

hPSC Nucleofection Buffer

操作使用说明

一、产品简介

人类多能干细胞 (human pluripotent stem cell, hPSC) 包括人类胚胎干细胞 (human embryonic stem cell, hESC) 和人类诱导多能干细胞 (human induced pluripotent stem cell, hiPSC), 是一类能够自我更新、无限增殖, 并具有分化为人体内几乎所有类型细胞能力的多能干细胞, 是干细胞研究的热点和焦点。生产的 hPSC Nucleofection Buffer 是专门针对各种未分化条件下培养的人类多能干细胞研发的用于电转染的溶液, 可实现稳定的高转染效率, 转染后细胞存活率高, 对细胞无毒害, 不影响下游实验, 是人多能干细胞转染的完美解决方案。

二、产品信息

表 1: hPSC Nucleofection Buffer 产品说明

产品信息	货号	规格
hPSC Nucleofection Buffer	RP01005	2.5 mL (25 rxn)

三、保存条件

- 保存温度: 4°C。
- 有效期: 6 个月。

四、设备材料

表 2: 推荐设备&材料

人多能干细胞电转-推荐设备与材料
电转仪 Amaxa Nucleofector (II、IIb或其他型号)
平衡至室温的 hPSC Nucleofection Buffer
与电转仪配套的电转杯和塑料滴管
电转所需的质粒 (浓度0.5-1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, A260/A280值在1.80左右)
合适数量的人多能干细胞 (每个电转反应 2×10^6 - 4×10^6 细胞)
NcEpic或NcTarget多能干细胞培养基 (或mTeSR, E8等hPSC培养基) 及Matrigel或Vitronectin包被的培养皿
消化人多能干细胞所需的Solase单细胞消化液/Accutase消化液

五、电转前的准备

1. hPSC 的培养（以 NcEpic 或 NcTarget 多能干细胞培养基/Matrigel 培养体系为例）

- hPSC 细胞按 1:10-1:20 的比例正常传代，每 4 天传代 1 次，每天更换新鲜的培养基。推荐使用汇合度达到 80%-90%的 hPSC 进行电转。

2. hPSC 的消化

TIPS: 电转前需要将 hPSC 消化为单细胞悬液，细胞团块会降低电转效率和电转后细胞的存活率。如果下述步骤不能获得单细胞悬液，则电转前需通过预实验优化 Solase 的消化时间。

2.1. 对于无滋养层系统(如 Matrigel)培养的 hPSC, 使用预热到室温的 Solase 于 37°C 培养箱内消化 5-10 min 使细胞充分分散。加入预热到室温的 DMEM/F12 培养基终止消化，用 5 mL 的移液管吹吸 1-2 次以获得单细胞悬液。

2.2. 对于培养在 feeder 系统的 hPSC，电转实验之前需先传代一次并接种于 Matrigel 上，培养至汇合度 80%-90%，然后使用 2.1 中的方法进行消化。

六、hPSC 电转

表 3: 电转体系

以六孔板一个孔为例，每个电转反应体系包含
2×10^6 - 4×10^6 人多能干细胞
1-5 μ g 质粒 DNA
100 μ L hPSC Nucleofection Buffer

1. 准备 Amaxa II 电转仪，设置电转程序为 B016。
2. 将所需体积的 Solase（六孔板每孔需要 1 mL）和 DMEM/F12 培养基（六孔板每孔需要 3 mL）预热至室温。
3. 向 Matrigel 包被的板中每孔加入 2 mL 的培养基+ ROCK inhibitor，放入 37°C 培养箱预平衡。
4. 将 1-5 μ g 质粒 DNA 加入无菌的 1.5 mL 离心管中，质粒总体积不超过 10 μ L。
5. 向已加入质粒的 1.5 mL 离心管中加入 100 μ L hPSC Nucleofection Buffer，混匀。瞬时离心机离心以收集混合液于管底。
6. 从培养箱内取出准备用于电转的 hPSC 培养板，吸弃培养基，每孔用 2 mL 的 DPBS 洗一次。
7. 每孔加入 1 mL 预热的 Solase，将培养板放入 37°C 培养箱，消化 5-10 min。
8. 每孔加入 2 mL 预热的 DMEM/F12 培养基，吹吸 1-2 次以获得单细胞悬液。
9. 将所有细胞收集到一个 15 mL 离心管中，120 g 离心 4 min。
10. 吸弃 15 mL 离心管中的上清，轻弹管底数次以使细胞沉淀松散。用预热的 DMEM/F12 培养基（约每孔加入 1 mL）吹吸 5-6 次以充分分散细胞。

11. 取 10 μL 细胞悬液进行计数，按每管 $2-4 \times 10^6$ 细胞，将细胞悬液分至新的 1.5 mL 离心管中。
12. 瞬时离心机离心 8 秒收集细胞，小心吸弃上清，轻弹管底数次使细胞沉淀松散。
13. 取出步骤 3 中预平衡的培养板备用。

TIPS: 以下所有步骤应以连续且轻柔的操作尽可能在短时间内完成。

14. 向各管中对应的加入步骤 5 中准备好的 hPSC Nucleofection Buffer & 质粒混合液，轻弹管底数次以使细胞充分悬浮（注意：避免使用微量移液器吹吸细胞）。
15. 将细胞&质粒&电转液混合物转移到电转杯中（注意：吹吸时尽量轻柔），在操作台上轻拍两次以去除气泡，放入电转仪的槽内，实施电转程序 B016。
16. 取出电转杯，用小吸管从步骤 13 中准备好的六孔板内吸取约 500 μL 的培养基，沿壁缓慢加入电转杯，在操作台上轻拍两次以混匀，用小吸管小心吸取混合物，并逐滴加回六孔板对应孔内，轻轻摇晃培养板以使细胞分布均匀。
17. 将培养板放回 37°C 培养箱内培养，电转后 16-24 小时可检测基因表达情况。

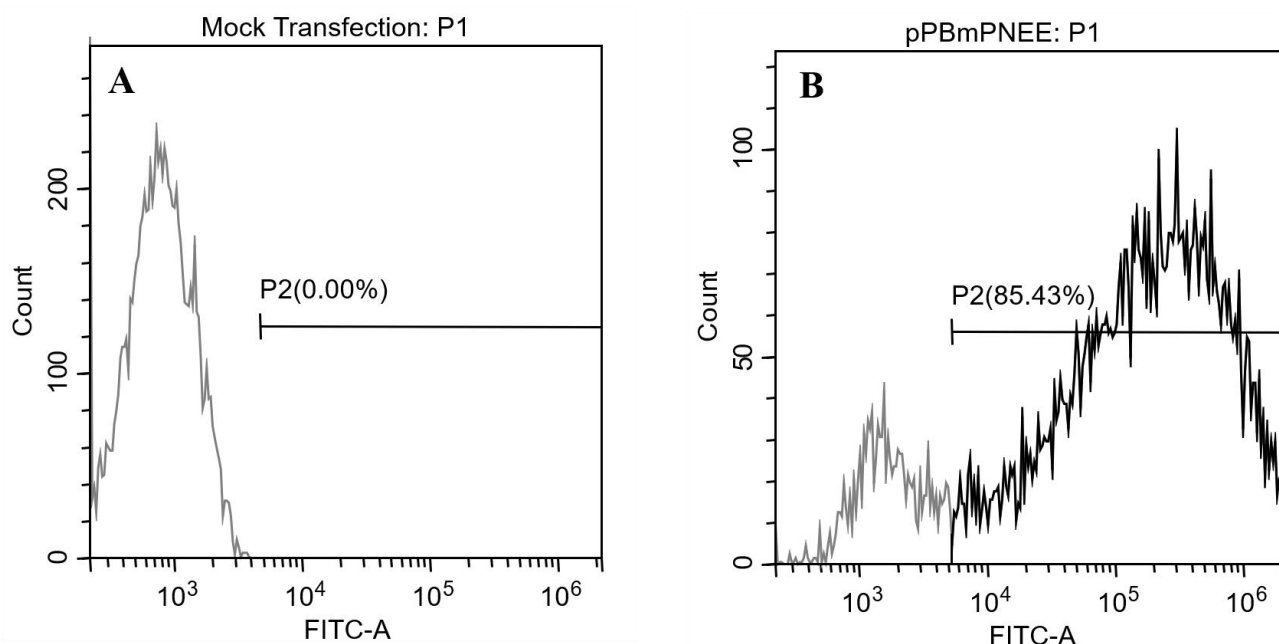


图 1: 使用 hPSC Nucleofection Buffer 转染 hiPSC 示例:

把 2 μg 表达 EGFP 的 pPBmPNEE 的质粒(~6.5kb)电转入 hiPSC, 转染后 24 小时使用流式细胞仪检测 EGFP 阳性细胞。

A: 电转时未加入质粒的阴性对照; B: 电转时加入 pPBmPNEE 质粒。转染效率可达 85.43%。