

IPS 操作指南--腺病毒

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。

用 Retrovirus、Lentivirus 诱导 IPS 成功的例子已经非常多, 但是由于 retrovirus 和 lentivirus 的基因组整合性, 往往伴随基因组的破坏与癌化。用 Lentivirus 和 retrovirus 建立的 IPS 子宫移植繁衍而成的克隆鼠往往都伴随着肿瘤的高发生率。Adenovirus (腺病毒) 是一类滴度极高, 不整合基因组, 可以简单实现高效感染的病毒载体, 近年来以 Adenovirus 介导的 IPS 诱导已被证实成功且安全。

一、实验材料

腺病毒 OSKM 四因子: Ad-OCT4、Ad-SOX2、Ad-KLF4 和 Ad-c-MYC (来自 [汉恒生物](#), Hanbio™);

病毒扩增细胞: 293A 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 2~3ml 浸泡组织块，常温消化 2~3min。

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 2~3h，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 6cm dish 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）腺病毒的扩增：

1) 按每个 75cm² 方瓶中接种 4×10^6 293 细胞，接种 6 个 75cm² 培养瓶，培养过夜，待细胞生长满至 90% 时，加 5ul 病毒液接种培养瓶内，感染 24-72 小时，待显微镜下观察发现有 60% 细胞病变。

2) 吹起细胞，收获病变细胞混悬液后，2000rpm 离心 5 分钟，离心，弃培液上清，加入 4ml ST buffer（培养液+10%血清+2.5%甘油），vortex 混匀，于 -80℃ 和 37℃ 间冻融三次，3000rpm 离心 5min 取上清，分装后保存于 -80℃ 保存待用。

（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 3×10^5 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%（约 5×10^5 ），移除旧的细胞培养基，根据不同的孔板差异，加入 1/2 体积的新鲜培养基。

注：参见下表《病毒小培养体积感染表》中“病毒感染对应细胞培养液体积”，如 12 孔板一般培养时加 1ml 培养基，在此只加入 0.5ml，这是为了进行小体积的病毒感染，病毒感染时，培液的体积越小，病毒接触到细胞越容易，因此感染的效率也越高。

对于 polybrene 不敏感的细胞，可在细胞中加入终浓度 5ug/ul 的 polybrene 先处理 30min，然后根据细胞数量，分别加入所需的病毒（Ad-OCT4, Ad-SOX2-, Ad-KLF4、 Ad-c-MYC），每个病毒的 MOI 值大约在 50~100 间，具体可参见附录 1《汉恒生物腺病毒感染复数（MOI）与体积

对应表》。

病毒小培养体积感染表				
培养皿	表面积	对应细胞 正常培养液体 积	病毒感染对 应细胞培养液体 积	polybrene 加入体 积/well (stock: 10ug/ml)
类型	/cm ²			
96-well	0.3cm ²	100ul	50ul	0.025ul
24-well	2cm ²	500ul	250ul	0.125ul
12-well	4cm ²	1ml	500ul	0.25ul
6-well	10cm ²	2ml	1ml	0.5ul
60mm	20cm ²	4ml	2ml	1ul
100mm	60cm ²	10ml	5ml	2.5ul

注：1.慢病毒感染 4 小时后补足至培养体积，感染 24 小时后换液；
 2.腺病毒感染 2 小时后直接换液；
 3.polybrene 并非所有细胞都合适，需要经过摸索，且一般不可能只做一个孔，
 所以上每孔 (/well) 体积请根据实际孔数一次性配好感染用培液。

病毒感染 2h 后，移除感染病毒体系，加入新鲜正常体积培养体系。（参见上表《病毒小培养体积感染表》中“对应细胞培养液体积”）。

病毒感染 24 小时后，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。

细胞种植及病毒感染与小鼠 IPS 诱导一致。

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。

汉恒生物科技(上海)有限公司

地址：上海市徐汇区斜土路 1175 号景泰大厦 1503

实验室：上海市张江高科技园区张江药谷孵化器 1 号楼 314

邮箱：service@hanbio.net

 400-092-0065

 021-54121689

 汉恒生物科技 

 www.hanbio.net

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](#)）；

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	

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富的 ips 建系及维护经验，随时欢迎咨询。

3. 发表文章请注明使用[汉恒生物](#)IPS 系列产品（Hanbio™ IPS SYSTEM）。

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)
7. Tashiro K, Kawabata K, Inamura M et al. Adenovirus vector-mediated efficient transduction into human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Reprogram.* 2010;12:501-507.
8. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 2008;322:945-949.
9. Zhou W, Freed CR. Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2009;27:2667-2674.