

Reproeasy hiPSC 重编程试剂盒说明书

V2.2版本，2019年5月21日更新



扫描二维码，关注微信公众号即可查看 [产品说明书](#)、[视频教程](#)、[产品相关论文下载](#)
(如果您有什么其他问题，可联系相关销售或拨打下方联系电话咨询)

联系电话：010—69737398

货号及规格：

CA5002002	Reproeasy hiPSC 重编程试剂盒	1 Reaction
CA5002003	Reproeasy hiPSC 重编程试剂盒	3 Reactions
CA5002004	Reproeasy hiPSC 重编程试剂盒 (含 hiPS 细胞)	1 Reaction
CA5002005	Reproeasy hiPSC 重编程试剂盒 (含 hiPS 细胞)	3 Reactions

储存条件：基础培养基2 ~ 8℃，添加剂-80 ~ -20℃；混匀后2 ~ 8℃，2周内使用完毕。

重编程添加剂 I -20℃保存，重编程添加剂 II -80℃保存，重编程添加剂 III -20℃保存。

产品简介：

Reproeasy hiPSC重编程试剂盒包括了在重编程过程中所需的必要试剂，目的是为广大科研工作者提供便利和高效的重编程iPSC建系方法。

产品内容：

货号	试剂名称	规格	CA5002002	CA5002003	CA5002004	CA5002005
CA5002002-1	重编程添加剂 I	10 μL	1 支	3 支	1 支	3 支
CA5002002-2	重编程添加剂 II	5 μL	1 支	3 支	1 支	3 支
CA5002002-3	重编程添加剂 III	5 μL	1 支	3 支	1 支	3 支
CA5001050	Reproeasy 人体细胞重编程培养基	50 mL	1 套	3 套	1 套	3 套
CA1007500	PGM1 人多潜能干细胞培养基	500 mL	1 套	1 套	1 套	1 套
CA1003100	PSCeasy 人多潜能干细胞复苏培养基	100 mL	1 套	1 套	1 套	1 套
CA3001100	PSCeasy 人多潜能干细胞消化液	100 mL	1 瓶	1 瓶	1 瓶	1 瓶
CA3003100	PSCeasy 人多潜能干细胞铺底工作液	100 mL	1 瓶	1 瓶	1 瓶	1 瓶
CA4024106	人诱导多潜能干细胞	1×10 ⁶	-	-	1 支	1 支

*根据购买的产品不同，产品内容不同。

*请根据不同产品（货号 CA5002002、CA5002003、CA5002004 和 CA5002005）确认包装内容。

实验试剂：

- 培养皿/瓶铺底工作液：PSCeasy人多潜能干细胞铺底工作液
- 0.25% 胰酶
- 重编程添加剂 I（Cellapy, Cat. CA5002002-1）
- 重编程添加剂 II（Cellapy, Cat. CA5002002-2）
- 重编程添加剂 III（Cellapy, Cat. CA5002002-3）
- Reproeasy人体细胞重编程培养基（Cellapy, Cat. CA5001050）
- PGM1人多潜能干细胞培养基（Cellapy, Cat. CA1007500）
- PSCeasy人多潜能干细胞复苏培养基（Cellapy, Cat. CA1003100）
- PSCeasy人多潜能干细胞消化液（Cellapy, Cat. CA3001100）
- PSCeasy人多潜能干细胞铺底工作液（Cellapy, Cat. CA3003100）
- 细胞培养级无钙镁PBS溶液（Cellapy, Cat. CA3017500）

重编程流程图：**培养材料准备：**

1. 待体细胞汇合度达到70%~90%，且生长状态良好时可以准备重编程。

2. 提前一天根据需要进行96孔板铺底。

重编程操作流程:

1. 体细胞汇合度达到70%-90%即可进行消化传代，将细胞接种于96孔板中；接种密度控制在5000—15000个/孔，可根据细胞情况设置3个密度梯度，每个梯度设置3个复孔。细胞接种当天视为第-1天。

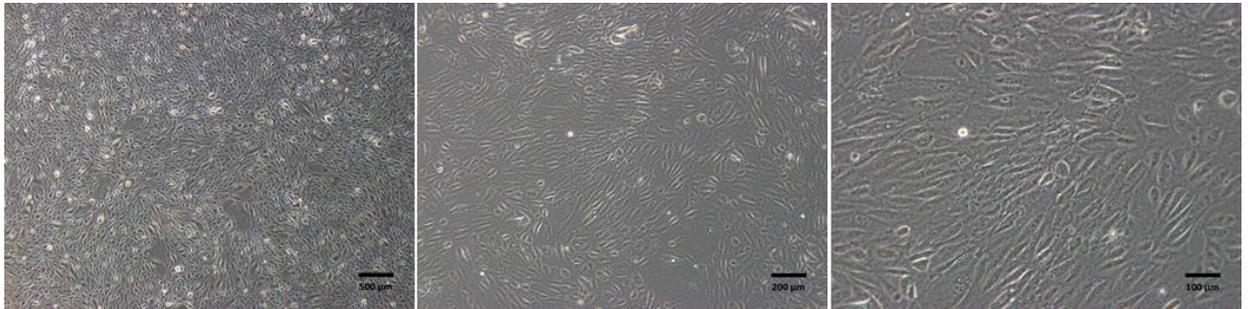


图1 消化传代前皮肤成纤维细胞

2. 第0天：镜下观察细胞的汇合度以及状态，选择不同梯度的各一个复孔进行消化计数，选择细胞量达到10000-20000个的孔进行重编程。请按以下方式配置**重编程培养基A**：

重编程培养基A	体细胞培养基(尿液肾上皮或皮肤成纤维细胞培养基)	10 mL
	重编程添加剂 I	10 μL

3. 先将重编程添加剂 II 离心，再将100 μL**重编程培养基A**加入到重编程添加剂 II 管中，混匀配成**重编程培养基B**，将重编程培养基B加入选定的符合条件的一个96孔中，将培养板放回培养箱，记为第0天。

4. 第1-2天：镜下观察，并拍照记录细胞的形态变化。若细胞形态变化明显即可撤去重编程培养基B，换为重编程培养基A继续培养；若形态变化不明显，可不换液。

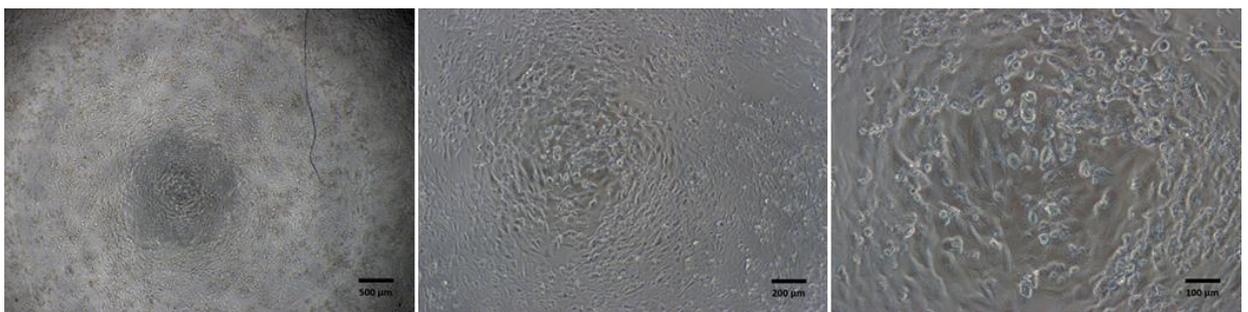


图2 加入重编程培养基B 24小时后细胞的形态变化

5. 第3天：若细胞形态在前两天就已经发生了明显的形变，且细胞生长速度较快，在第三天已经达到爆满状态，可以进行胰酶消化传代；若细胞量不足，可推迟一到两天传代。根据细胞状态和细胞量将细胞传至六孔板的2-6个孔（需要提前一天用PSCeasy人多潜能干细胞铺底工作液包被6孔板），加入**重编程培养基C**，尽量形成单细胞贴壁。请按以下方式配置**重编程培养基C**：

重编程培养基C	体细胞培养基(尿液肾上皮或皮肤成纤维细胞培养基)	10 mL
----------------	--------------------------	-------

	重编程添加剂III	5 μ L
--	-----------	-----------

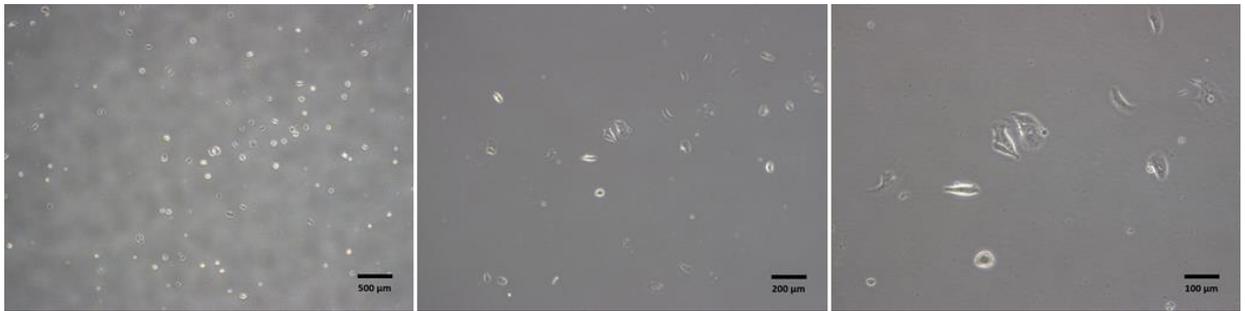


图3 细胞传至6孔板后的状态

- 第4天：观察细胞的贴壁情况，若大部分细胞贴壁良好，可以撤去重编程培养基C，更换为新鲜的体细胞培养基继续培养。
- 第5天：镜下观察，若有小簇克隆（4个细胞以上的克隆团块）形成，可将体细胞培养基换为Reproeasy人体细胞重编程培养基。若暂无小簇克隆形成，可继续观察一到两天，再更换Reproeasy人体细胞重编程培养基。

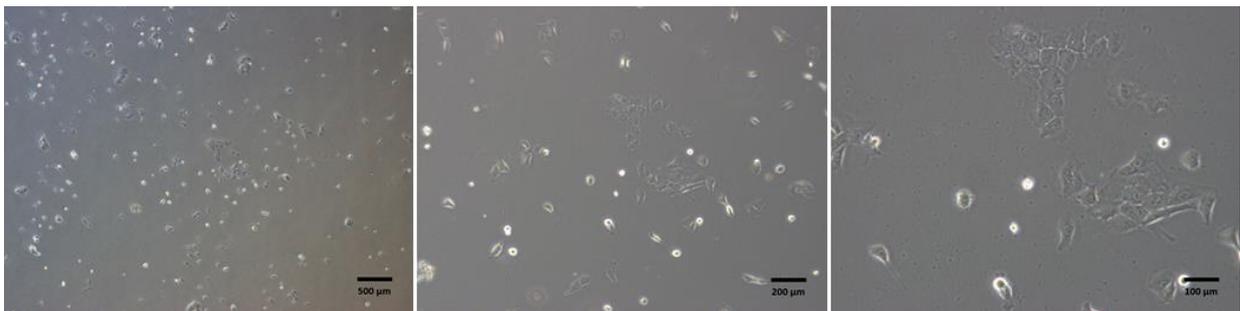


图4 小簇状克隆形成

- 第6-8天：镜下观察，若小簇克隆变大，一个克隆团块有10个以上的细胞，可直接将Reproeasy人体细胞重编程培养基换为PGM1人多潜能干细胞培养基（或PSCeasy人多潜能干细胞培养基）。若换液前观察到死细胞较多，可用室温平衡后的PBS清洗后，再进行换液。

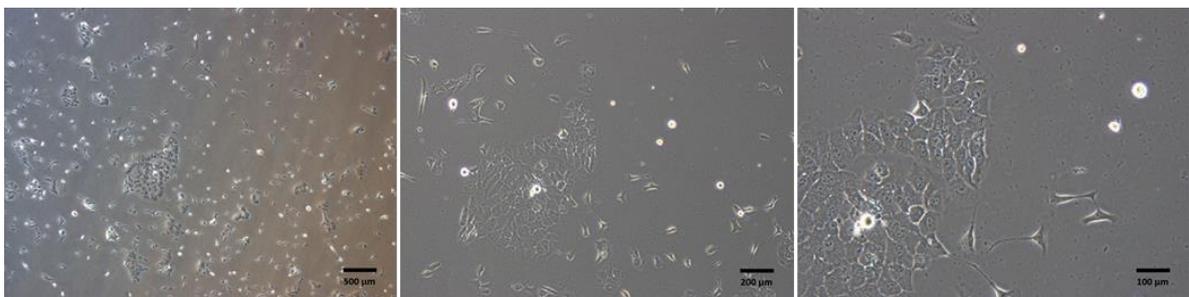


图5 换PGM1人多潜能干细胞培养基前的细胞状态

- 第9-20天：镜下观察，并拍照记录细胞形态变化。每天更换经过室温平衡的新鲜PGM1人多潜能干细胞培养基。
- 第21天：镜下观察，若单个细胞克隆能填满整个10倍镜视野，可用1 mL注射器针头切割克隆，并将其挑取至提前包被PSCeasy人多潜能干细胞铺底工作液的48孔板中（若克隆状态较好，细胞厚实且生长较快，可直接挑取到24孔板中）。

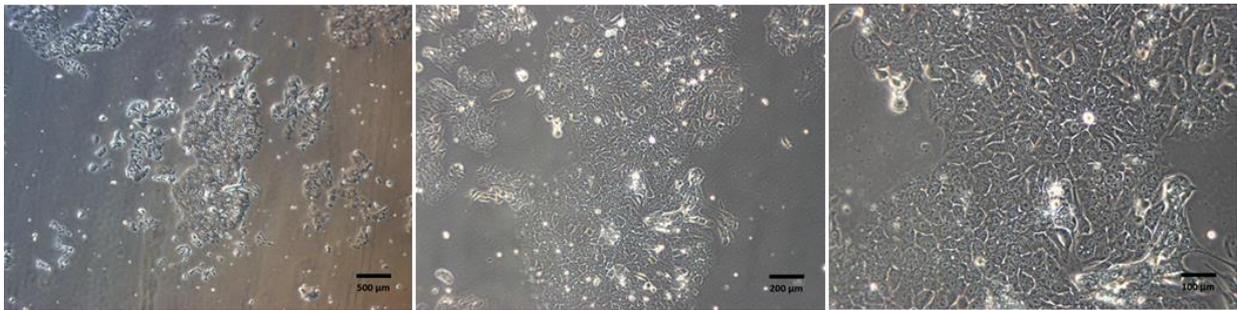


图6 挑取前克隆的大小

- 克隆挑出后用PSCeasy人多潜能干细胞复苏培养基接种，细胞贴壁后可以更换为PGM1人多潜能干细胞培养基继续培养至所需的代数。

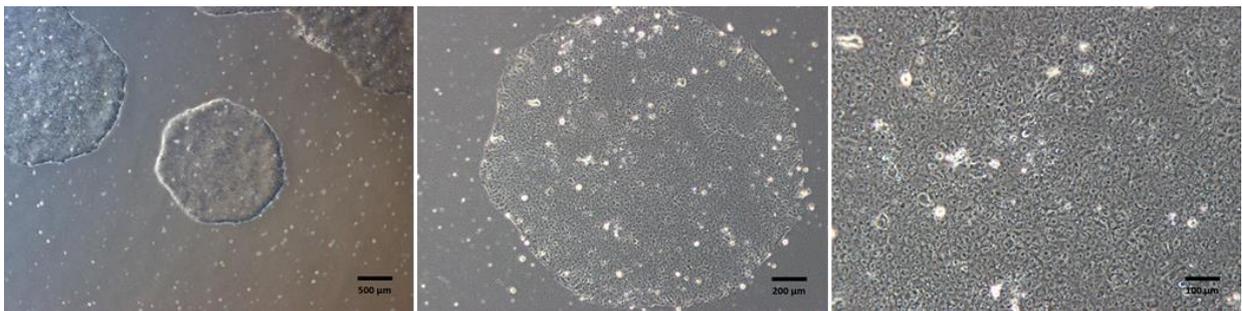


图7 培养至第五代的诱导多能干细胞

疑难解答：

- 何种状态的体细胞适合重编程？

细胞形态较好（如肾上皮细胞：形态呈现梭形）、核质正常、生长速度较快、无支原体污染。

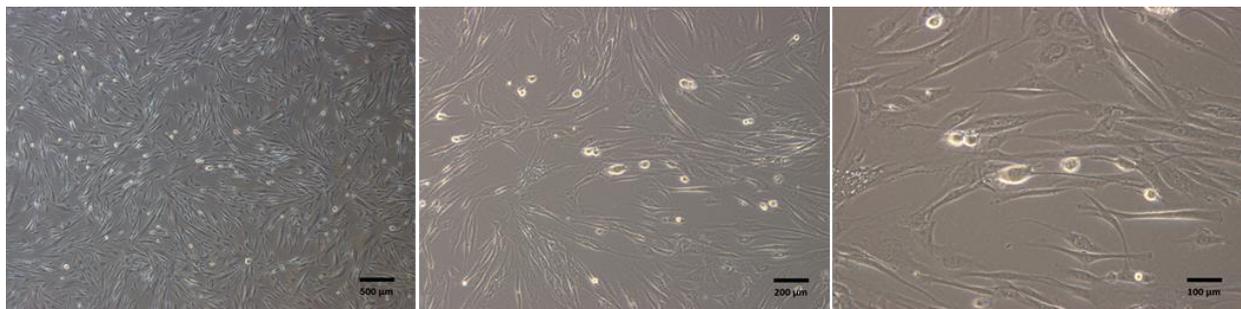


图8 皮肤成纤维细胞

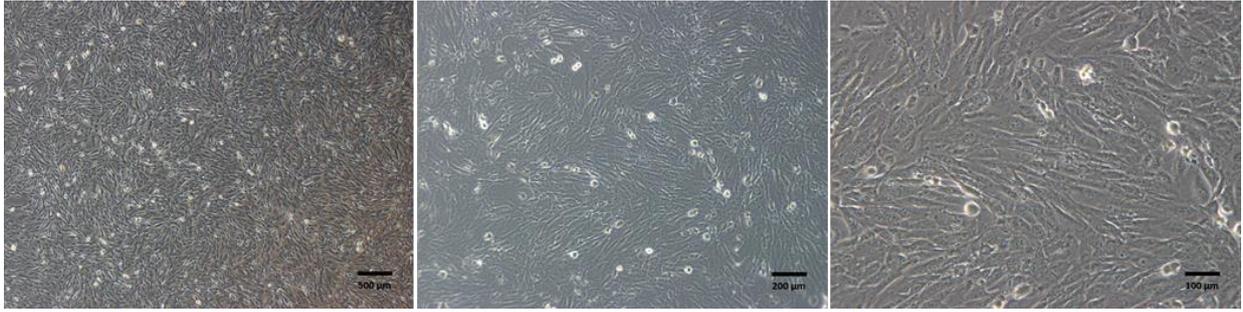


图9 肾上皮细胞