

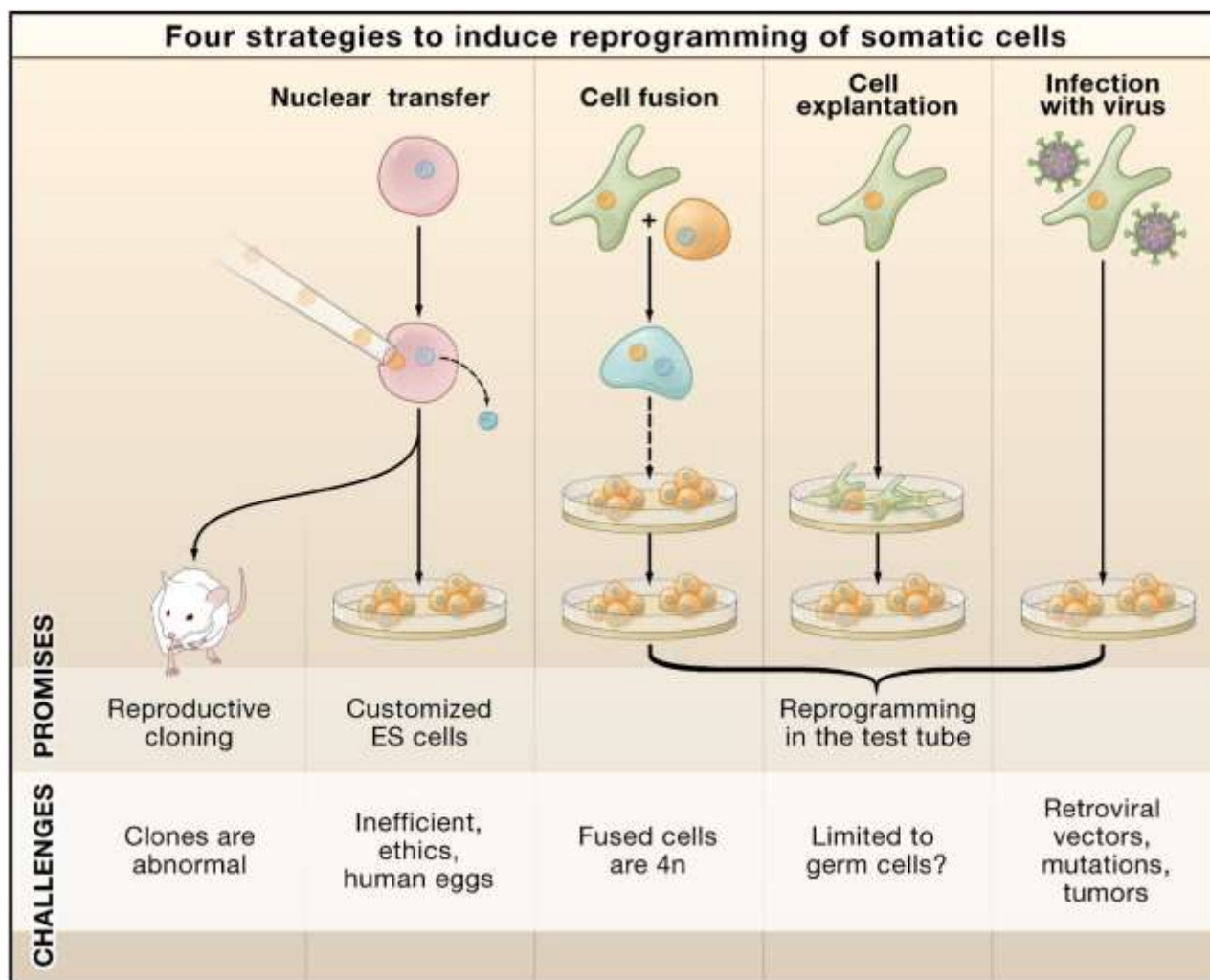
干细胞基础实验

诱导多能干细胞的病毒制备

体细胞重编程

- 重编程（reprogramming），又称为体细胞重编程或细胞核重编程，是指将分化的体细胞的记忆抹去，使其回到胚胎来源细胞的状态，具有多向或定向的分化潜能。
- 与胚胎干细胞相比，重编程的方法可从特定个体获得多能干细胞，其细胞来源不再受到发育时期和区域的限制，并避免了个体间差异带来的免疫排斥反应，因而在医学上有着更为深远的应用前景。

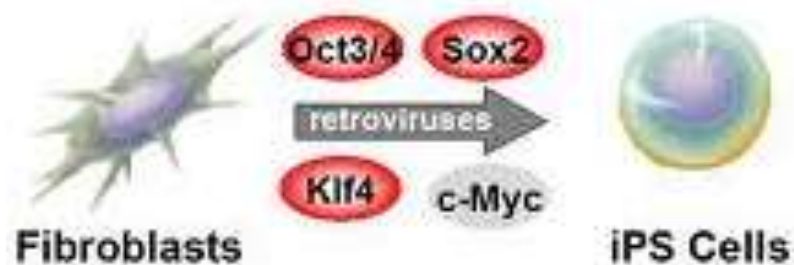
体细胞重编程



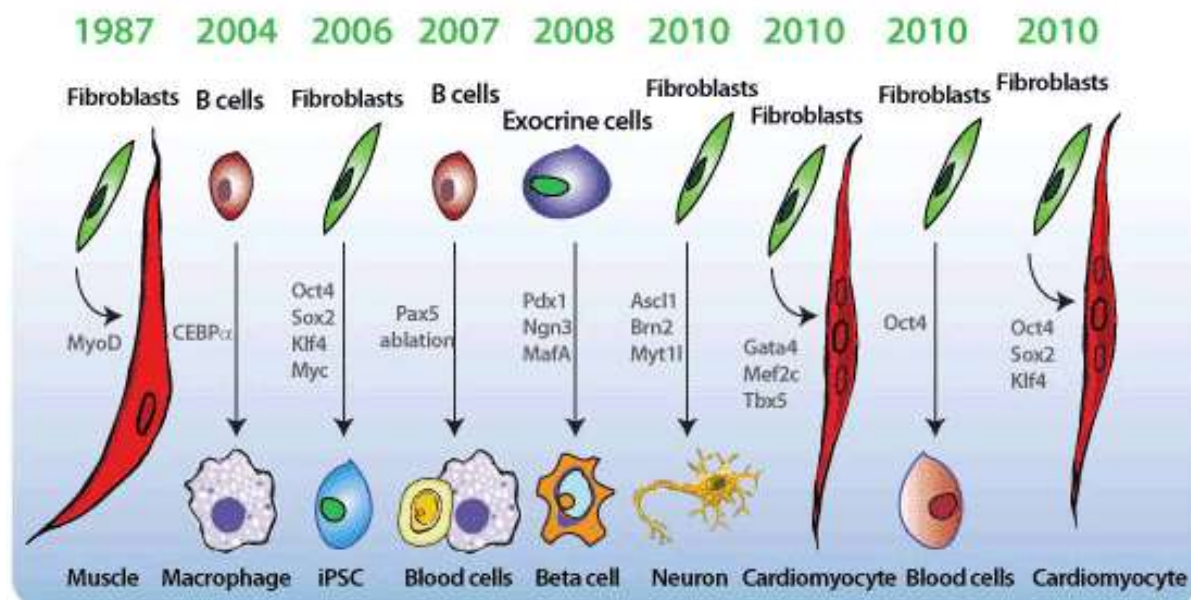
目前重编程主要有三种方法：

- 核移植
- 细胞融合
- 诱导性多能干细胞
(induced pluripotent stem cell, iPSC) 技术

诱导多能干细胞技术

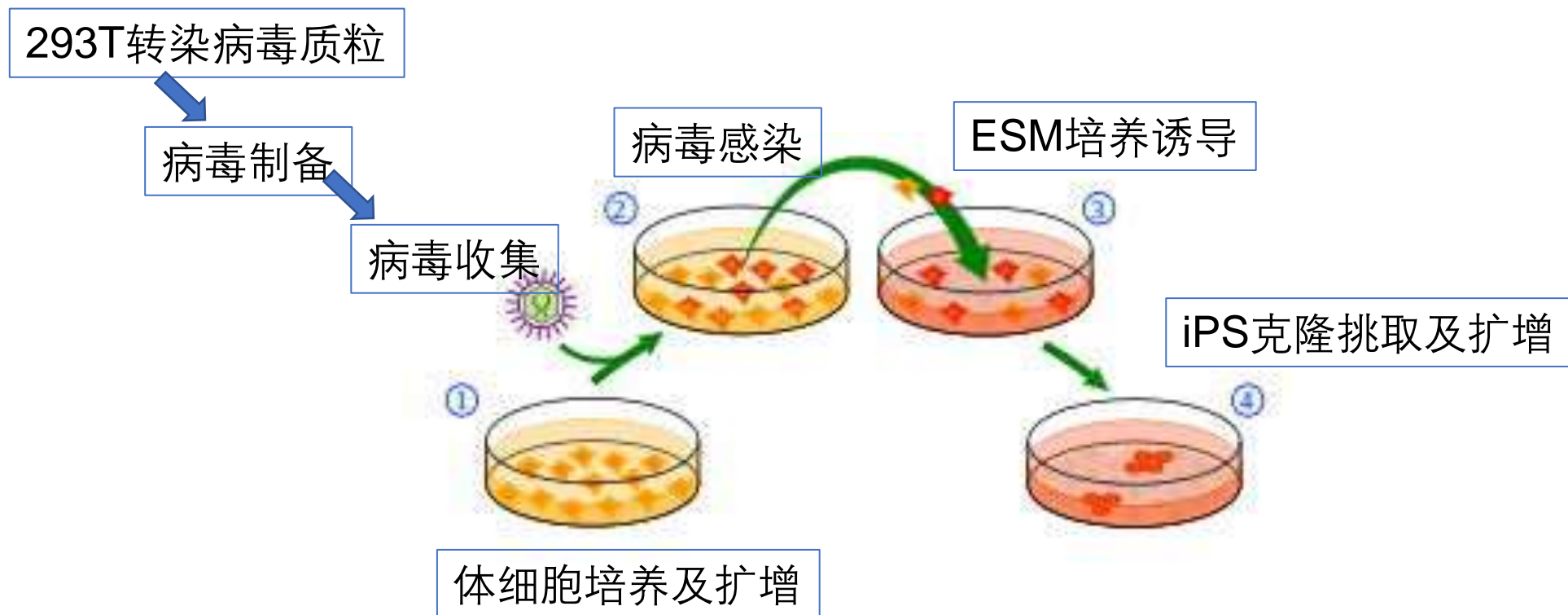


Mouse iPS cells reported in 2006
Human iPS cells reported in 2007



- 体细胞来源:
- 关键转录因子:
- 培养诱导体系:
- 转分化:

诱导多能干细胞技术



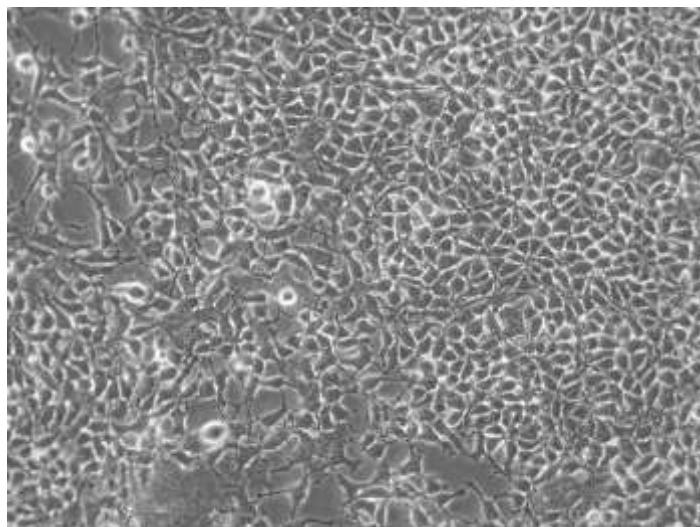
诱导多能干细胞的病毒制备

- **293T细胞传代:**

- 来源于人的胎肾上皮；通过转染腺病毒E1A基因获得293细胞，再表达SV40-large T抗原，获得293T细胞

- **培养特性:**

- 转染效率高
- 贴壁性差
- 增殖快



当293T细胞长到80%-90%左右，进行传代；

沿培养皿边加入1-2ml DPBS，轻轻转动培养皿，吸去DPBS；

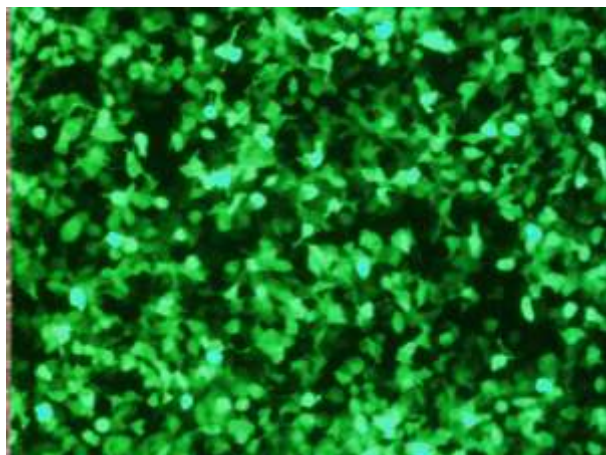
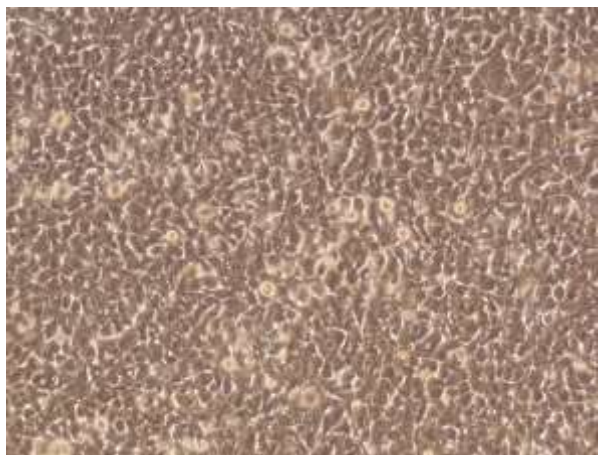
加入0.5-1ml 0.05%胰酶，37°C消化1min，再加入1ml FM中和，吹打至单细胞悬液；1000rpm离心5分钟；

弃去上清，计数后以 3×10^5 细胞/35mm培养皿的密度接种，正常情况下1:3-1:5传代。

混匀！！

诱导多能干细胞的病毒制备

- 293T细胞转染:



Vigofect转染试剂
生理盐水（150mM）
病毒载体相关质粒

北京威格拉斯公司
国药集团化学试剂
Addgene

转染：将外源性基因导入细胞内的一种专门技术。

大致可分为：

物理介导：导电穿孔法、显微注射和基因枪

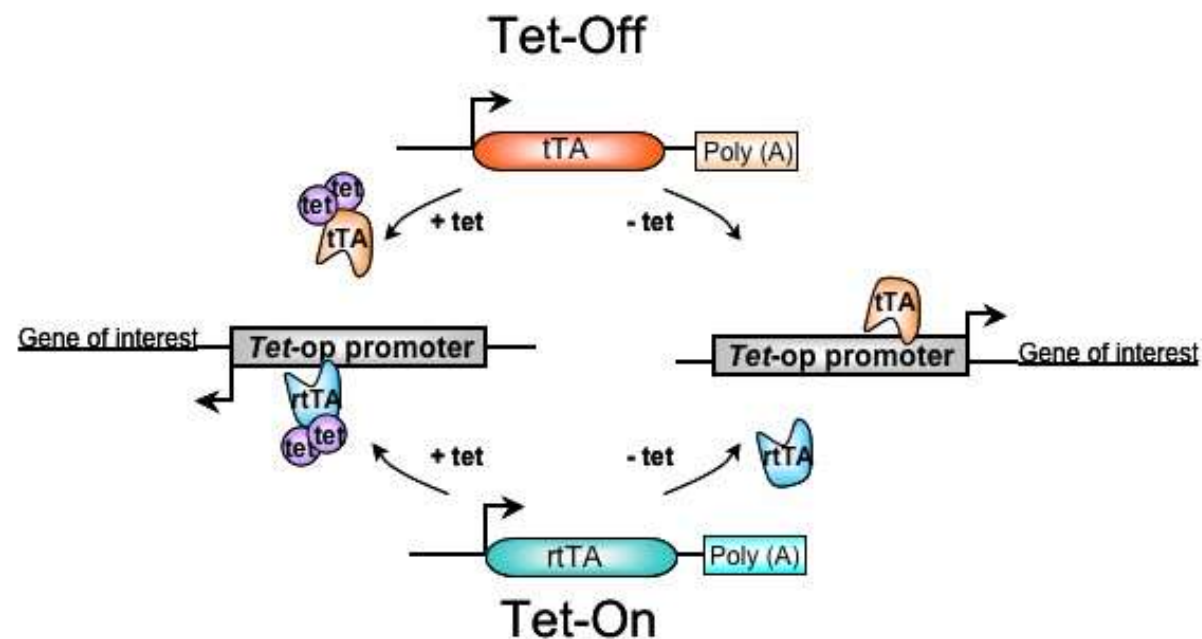
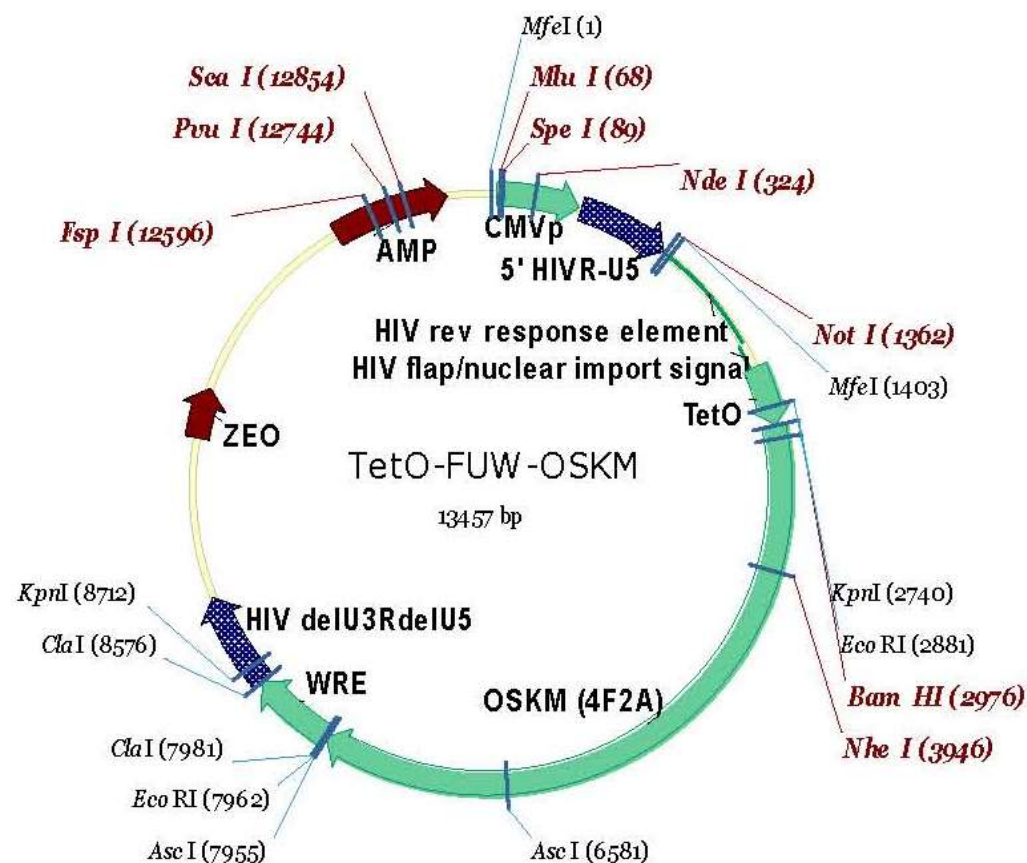
化学介导：磷酸钙共沉淀法、脂质体转染方法、阳离子物质介导

生物介导：原生质体转染、病毒介导的转染等。

VigoFect：是一种以阳离子非脂性物质为主的配方组分，该类物质介导的细胞转染，是目前非病毒转染方法中转染效率最高的方法。

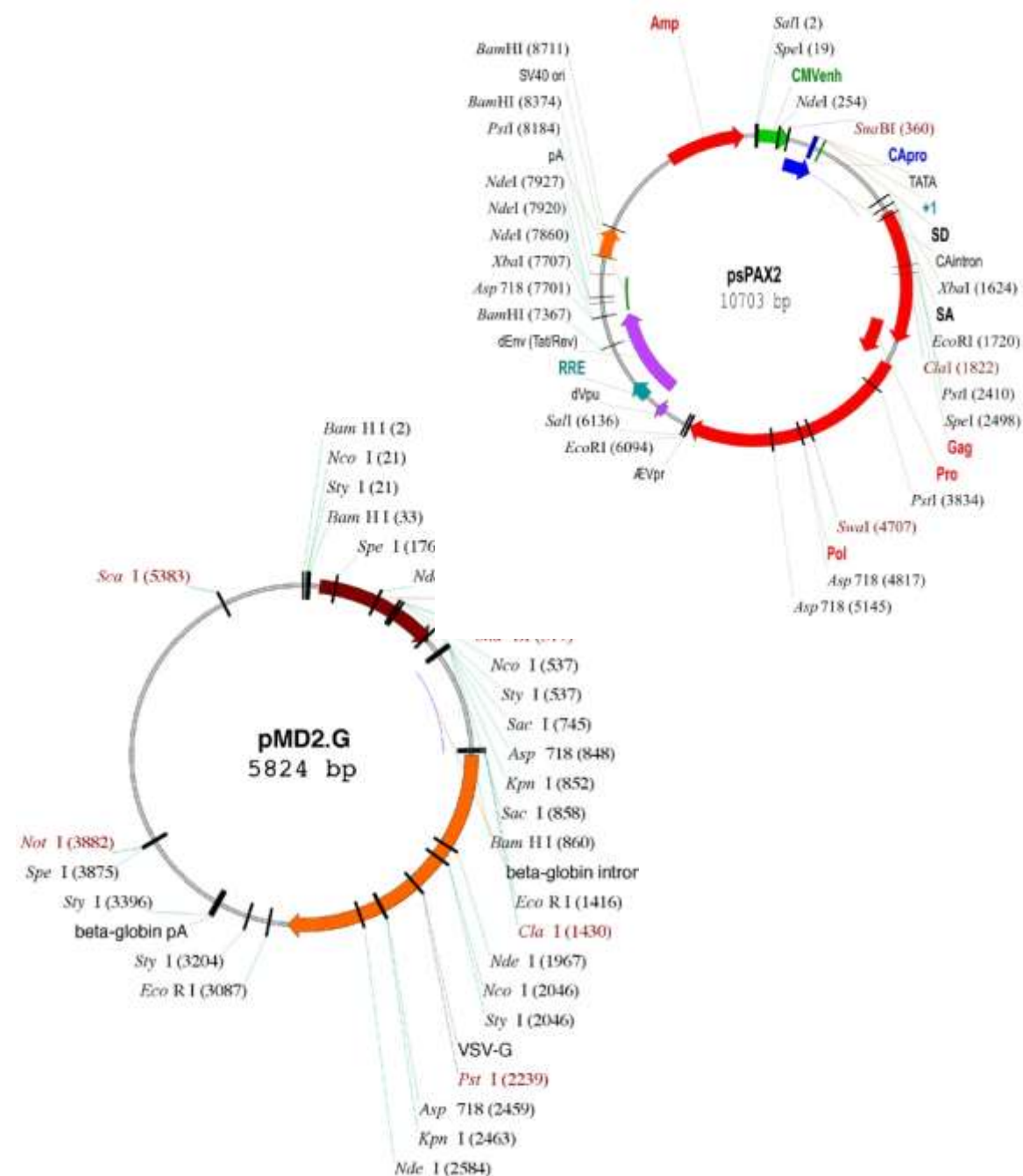
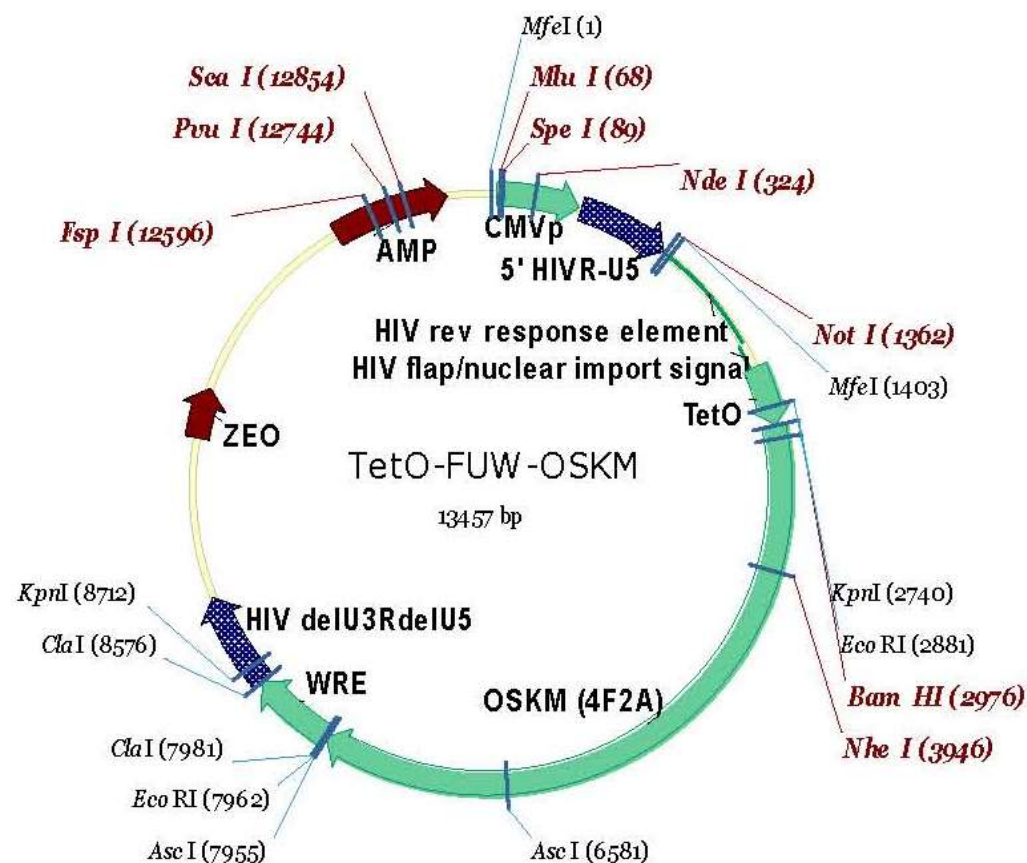
诱导多能干细胞的病毒制备

- 293T细胞转染:



诱导多能干细胞的病毒制备

- 293T细胞转染:



诱导多能干细胞的病毒制备

• 293T细胞转染:

- 扩增293T细胞至2X35mm培养皿，至其密度约为50%—70%时可以细胞转染。
- 将培养皿中的293T细胞换液, 换成2ml新鲜的预热的FM培养基。
- 对每一个35mm的培养皿，在1.5ml的Ep管中加入2 ul的Vigofect转染试剂，98 ul的150mM生理盐水，混匀后室温放置5min。
- 在另一个1.5ml的Ep管中加入2.5 ug的病毒质粒，1.5 ug的pol/Gag包装质粒和1 ug的VSV-G感染质粒，加入150mM生理盐水至100ul，混匀后室温放置5min。
- 将转染试剂稀释液逐滴加入质粒稀释液中, 室温放置15min
- 将混合后的液体逐滴加入293T培养基中, 混匀后放入37℃, 5%CO₂培养箱中培养8h后换成新鲜的FM培养基。
- 病毒包装48小时候收集上清，用0.45um的滤器过滤后，进行细胞感染。

废弃病毒液及材料的处理:

由VSV-G包被的逆病毒可以感染人的细胞, 因此操作过程中要非常小心, 接触过病毒的器材及废液应在84消毒液中浸泡超过24h后再丢弃。

思考题

- **293T**细胞操作时需要注意什么？
- 废弃病毒液体及材料如何处理？

垃圾分类

- 废液：生物安全柜内的废液缸
- 枪头、移液管：细胞房内的垃圾桶内
- 帽子、手套、口罩：细胞房门口的垃圾桶内

完成实验后，请用酒精棉球擦拭台面，倒掉废液缸中的废液，丢掉废弃的枪头，清洗手术器械置于510的白瓷盘内。

- 实验结束后，请将使用过的枪头盒和手术器械带出细胞间，使用过的手术器械用自来水仔细洗干净，不得有小鼠组织残留。清洗后的手术器械放回饭盒连同枪头盒（枪头插满）放置在细胞间门口的小车上。
- 废液缸倒掉废液，自来水冲洗后，内外喷75%酒精，纸巾擦干后放回细胞间超净台。超净台内使用的物品归位，枪调至最大量程挂回架子上。