

ReproEasy[®] 人体细胞重编程培养基说明书

V6.1 版本， 更新日期：2018 年 5 月 7 日

货号：CA5001100

规格：100 mL

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。

产品简介：

ReproEasy[®] 人体细胞重编程培养基是赛贝生物（Cellapy）开发出的一种适用于无饲养层诱导、化学成分明确并且无动物源成分的人体细胞重编程完全培养基。ReproEasy[®] 培养基是在 James Thomson 实验室开发的 Essential 8 培养基的基础上，由赛贝生物改良研发出的最新型体细胞重编程完全培养基。

产品内容：

组分代码	名称	规格	数量
CA5001100-1	ReproEasy [®] 人体细胞重编程基础培养基	100 mL	1 瓶
CA5001100-2	ReproEasy [®] 人体细胞重编程添加剂	1.4 mL	1 支

试剂准备：

- ReproEasy[®] 人体细胞重编程完全培养基：在室温解冻 ReproEasy[®] 人体细胞重编程添加剂，随后将 ReproEasy[®] 人体细胞重编程添加剂加入 ReproEasy[®] 人体细胞重编程基础培养基形成 ReproEasy[®] 人体细胞重编程完全培养基（每 0.7 mL 添加剂与 50 mL 基础培养基混合），并吹打混匀。ReproEasy[®] 人体细胞重编程完全培养基可在 2 ~ 8℃ 稳定储存 2 周。

注：ReproEasy®人体细胞重编程添加剂需在室温解冻，可按实际用量对添加剂进行分装，分装后重新置于-80 ~ -20℃保存，避免反复冻融。

- PSCeasy®人多潜能干细胞完全培养基：室温解冻PSCeasy®人多潜能干细胞添加剂，随后将PSCeasy®人多潜能干细胞添加剂加入PSCeasy®人多潜能干细胞基础培养基形成PSCeasy®完全培养基，吹打混匀。PSCeasy®人多潜能干细胞完全培养基可在2 ~ 8℃稳定储存2周。

注：PSCeasy®人多潜能干细胞添加剂需在室温解冻，可按实际用量对添加剂进行分装，分装后重新置于-80 ~ -20℃保存，避免反复冻融。

重编程培养：

1. 取出预包装过PSCeasy®人多潜能干细胞铺底工作液的六孔板，吸去包被液并加入适量体细胞完全培养基，置于37℃恒温CO₂细胞培养箱中。
2. 将成功转入重编程因子的体细胞按 $2 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ /孔的密度接种到准备好的六孔板中，用体细胞完全培养基培养至细胞状态良好，更换为ReproEasy®完全培养基。ReproEasy®完全培养基使用前取出并平衡至室温。

注：ReproEasy®重编程体系适合目前所有的重编程因子导入方式，包括逆转录/慢病毒感染、质粒转染、质粒电转、仙台病毒感染等。

注：刚导入重编程因子的细胞，由于受到导入处理的影响，状态未达最佳，需在体细胞完全培养基培养中培养1 ~ 3天调整细胞状态。

3. 每天更换新鲜ReproEasy®完全培养基。
4. 每天观察细胞，重编程第3 ~ 5天，部分细胞出现明显的形变。

注：如果长时间未观察到细胞形变，体细胞生长至汇合度 $\geq 90\%$ ，可以用PSCeasy®人多潜能干细胞消化液按1:3的比例传代到PSCeasy®人多潜能干细胞铺底工作液包被的新六孔板中。

5. 重编程第10 ~ 15天，开始出现典型的克隆。

6. 隔天换液，观察等待iPSC克隆成熟。

iPS克隆的挑取：

1. 重编程第15 ~ 25天，对长到足够大的克隆进行iPSC克隆的挑取。

2. 挑取克隆前，将周围环境用紫外线和75%医用酒精进行消毒。

注：用显微镜在洁净实验室挑取克隆，如果空间允许，显微镜可放在无菌超净台里，保证无菌。

3. 将PSCeasy®人多潜能干细胞完全培养基取出并平衡至室温，取出包被过PSCeasy®人多潜能干细胞铺底工作液的12或24孔板，吸去包被液并加入适量PSCeasy®人多潜能干细胞完全培养基，置于5% CO₂的37℃恒温二氧化碳细胞培养箱中，准备好**无钙镁**的PBS溶液和PSCeasy®人多潜能干细胞消化液。

4. 在显微镜下找到iPSC克隆，用1 mL注射器将克隆分解成若干块。

5. 用移液器将分解的克隆从板内吸出，将其转移到准备好的12或24孔板内。

6. 继续挑取其他克隆，将每个克隆放到一个孔，置于37℃恒温CO₂细胞培养箱中。

7. 每天更换PSCeasy®人多潜能干细胞完全培养基直至能够传代。通常7 ~ 10天克隆可以传代。

（如需细胞的传代复苏及冻存操作，请详见《hES/hiPS细胞传代复苏及冻存说明书》）



扫码查看hES/hiPS细胞传代复苏及冻存说明书

疑难解答:

- **ReproEasy®人体细胞重编程培养基可以用于哪些种类的体细胞的重编程?**

ReproEasy®培养基适用于所有类型的人体细胞的重编程。

- **ReproEasy®人体细胞重编程培养基可以支持哪些重编程方法?**

ReproEasy®重编程体系适合目前所有的重编程因子导入方式，包括逆转录/慢病毒感染、质粒转染、质粒电转、仙台病毒感染等。

- **在ReproEasy®诱导重编程体系中，可观察到怎样的重编程过程?**

使用 ReproEasy®培养基诱导重编程，总共需要 15 ~ 25 天。过程中可以依次观察到以下变化：第 1~3 天，体细胞快速增殖；第 5~7 天，部分区域出现上皮样细胞聚集并持续增大；第 10~15 天，出现典型的人 ESC 样克隆；第 15~25 天，人 ESC 样的克隆长大，可以进行克隆的挑取。

- **培养基中有沉淀状物质时如何处理?**

添加剂在解冻过程中，若有少量沉淀析出，属于正常现象，不影响使用。但添加剂不能在 37°C 解冻，否则会析出大量沉淀，影响培养基的效价。如果培养基中出现大量沉淀，请不要使用。

- **是否能在37°C反复水浴ReproEasy®人体细胞重编程完全培养基?**

不能。频繁地在 4°C 和 37°C 之间转换会导致 ReproEasy®人体细胞重编程完全培养基中含有的因子失活，ReproEasy®完全培养基在使用前平衡至室温即可。

- **在ReproEasy®诱导重编程体系中，细胞接种的初始密度是多少?**

细胞接种的初始密度应当为 $2 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3 / \text{cm}^2$ 。如果使用六孔板，接种的初始密度为 $2 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4 / \text{孔}$ 。

- **在ReproEasy®诱导重编程体系中，细胞是否需要传代?**

如果长时间未观察到细胞形变，细胞生长至汇合度 $\geq 90\%$ ，可以用 PSCeasy®人多潜能干细胞消化液按 1:3 的比例传代到 PSCeasy®人多潜能干细胞铺底工作液包被的新的皿/瓶中。但传代会导致最后挑取的单克隆可能来自同一个起始细胞，无法得到严格意义上的单克隆，并无法计算重编程效率。如果出现中途细胞汇合度过大的情况，建议降低细胞接种的初始密度。

- **重编程完成后，应用什么体系培养得到的人 iPSC?**

推荐在 PSCeasy®培养体系中培养人 iPSC。PSCeasy®人多潜能干细胞培养基是一种适用于无饲养层培养、化学成分明确、并且不含动物源蛋白的人 ESC/iPSC 完全培养基。