

单细胞传代方法

介绍

多能性干细胞(PSCs)是基础研究和应用的基本工具，包括再生治疗、药物开发和毒理学评估。尽管无滋养层系统的问世大大提升了PSCs的可扩展性，但细胞团块传代技术(如使用分散酶、胶原酶或EDTA等试剂)通常不适用于下游实验应用，如高通量筛选、基因编辑和定向分化。

单细胞培养是干细胞培养研究中的标准和惯常方法。通过利用单细胞解离传代技术，科学家们能够获得值得信赖的细胞用于下游应用和克隆筛选、成像和细胞分选比较，也可用于对细胞复苏和细胞数量要求很高的悬浮培养。Gibco® RevitaCell™添加剂可与Essential 8™培养基结合使用，用于单细胞传代时可实现最大的细胞存活率。与其他商品化的配方不同，RevitaCell™添加剂包括rho相关蛋白激酶(ROCK)抑制剂，其选择性优于传统的ROCK抑制剂(如Y-27632和thiazovivin)，可与包含抗氧化剂和具有自由基清除剂特性的分子结合使用。这种混合物可以最大程度地降低单细胞传代的影响，大大提升细胞总存活率，有助于确保提升下游实验中细胞供应的稳定性和存活率。

材料与amp;方法

PSC培养和扩增

在无滋养层条件下，使用Essential 8™培养基在玻连蛋白(VTN-N)包被的培养板中培养H9人胚胎干细胞(hESCs)和人诱导性多能干细胞(使用episomal附着载体生成的hiPSCs)。每3至5天传代hiPSCs一次，达到~80%汇合)。

表1. 实验使用的材料。

| 产品名称 | 货号 |
|---------------------------------|-----------|
| Alexa Fluor® 488山羊抗小鼠 IgG (H+L) | A11029 |
| Alexa Fluor®山羊抗兔IgG (H+L) | A11012 |
| DPBS, 不含钙和镁 (10X) | 14200-075 |
| Essential 8™ 培养基 | A1517001 |
| Gibco® RevitaCell™ 添加剂 (100X) | A2644501 |
| Image-iT® 固定/透化试剂盒 | R37602 |
| 小鼠抗Tra-1-81 (cl.26) | 41-1100 |
| PSC冻存培养基 | A2644401 |
| StemPro® Accutase® 细胞消化液 | A11105-01 |
| 截短型重组人玻连蛋白 (VTN-N) | A14700 |
| TrypLE™ Select 酶, 不含酚红 (1X) | 12563-029 |

使用TrypLE™ Select酶或StemPro® Accutase®细胞消化液进行hiPSCs单细胞传代

对于单细胞传代实验(参考图1中的工作流程)，使用不含钙和镁的DPBS冲洗细胞，然后使用预热的TrypLE™ Select酶(1 mL每6孔板的一个孔)进行处理。将细胞置于37°C、5% CO₂培养箱中孵育5分钟。孵育后，使用Pipetman® P1000吹吸细胞5至10次，以高效获得单个细胞。然后将细胞悬液转移至含有3 mL新鲜Essential 8™培养基的锥形管内，稀释消化液，以200 x g离心4分钟。吸弃培养基，小心不要搅动细胞沉淀，在添加了1X RevitaCell™添加剂的Essential 8™培养基中复苏并培养(细胞接种密度如图1所示)分种后18-24小时细胞，然后每天仅补充Essential 8™培养基进行培养。

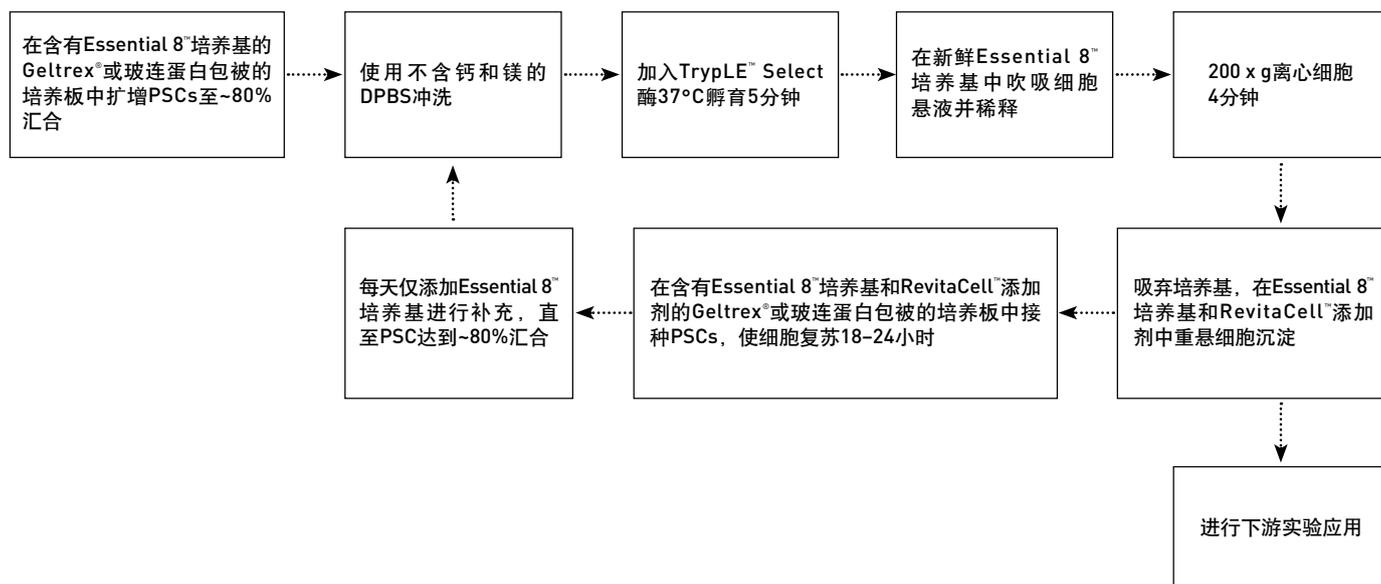


图1. 使用Essential 8™培养基和RevitaCell™添加剂的单细胞传代工作流程。

生长动力学和形态学评估

要确定单细胞传代后的细胞生长动力学和形态学变化，使用IncuCyte™ ZOOM (Essen Biosciences)活细胞成像平台的相差显微镜定期采集图像。生成细胞掩膜确定细胞汇合百分比随时间的变化，无需标记即可确定传代后的细胞增殖。

正常的多能性评估

使用TrypLE™ Select酶传代hiPSCs和H9 ESCs，使用PSC冻存培养基冻存细胞。解冻后，使用Essential 8™培养基和1X RevitaCell™添加剂复苏细胞18至24小时，然后每天仅补充Essential 8™培养基，直至细胞达到~80%汇合。接着使用TrypLE™ Select酶传代细胞，共10代，使用Essential 8™培养基和1X RevitaCell™添加剂复苏分种后的细胞18至24小时，随后仅补充Essential 8™培养基进行培养。传代10次后，使用Image-iT®固定/透化试剂盒固定细胞，进行透化处理(仅nanog染色需要)，并封闭细胞。然后使用一抗溶液对细胞进行染色，包括小鼠抗TRA-1-81 (1:100)和兔抗Nanog (D73G4)，随后使用荧光染料结合的二抗处理细胞，包括

Alexa Fluor® 488山羊抗小鼠IgG (H+L) (1:1,000)和Alexa Fluor® 594山羊抗兔IgG (H+L) (1:1,000)。接着使用IncuCyte™ ZOOM平台对培养物进行成像。

正常核型评估

使用TrypLE™ Select酶传代，并使用PSC冻存培养基冻存hiPSCs和H9 ESCs。解冻后，使用Essential 8™培养基和1X RevitaCell™添加剂复苏细胞18至24小时，然后仅补充Essential 8™培养基，直至细胞达到~80%汇合。接着使用TrypLE™ Select酶传代细胞，共30代。将第30代细胞寄至Cell Line Genetics进行G带核型分析。

混合物中的促存活小分子的激酶谱分析

要确定RevitaCell™添加剂中促存活的小分子靶向的关键通路，并与传统的ROCK抑制剂进行比较，使用SelectScreen®激酶谱分析服务筛选小分子，浓度如下：10 μM Y-27632、2 μM thiazovivin和终浓度为1X的RevitaCell™添加剂中的促存活小分子。分析319激酶的抑制百分比，如图6所示，激酶的抑制率>80%。

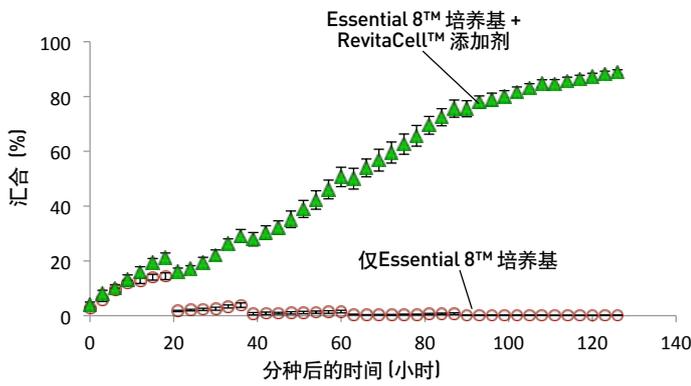


图2. RevitaCell™添加剂适用于TrypLE™ Select酶的单细胞传代。使用Episomal附着体载体生成iPSCs，采用TrypLE™ Select酶传代至含有Essential 8™培养基和1X RevitaCell™添加剂的截短型重组人玻连蛋白包被的培养板上，接种密度为25,000个活细胞/cm²。复苏24小时后，仅补充Essential 8™培养基继续培养iPSCs。

结果

使用Episomal附着体载体生成iPSCs，采用TrypLE™ Select酶进行单细胞传代。传代后，使用Essential 8™培养基，添加或不添加1X RevitaCell™添加剂复苏细胞约24小时，然后每天仅补充Essential 8™培养基。使用相差显微镜监测细胞传代后的汇合度，以确定iPSCs的复苏。传代后18至24小时，使用RevitaCell™添加剂可大大提升iPSCs细胞存活率和复苏效果(图2中的绿色三角形)。而仅使用Essential 8™培养基培养的iPSCs则复苏效果较差(图2中的红色空心圆)。在Essential 8™培养基和1X RevitaCell™添加剂中培养约24小时的iPSCs的典型形态如图3所示。传代24小时后，细胞呈长形。而复苏后iPSCs显示出正常的集落形态。使用PSC冻存培养基冻存iPSCs，然后参照图1所示的工作流程继续培养，细胞可保持正常的形态和多能性(图3和图4)。iPSCs可维持nanog — 一种细胞内多能性标记物和TRA-1-81 — 一种细胞外多能性标记物的表达。此外，参照图1所示的工作流程进行单细胞传代30次后，PSCs仍可保持正常的核型，说明该传代方法适用于PSCs的长期培养(图5)。

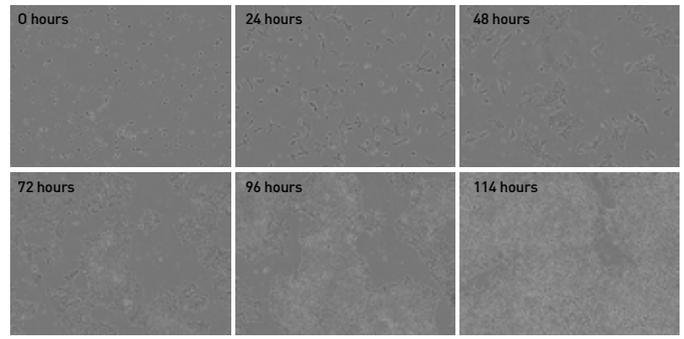


图3. 使用Essential 8™培养基和RevitaCell™添加剂进行单细胞传代后，细胞仍可保持正常形态。使用Episomal附着体载体生成iPSCs，采用TrypLE™ Select酶传代至含有Essential 8™培养基和1X RevitaCell™添加剂的截短型重组人玻连蛋白包被的培养板上，接种密度为25,000个活细胞/cm²。复苏24小时后，仅补充Essential 8™培养基继续培养iPSCs。

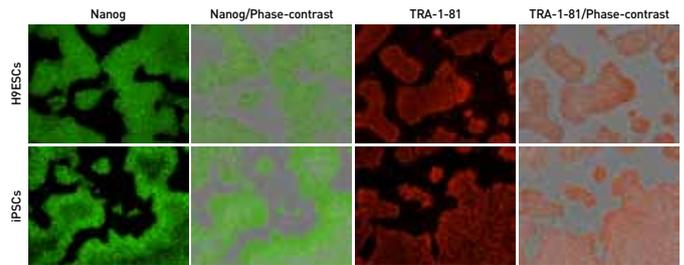


图4. 使用Essential 8™培养基和RevitaCell™添加剂进行单细胞传代后，细胞仍可保持正常的多能性。使用Episomal附着体载体生成iPSC，采用TrypLE™ Select酶传代H9 ESCs，使用PSC冻存培养基冻存细胞。解冻后，使用Essential 8™培养基和1X RevitaCell™添加剂复苏细胞18至24小时，然后仅补充Essential 8™培养基，直至细胞达到~80%汇合。使用TrypLE™ Select酶传代细胞，共10代，使用Essential 8™培养基和1X RevitaCell™添加剂复苏分种后的细胞18至24小时，随后仅补充Essential 8™培养基继续培养。传代10次后评估细胞的形态和多能性。

RevitaCell™添加剂包含了促存活的小分子以及具有抗氧化和自由基清除特性的化合物。对该混合物中的促存活小分子进行SelectScreen®激酶谱分析服务，并将其与传统ROCK抑制剂(10 μM Y-27632和2 μM thiazovivin; 图6)进行比较。RevitaCell™添加剂中的促存活小分子也是一种ROCK抑制剂。此外，RevitaCell™添加剂促存活小分子只对7种激酶具有>80%的抑制性，而thiazovivin对16种激酶具有>80%的抑制性，Y-27632为25种激酶，说明促存活小分子是一种具有更高的选择性的ROCK抑制剂。

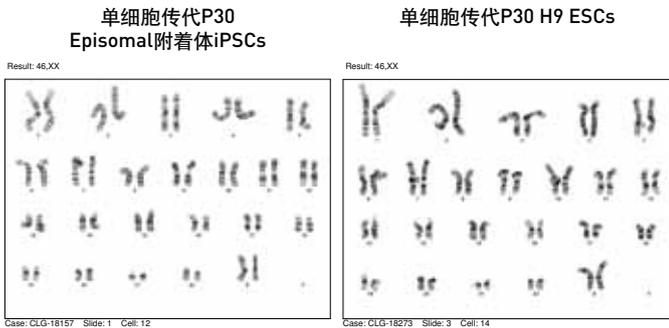


图5. 使用Essential 8™培养基和RevitaCell™添加剂进行单细胞传代后(解冻后传代30次以内的各代细胞), 细胞仍可保持正常的核型。使用附着体载体生成iPSC, 采用TrypLE™ Select酶传代H9 ESC, 使用PSC冻存培养基冻存细胞。解冻后, 使用Essential 8™培养基和1X RevitaCell™添加剂复苏细胞18至24小时, 然后仅补充Essential 8™培养基, 直至细胞达到~80%汇合。使用TrypLE™ Select酶传代细胞, 共30代, 使用Essential 8™培养基和1X RevitaCell™添加剂复苏分种后的细胞18至24小时, 随后仅补充Essential 8™培养基继续培养。传代30次后, 评估细胞的核型。

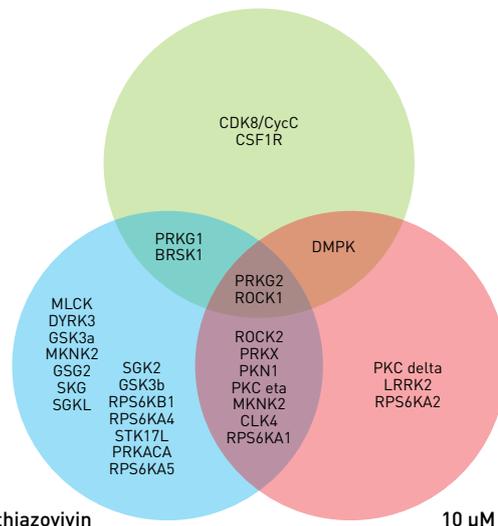


图6. RevitaCell™添加剂中的促存活小分子的SelectScreen®激酶谱分析显示, 其相比传统的ROCK抑制剂具有更高的选择性。对小分子化学物进行319种激酶检测。抑制率高于80%的激酶如图所示。

结论

RevitaCell™添加剂可以提升PSCs解冻后的复苏效率, 使解冻后24小时的细胞凋亡和坏死最小化。RevitaCell™添加剂还可用于Essential 8™培养基中PSCs的常规单细胞传代, 可实现高效细胞复苏, 同时保持正常的形态、多能性和核型。此外, 该混合物中的促存活小分子显示具有较ROCK抑制剂更高的选择性, 最大程度地减少了脱靶的通路。因此, 该系统为下游实验提供了基础, 包括高通量筛选和PSCs至不同细胞类型的分化, 以及基因编辑应用。

如需了解更多信息, 请登录 lifetechnologies.com/revitacell

免费服务电话: 800 820 8982 / 400 820 8982
 销售服务信箱: sales-cn@lifetech.com
 技术咨询信箱: cntechsupport@lifetech.com

上海办事处 电话: 021-61452000
 北京办事处 电话: 010-84461800

广州办事处 电话: 020-38975100
 成都办事处 电话: 028-86672836

ThermoFisher
 SCIENTIFIC