



# mTeSR™3D: 对悬浮培养hPSCs进行细胞团块传代的方法

## 介绍

mTeSR™3D用于将人多能干细胞 (hPSCs) 以聚集体的形式在悬浮培养中扩增。我们推荐使用细胞团块传代的方法以确保在每代间都保持稳定的生长率，并最大程度降低通过单细胞传代流程而导致核型不正常的可能性<sup>1,2</sup>。

## 二阶段实验过程

在该细胞团块传代法中，hPSCs聚集体：

1. 通过一种非酶催化试剂 - 温和细胞解离试剂 (GCDR, 产品号 #07174) 进行预处理。
2. 以37  $\mu$ m可翻转的过滤网 (产品号 #27215/27250) 机械解离为理想大小的细胞团，用于重新接种下一代细胞。

以下流程用于在mTeSR™3D中从初始20 mL培养体积和第4天~26.7 mL培养体积传代聚集体。可根据需要进行体积调配。请参见表1。

表1. 推荐用于细胞团块传代的GCDR和重悬浮培养基体积

| 初始体积 (ML) | 第4天体积 (ML) | GCDR (ML) | 重选体积 (mTeSR3D 接种培养基 + Y-27632, ML) |
|-----------|------------|-----------|------------------------------------|
| 2         | 2.7        | 1         | 1                                  |
| 20        | 26.7       | 5         | 5                                  |
| 30        | 40.1       | 7.5       | 7.5                                |
| 50        | 66.8       | 15        | 15                                 |
| 100       | 133.6      | 30        | 30                                 |

## 制备

1. 将5 mL GCDR加热至37° C。
2. 将mTeSR™3D接种培养基 (Seed Medium) 置于室温中 (15-25° C)。
3. 准备足够的添加了10  $\mu$ M Y-27632 ROCK抑制剂的mTeSR™3D接种培养基用于所有条件下的重悬和接种。推荐的重悬浮体积见表1。
4. 传代之前拍摄培养物图像。健康聚集体应不大于350 - 400 $\mu$ m, 且显示以下的特征形态:
  - 近似球形
  - 边缘清晰但不特别光滑
  - 斑驳的外观。浅坑或瘢痕为正常现象, 是维持PSC标志物表达的表现

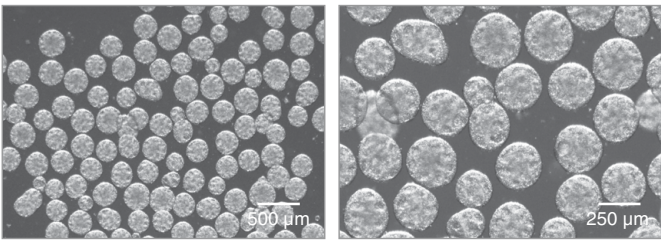


图1. 在mTeSR™3D中传代结尾时hPSC聚集体的典型图像。在20X (顶部) 和40X (底部) 拍摄的图像。比例尺表示聚集体大小。

## 第1阶段: 用GCDR预处理hPSC聚集体

1. 使用一支血清移液管收集hPSC聚集体。
2. 通过37  $\mu$ m可翻转的过滤网 (产品号 #27250) 将传代中的非聚集单细胞过滤到50 mL离心管中。确保过滤网上的箭头朝上 (图2)。
3. 将过滤网翻转到新的50 mL锥形管上 (图3)。
4. 用5 mL温热的GCDR将聚集体冲洗入新的锥形管中 (图4)。如果需要, 轻轻敲击过滤网抖落所有聚集体。
5. 目视确认所有聚集体均已从过滤网上冲洗下来。

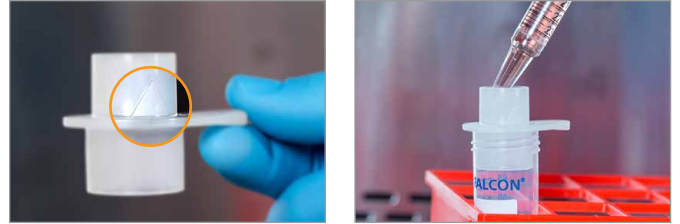


图2. 使用锥形管和可翻转的过滤网收集hPSC聚集体, 过滤网的箭头朝上。



图3. 将可翻转的过滤网翻转到新的锥形管上。箭头此时向下。

6. 将过滤网翻转, 放到一个新的50 mL锥形管上, 暂时搁置在一边。该过滤网将在稍后流程 (第2阶段) 中再次使用。完成这一步骤后, 箭头将再次朝上。
7. 在37° C下孵育hPSC聚集体和GCDR约6分钟, 避免干扰。最佳孵育时间可能根据细胞系而有所不同。
8. 可选: 以100 x g离心2分钟。如果GCDR体积 > 5 mL, 需要该步骤将锥形管中的聚集体进行沉淀。
9. 使用血清移液管慢慢吸出GCDR, 在管中留下~0.5 mL。注意避免吸掉任何聚集体。
10. 使用一支血清移液管, 加入5 mL添加了10  $\mu$ M Y-27632 ROCK抑制剂的mTeSR™3D接种培养基, 轻轻重悬。

**注意:** 如果培养物扩增 > 5倍且聚集体密度高, 可能需要更大体积的添加了10  $\mu$ M Y-27632 ROCK抑制剂的mTeSR™3D接种培养基。增加体积将降低剪切力, 从而获得更高的细胞活性。



图4. 使用温热的GCDR将聚集体冲洗入新的锥形管中。

在步骤7期间, hPSC聚集体被GCDR部分解离以准备机械解离成小团块 (第2阶段)。

## 第2阶段：机械解离

1. 使用一支25 mL血清移液管吸出重悬的hPSC聚集体。确保移液管尖端没有气泡。

**注意：**为防止产生气泡，慢慢从管中吸出聚集体悬液。轻轻敲打移液管释放气泡以将其清除。当聚集体悬液在移液管中时要尽快速度操作，以避免聚集体沉淀。

2. 使用第1阶段中的过滤网和新的锥形管，小心地将含有聚集体的移液管尖端直接垂直放置于过滤网中（图5）。

3. 以电动移液器的最慢档将部分解离的聚集体通过过滤网。流速应为每秒~0.5 - 1 mL。该操作将生成适当大小的团块用于下一阶段的接种。整个过程一定要保持移液管和过滤网的垂直接触（图5B）。

**注意：**如果感觉过滤网堵塞，停止移液并将移液管在过滤网上横向滑动，同时保持直接接触，然后继续移液。

4. 对于较大的培养体积，建议逐步进行机械解离。在较大的移液管中以小体积进行处理能够控制聚集体所承受的剪切量。参见表2。

5. 计数活的细胞或团块（参见技术手册附录1：计数团块）。在取出样品前务必轻轻混合悬液。

6. 加入适当的浓缩的团块悬液，并加入添加了10  $\mu$ M Y-27632 ROCK抑制剂的mTeSR™3D接种培养基至所需的最终体积和细胞密度，完成在新培养容器中的接种。

**注意：**如果团块被留置一定时间（> 15分钟），则团块可能会聚集成颗粒。使用25 mL或50 mL血清移液管，在接种前以每秒~1 mL的流速上下吹打整个团块悬液1 - 2次。

为了获得最佳效果：

- 移液管尖端与过滤膜直接接触
- 移液管垂直放置
- 移液管尖端没有气泡

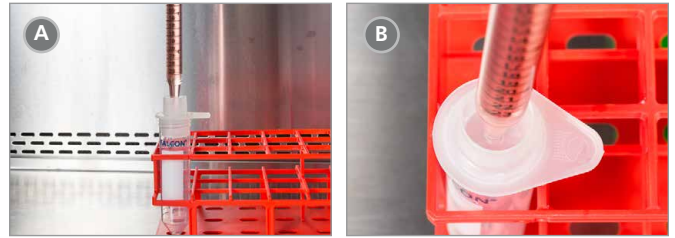


图5. 含有预处理聚集体的血清移液管的放置。移液管应垂直放置，使尖端与过滤网表面直接接触。

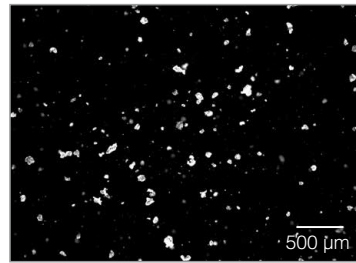


图6. 形成的新hPSC聚集体团块的典型图像，大小为50 - 100  $\mu$ m。这些hPSC团块可立即用于在mTeSR™3D中进行后续传代。

表2. 其他悬浮培养体积的相应流程

| 初始体积 (mL) | 37 $\mu$ M可翻转的过滤网规格 | 推荐的逐步操作相应体积                |
|-----------|---------------------|----------------------------|
| 2         | 小 (15 mL锥形管)        | 1 x 1 mL<br>(5 mL血清移液管)    |
| 20        | 大 (50 mL锥形管)        | 1 x 5 mL<br>(25 mL血清移液管)   |
| 30        | 大 (50 mL锥形管)        | 1 x 7.5 mL<br>(25 mL血清移液管) |
| 50        | 大 (50 mL锥形管)        | 3 x 5 mL<br>(25 mL血清移液管)   |
| 100       | 大 (50 mL锥形管)        | 3 x 10 mL<br>(50 mL血清移液管)  |

一些hPSC聚集体可能残留在过滤网表面。通过调节流速和流量来适应各种细胞系，以减少细胞损失。为增加回收量，可用额外1 - 5 mL添加了10  $\mu$ M Y-27632 ROCK抑制剂的mTeSR™3D接种培养基冲洗过滤网。

# mTeSR™3D: 对悬浮培养hPSCs进行细胞团块传代的方法

## 产品信息

### mTeSR™3D试剂盒及所需产品

| 产品                                                | 产品号 #     |
|---------------------------------------------------|-----------|
| mTeSR™3D                                          | 03950     |
| Y-27632                                           | 72304     |
| 温和细胞解离试剂 (Gentle Cell Dissociation Reagent, GCDR) | 07174     |
| 37 µm可翻转的过滤网                                      | 27215 (小) |
|                                                   | 27250 (大) |

### 相关产品

| 产品                                       | 产品号 #               |
|------------------------------------------|---------------------|
| mTeSR™1                                  | 85850               |
| TeSR™E8                                  | 05940               |
| Corning® Matrigel® hESC-qualified Matrix | Corning® 产品号 354277 |
| STEMdiff™三谱系分化试剂盒                        | 05230               |

### hPSC相关抗体

| 表面抗原一抗                      | 同型                | 产品号 # |
|-----------------------------|-------------------|-------|
| 抗小鼠SSEA-1抗体, 克隆MC-480       | IgM, kappa (小鼠)   | 60060 |
| 抗小鼠SSEA-3抗体, 克隆MC-631       | IgM, kappa (大鼠)   | 60061 |
| 抗人SSEA-4抗体, 克隆MC-813-70     | IgG3, kappa (小鼠)  | 60062 |
| 抗人SSEA-5抗体, 克隆8e11          | IgG1, kappa (小鼠)  | 60063 |
| 抗人TRA-1-60抗体, 克隆TRA-1-60R   | IgM, kappa (小鼠)   | 60064 |
| 抗人TRA-1-81抗体, 克隆TRA-1-81    | IgM, kappa (小鼠)   | 60065 |
| 抗人TRA-2-49抗体, 克隆TRA-2-49/6E | IgG1, kappa (小鼠)  | 60066 |
| 抗人TRA-2-54抗体, 克隆TRA-2-54/2J | IgG1, kappa (小鼠)  | 60067 |
| 胞内一抗                        | 同型                | 产品号 # |
| 抗人OCT4 (OCT3) 抗体, 克隆3A2A20  | IgG2b, kappa (小鼠) | 60093 |

## 参考文献

1. Bai Q et al. (2014) Temporal analysis of genome alterations induced by single-cell passaging in human embryonic stem cells. Stem Cells Dev 00(00): 1–10.
2. Garitaonandia I et al. (2015) Increased risk of genetic and epigenetic instability in human embryonic stem cells associated with specific culture conditions. PLoS One 10(2): 1–26.

版权所有© 2017 STEMCELL Technologies Inc. 2017. 保留一切权利, 包括图形和图像。STEMCELL Technologies和其设计及徽标, 以及Scientists Helping Scientists均是STEMCELL Technologies Canada Inc.的注册商标。其他注册商标为各自持有人的产权。STEMCELL已作出一切合理的努力, 以确保STEMCELL及其供应商所提供信息的正确性, 因而对此类信息的准确性或完整性将不另作保证或陈述。

STEMCELL TECHNOLOGIES INC.的质量管理体系已经过ISO 13485医疗器械标准认证。产品仅供研究使用。除非另行说明, 不可用于人或动物的诊断或治疗。