将冻存管内容物缓慢转移至含 5-7 mL DMEM/F-12 (含 15 mM HEPES) 的 15 mL 离心管中。
8. 室温 (15-25°C) 下 300 × g 离心 5 分钟。
9. 小心吸去上清, 留少量培养基以免扰动细胞沉淀。
10. 加入 1 mL 含 10 μM Y-27632 的完全培养基, 轻轻混匀。
11. 将细胞接种至涂布好的培养器皿中。
注: 通常, 一管含 1×10^6 个细胞的冻存管可复苏并接种至 1-2 孔 6 孔板中。
12. 将培养器皿放入 37°C 培养箱中, 快速前后左右移动以均匀分布细胞。
13. 每天更换完全培养基 (不含 Y-27632), 观察细胞生长情况直至下次传代 (即 80-90% 汇合)。通常在复苏后 2-5 天达到。
注: 不同细胞系达到 80-90% 汇合的时间可能不同, 需显微镜下观察以确定最佳传代时间。
14. 使用标准技术传代细胞以生成细胞团。
注: 不建议连续单细胞传代, 因会增加核型异常的风险。

数据展示

按照上述方案，在 **Vivogel™ StemCoat** 涂布的培养器皿中对人 iPS 细胞进行了培养和传代测试。在 **Vivogel™ StemCoat** 涂布的培养器皿中培养的未分化人 iPS 细胞生长为致密的多细胞集落，具有清晰的边界特征（图 1）。

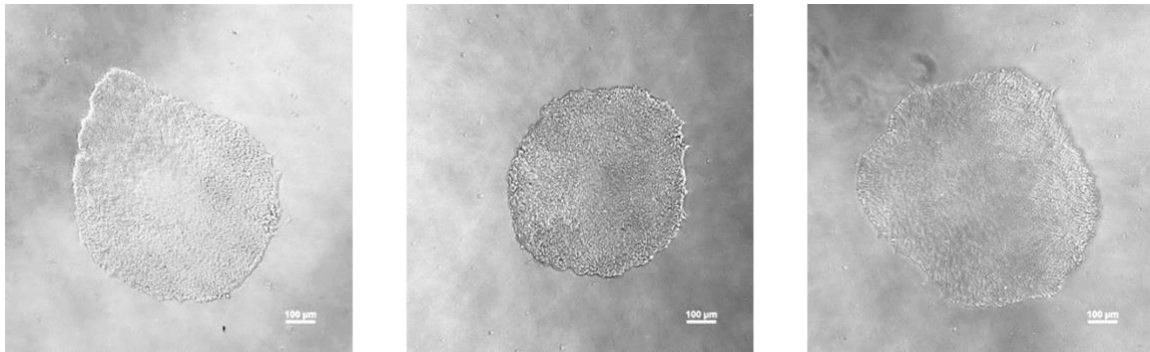


图 1. 在 **Vivogel™ StemCoat** 涂布的培养板上培养的未分化人 iPS 细胞。

未分化的人 iPS 细胞还可通过特异性生物标志物的免疫细胞化学（ICC）染色进行表征（图 2）。

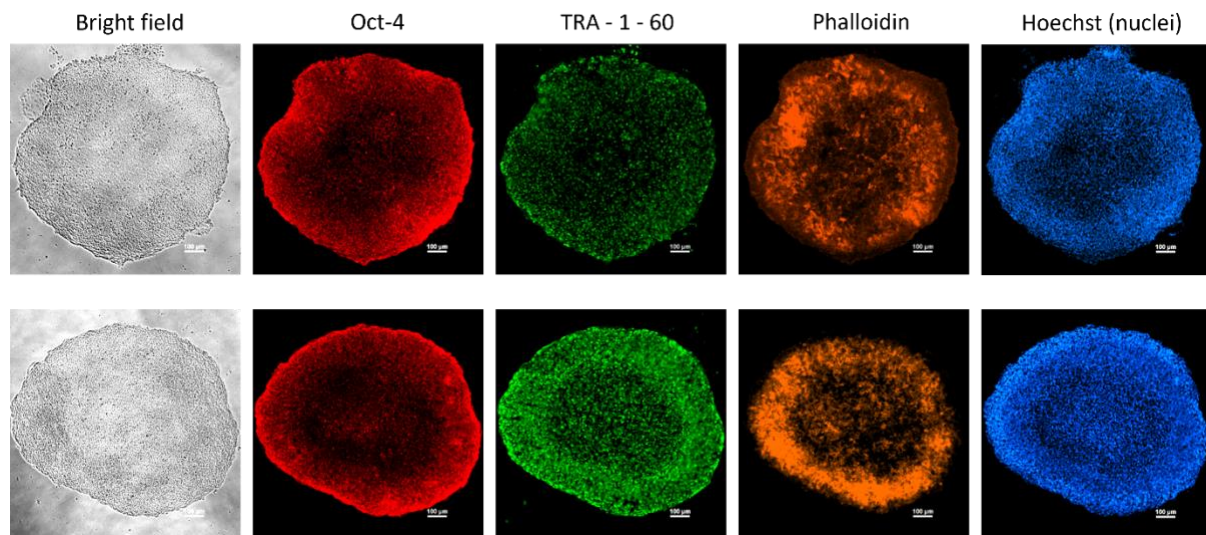


图 2. 在 **Vivogel™ StemCoat** 涂布的培养板上培养的人诱导多能干细胞（iPSCs）免疫染色。iPSCs 在 **Vivogel™ StemCoat** 培养 6 代后仍然维持了多能性标志物 Oct-4 和 TRA-1-60 的表达。图 1. 裸鼠体内形成的 LLC 异种移植瘤