

IPS 操作指南-慢病毒

IPS 简介:

iPS 细胞是通过基因转染技术 (gene transfection) 将某些转录因子导入动物或人的体细胞使, 体细胞直接重构成为胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 细胞样的多潜能细胞。现在大多是通过病毒携带特定的转录因子进入体细胞内, 来获得多能性干细胞。2006 年日本京都大学 Shinya Yamanaka 在世界著名学术杂志《细胞》上率先报道了诱导多能干细胞的研究。他们把 Oct3/4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 这四种 [转录因子](#) 基因克隆入 [病毒载体](#), 然后引入小鼠 [成纤维细胞](#), 发现可诱导其发生转化, 产生的 iPS 细胞在形态、基因和蛋白表达、表观遗传修饰状态、细胞倍增能力、类胚体和畸形瘤生成能力、分化能力等方面都与 [胚胎干细胞](#) 相似。

现分别介绍一下小鼠的和人的 iPS 的诱导步骤。

一、实验材料

慢病毒包装体系 (来自 [汉恒生物](#), Hanbio™):

慢病毒表达质粒 plvx-OCT4、plvx-SOX2、plvx-KLF4 和 plvx-c-MYC (来自 [汉恒生物](#), Hanbio™);

辅助质粒 PSPAX2 和 PMD2 (来自 [汉恒生物](#), Hanbio™);

病毒包装细胞: 293T 细胞 (来自 [汉恒生物](#), Hanbio™);

ES Feeder 细胞: MEF (C57) (来自 [汉恒生物](#), Hanbio™)。

二、实验仪器和耗材

(一) 实验仪器

二级安全柜、37 度培养箱、4 度冰箱、液氮储存器、倒置显微镜、低温离心机。

(二) 实验耗材

PBS、无菌水、明胶粉、DMEM 培养基、FBS、非必须氨基酸、β-巯基乙醇、胰酶、血清替代物 (SR)、mTESR1、T75 培养瓶、无菌水、15ml 离心管、50ml 离心管, 巴氏管等。

三、ips 诱导方法

(一) Feeder 细胞

1、Feeder 细胞的分离 (MEF)

取妊娠 13.5-14.5d 的孕鼠，在无菌情况下取出胎鼠，去除鼠头，尾，四肢及内脏，然后用 PBS 进行冲洗。

将胎体剪碎成小于 1mm^2 的组织块，1000rpm, 3min, 去掉上层 PBS, 加入 0.25%胰酶-0.04%EDTA $2\sim 3\text{ml}$ 浸泡组织块，常温消化 $2\sim 3\text{min}$ 。

轻微吹打，待较多细胞溢出后，加入等量的 10%FBS DMEM 终止消化，通过 100 目滤网过滤后，将获得的液体离心，1000rpm, 5min。

弃上清，加入培养基重悬细胞，调整细胞密度约 2×10^5 个/ml，用 10%FBS 的 DMEM 进行培养。

2、MEF 细胞的传代培养

在倒置显微镜下观察，当成纤维细胞汇合度达到 80%~90%时，去掉培养基，用 PBS 清洗两遍，加入 2ml 0.25%胰酶-0.04%EDTA 消化液进行消化。

镜下观察，当细胞间出现裂隙，细胞变圆时，加入等量的 MEF 培养液终止消化，并用滴管反复轻轻吹打成单细胞悬液。

将单细胞悬液转移至离心管中，以 1000rpm 离心 5min，弃上清，加入 MEF 培养液将细胞重悬，按 1:2~3 传代。置于 37 度、5%CO₂ 培养箱中培养。

3、Feeder 制备

选择对数生长期的 MEF，在培养基中加入丝裂霉素 C 在 37 度，5%CO₂ 条件下处理 $2\sim 3\text{h}$ ，加入的丝裂霉素 C 浓度为 0.4mg/ml，使得终浓度为 12ug/ml。

处理结束后，吸取带有丝裂霉素 C 的培养基，用 PBS 清洗细胞两次后，加入 0.25%胰酶-0.04%EDTA 覆盖细胞表层，37 度孵育 6mins。

用含有血清的培养基终止胰消化，然后将细胞重悬，吹散，细胞计数，按每个 6cmdish 中放入 4×10^5 个细胞或 3×10^4 个细胞每 cm^2 分放，加入适量培养基，置于培养箱中备用。

注：至少要放置 2h 后才可植入 ES 细胞。

(二) 慢病毒包装:

293T 包装 OCT4, SOX2, KIF4, c-MYC 四个慢病毒, 具体包装步骤详见[汉恒生物](#)公司病毒包装步骤。您也可联系[汉恒生物](#)市场专员直接购买 Hanbio™ 的 ips 系列病毒产品。

注:

1. 小鼠的 IPS 可用小鼠和人的 4 因子进行诱导, 而人的基因推荐使用人的 4 因子进行诱导, 虽然也有人的细胞用小鼠 4 因子诱导成功的先例, 但由于 human 细胞的调控机制更加复杂, 失败的风险会进一步上升。

2. [汉恒生物](#)已构建好全面的 ips 系列因子的各种病毒或非病毒载体: 包括慢病毒, 逆转录病毒, 腺病毒, 质粒载体等 (单因子多个质粒和多因子单个质粒)。另外, 我们的技术工程师拥有丰厚的 ips 建系及维护经验, 随时欢迎咨询。

(三) 小鼠 IPS 诱导方法

Feeder 细胞和病毒都准备好后, 则可以开始 iPS 的诱导, 首先需要用 0.1%gelatin 预包被所要用的培养皿, 包被时间约 10min。

待细胞生长良好时, 用 0.25%胰酶消化, 收集到一个 15ml 离心管中, 进行细胞计数, 在十二孔板的每个孔中加入 4×10^5 个左右的细胞, 其中两个孔中的细胞用于作对照, 比较转染的效率以及逆分化的效率。

等细胞长到汇合度为 70%, 加入新鲜的病毒液, 根据细胞数量混合好所需的病毒 (含有 OCT4, SOX2-, KLF4- and c-MYC 基因的病毒), 将四个病毒按同等量混匀后, 用 0.45um 过滤器过滤以除去其中的细胞碎片等杂质, 避免对后续实验的影响。

在过滤好的病毒混合液中加入 5ul 浓度为 10ug/ml 的助转剂 ploybrene, 混匀后加入目的细胞的培养上清中。

病毒感染 24h 后, 将感染的细胞消化下来, 铺到事先处理好的 MEF 细胞上 (六孔板约 5000/well), 第二天, 将培养基换成 ESC 培养液 (LIF 10 ng/ml), 继续培养, 以后每 2 天换液一次。

逐日观察, 待细胞长至第 5-7 天后, 可见小的细胞聚集, 细胞形态已经明显发生了改变, 由梭形变圆形, 生长聚集到一起。

一周后, MEF 使用时间过长, 需要重新更换新鲜的制备好的 MEF, 将进行诱导的细胞按 1: 10 比例传代至新制备好的 MEF 上继续生长。

待细胞长至半个月左右，可以挑克隆，将 ES 样的克隆挑至新的 MEF 上，按 ES 的培养方法继续培养，扩增即可。

(四) 人 IPS 诱导方法

1. Feeder 法

人 IPS 诱导中需要的 Feeder 细胞分离、培养方法以及病毒包装过程同小鼠 ips 诱导，不同的是 IPS 的具体诱导方法。

病毒收集好后，就可以进行病毒感染目的细胞，从而进行 ips 的诱导了，首先要将细胞进行铺板，保证细胞的浓度为 8×10^4 个/ml, 单个 10cm 培养皿中植入 8×10^5 个细胞，然后将细胞静置于 37 度培养箱中进行培养过夜。

将带有 OCT4-, SOX2-, KLF4- and c-MYC 四个基因的病毒混合均匀，并在其中加入浓度为 10ug/ml 的助转剂 ploybrene，使得终浓度为 $4 \mu\text{g/ml}$ ，均匀混合好。

吸取目的细胞中的培养基，加入病毒混合液，并加入新鲜培养基补充至 10ml，将细胞静置于 37 度培养箱中 4h 或者过夜，进行换液。

感染结束后，将细胞转移到铺有 Feeder 细胞的培养皿中继续培养，并换为人 ES 细胞培养液，并每天换液。

观察细胞生长状态，直到能观察到明显的细胞克隆产生，一般在 20 几天可以观察到成熟的细胞克隆。

当成熟的克隆形成后，将具有良好 ES 特征的克隆挑至另外一个铺有处理好的 Feeder 细胞的培养皿中继续培养。

2. Feeder free 法（单层培养）

病毒感染过的 human 来源细胞，接种至铺了 Matrigel (BD) 的 6cm 培养皿中（约 50000-100000/well），加入 mTeSR1 培养液，持续培养，每两天换液一次，至克隆形成用巴氏管（普通巴氏管酒精灯加热后拉伸，头部要圆）将克隆划成小块，挑出成熟克隆扩大化培养。

四、ips 的检测

1. 提取 ips 克隆 RNA，RT-PCR 检测四因子表达情况（PCR 引物序列暂不对外提供，如有需要请联系[汉恒生物](http://www.hanbio.net)）；

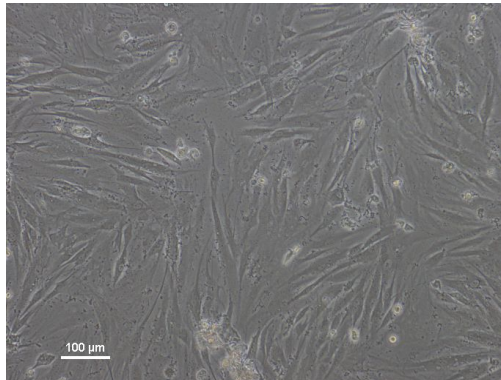
2. 免疫组化检测全能型 marker；

3. ALP 染色检测细胞全能性。

Marker	App		Marker	App
Anti-Oct4	Mouse ips/mES		Anti-Oct4	Human ips/mES
Anti-Sox2			Anti-Sox2	
Anti-SSEA1			Anti-SSEA1	
ALP staining			Anti-SSEA4	
			Anti-Tra-1-60	
			Anti-Tra-1-81	
			ALP staining	

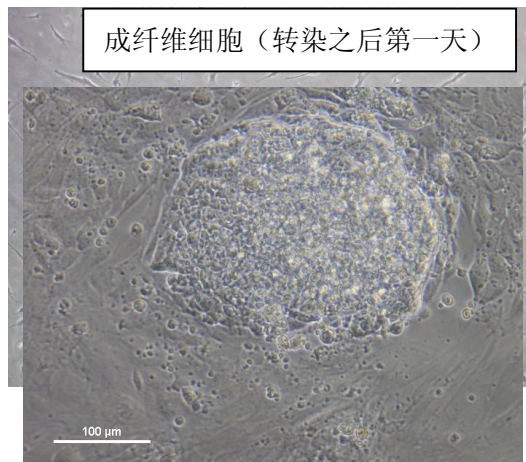
Reference:

1. Jia, F. et al. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat. Methods* 7, 197 - 199 (2010).
2. Kaji, K. et al. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458, 771 - 775 (2009).
3. Nakagawa, M., Takizawa, N., Narita, M., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 14152 - 14157 (2010).
4. Morita, S., Kojima, T. & Kitamura, T. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther.* 7, 1063-6 (2000)
5. McMahon, A. P. & Bradley, A. The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 62, 1073-85. (1990)
6. Fujioka, T. et al. A simple and efficient cryopreservation method for primate embryonic stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 1149-54 (2004)



图示:

成纤维细胞（转染之前）



成纤维细胞（转染之后第一天）

克隆样细胞（转染之后第 21 天）