

invitrogen

# LIPOFECTAMINE 3000

解 放 您 的 细 胞



**Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 试剂**  
**诱导多能性干细胞 (iPSCs) 的生成和转染**

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

诱导多能性干细胞(iPSCs)在再生医学以及各种疾病和状态的个性化治疗方面拥有极为广阔的前景。Lipofectamine® 3000转染试剂提供了一种经济高效的核酸导入方法，可替代电穿孔方法，激发干细胞的潜能。这种先进的脂质体纳米微粒技术可以最大程度地减少电穿孔方法对细胞产生的压力，简化重编程工作流程，使您能够应用先进的基因编辑技术。

Lipofectamine® 3000试剂可提供：

- 出众的效率 — 适用于各种难以转染的细胞
- 低毒性 — 对细胞作用温和，提高了细胞活性
- 功能多样 — 适用于DNA、RNA和共转染的试剂盒

“它成功转染了GT1-1细胞，而采用除病毒和nucleofector外的其他试剂却从未成功。”

—Julien Sebag, 博士  
范德堡大学助理教授

# 目录

利用供体来源的成纤维细胞生成iPSCs	4
多能性干细胞的基因组编辑	6
采用Lipofectamine® 3000试剂转染多能性干细胞	7
详细的人成纤维细胞重编程实验方案	8



# 利用供体来源的成纤维细胞生成iPSC

## 成纤维细胞重编程

病人来源的iPSCs可提供其他供体无法提供的细胞群体，具有极佳的潜能。将供体体细胞高效重编程为iPSCs是实现上述潜能的关键。在本研究中，采用Epi5™附着体iPSC重编程试剂盒\*和Lipofectamine® 3000试剂对取自三位供体的皮肤活检组织的成纤维细胞进行重编程(图1和图2)。其重编程效率与电穿孔方法相当(图3)。这项进展有助于最大程度地减少电穿孔方法对细胞产生的压力，简化了重编程工作流程，可生成无转基因、无病毒的人iPSCs，效率为0.04%至0.3%。

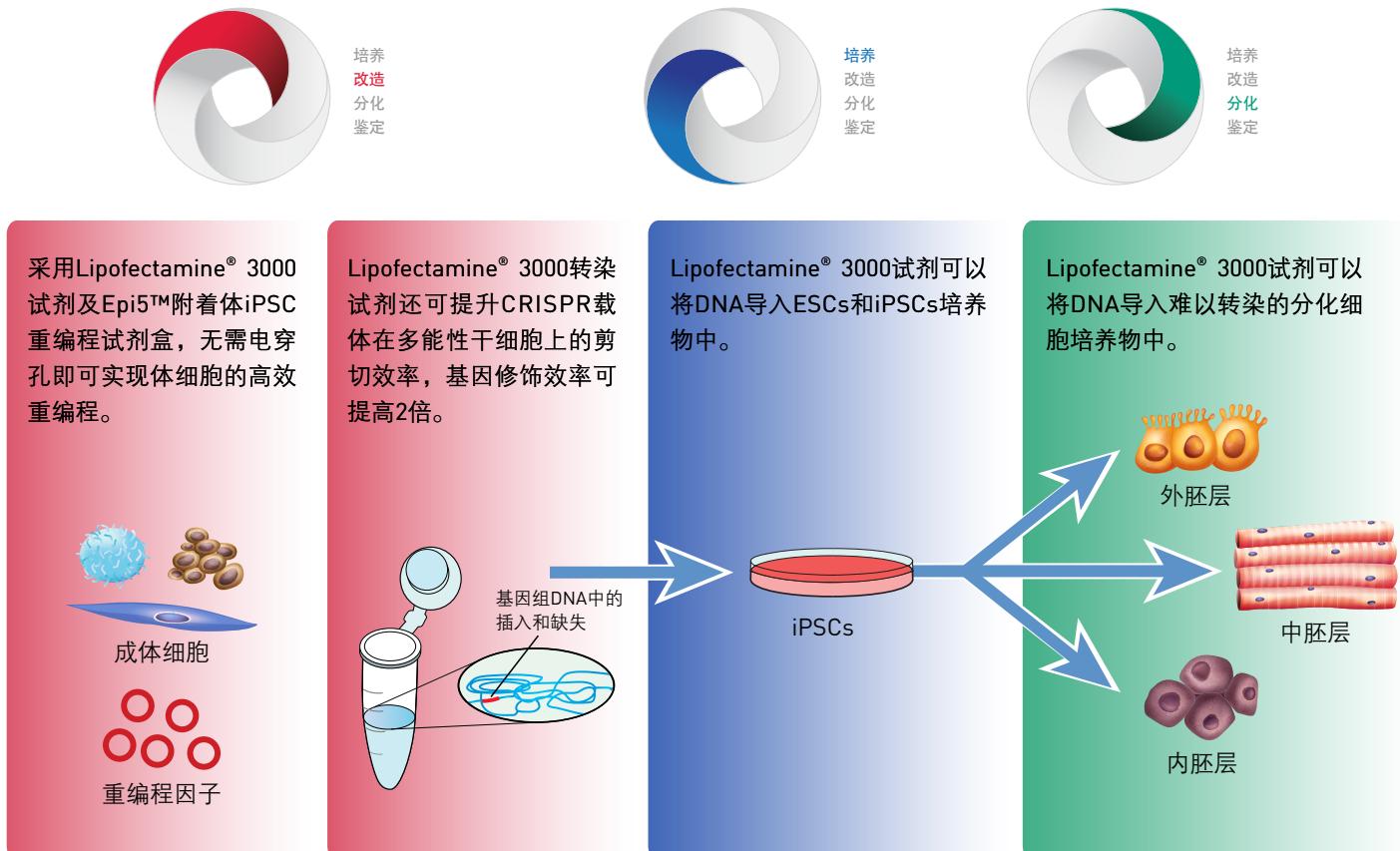


图1. Lipofectamine® 3000试剂用于多能性干细胞应用领域。Lipofectamine® 3000可提供高转染效率，适用于各种应用领域，包括成纤维细胞的重编程、基因编辑和难以处理的细胞的转染。

\* 由Okita博士设计，Okita博士是东京大学iPS细胞研究和应用中心(CiRA)的Yamanaka教授实验室中的一员。

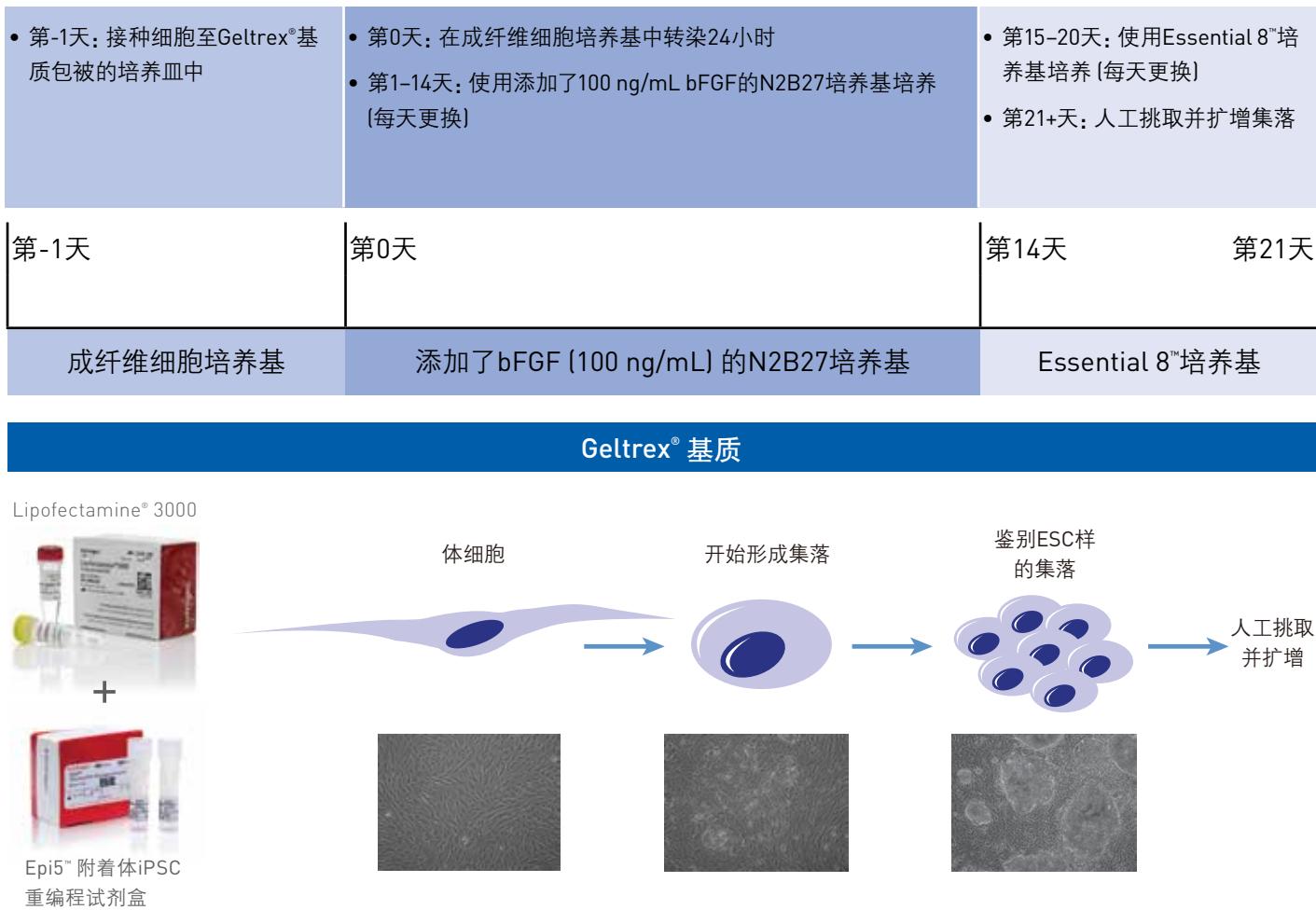


图2. 采用Epi5™重编程试剂盒和Lipofectamine® 3000试剂生成iPSCs的实验方案大纲。成纤维细胞转染后21天内挑取集落并扩增。

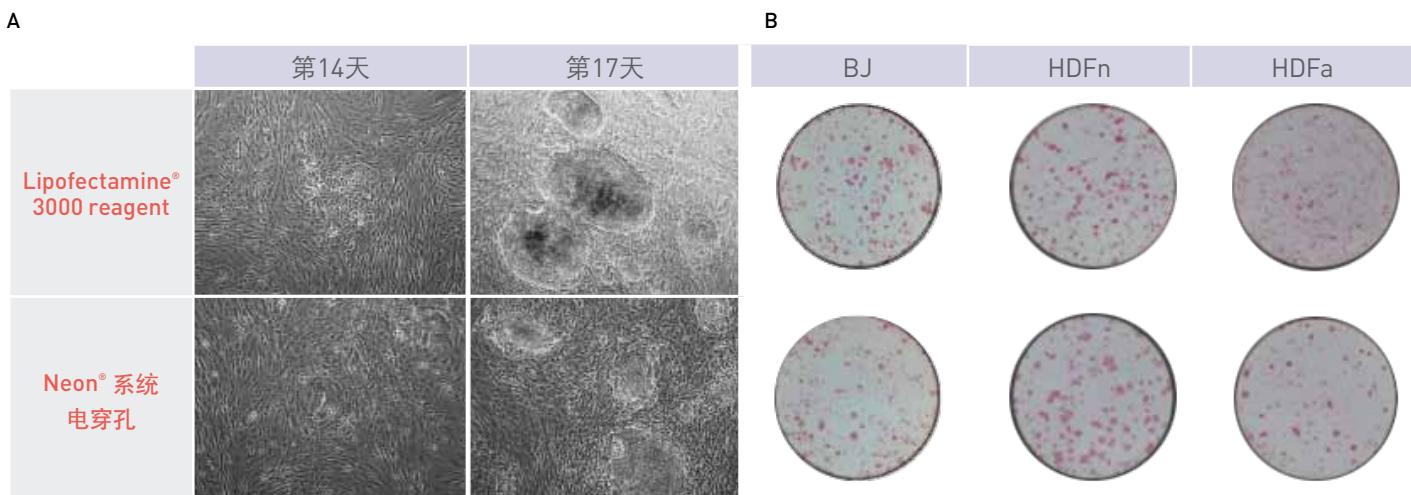
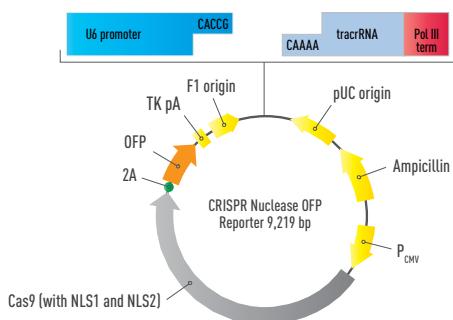


图3. Lipofectamine® 3000试剂的重编程效率与电穿孔的比较。采用Lipofectamine® 3000试剂或Neon®转染系统转染Epi5™载体，将BJ成纤维细胞及新生儿(HDFn)和成体(HDFa)人皮肤成纤维细胞重编程成iPSCs。采用(A)明场显微镜和(B)碱性磷酸酶染色观察集落。

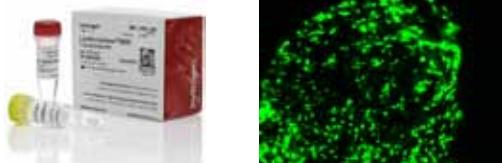
# 多能性干细胞的基因组编辑

成簇的规律间隔短回文重复序列(CRISPR)基因组编辑技术可实现特定位点DNA的精确剪切。但基因组编辑的效果依赖于目的位点本身的特性、导入效率以及生成稳定细胞系和沉默模型以研究这些基因修饰的表型效应的下游过程。我们在此演示了采用靶向CRISPR载体，Lipofectamine® 3000可以将质粒DNA导入各种iPSC集落，用于基因组改造。采用Lipofectamine® 3000试剂的基因改造效率较Lipofectamine® 2000试剂高2倍多，且脂质体用量更低(图4)。

## 设计GeneArt® CRISPR载体的插入片段



## 采用Lipofectamine® 3000试剂导入

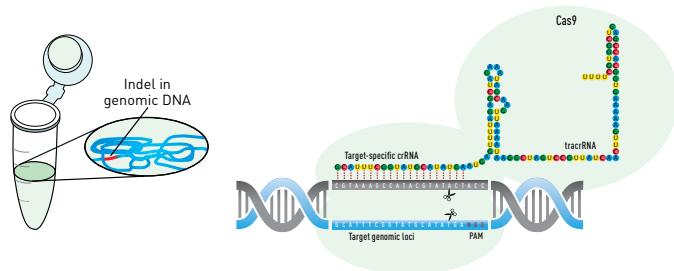


1 kb分子量标准	Lipofectamine® 2000	Lipofectamine® 3000	GFP对照载体
剂量 (μL)	0.3	0.5	0.15



基因修饰效率 (%)	2.5	3.6	5.5	4.0	0.0
------------	-----	-----	-----	-----	-----

## 采用GeneArt® 基因组剪切检测试剂盒 测定剪切效率



## 集落筛选和扩增

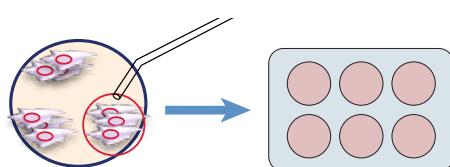


图4. Lipofectamine 3000® 可提升iPSC中CRISPR载体的剪切效率。采用Lipofectamine® 2000或Lipofectamine® 3000试剂瞬时转染靶向特异性位点的GeneArt® CRISPR载体。采用GeneArt® 基因组剪切检测试剂盒评估剪切效率。

# 采用Lipofectamine® 3000试剂转染多能性干细胞

采用Lipofectamine® 3000转染试剂可将DNA导入正在Geltrex®基质包被的培养板上生长的难以转染的干细胞中(H9 ESCs和iPSCs) (图5)。转染效率为40–70%，平均荧光强度较高(图6)。

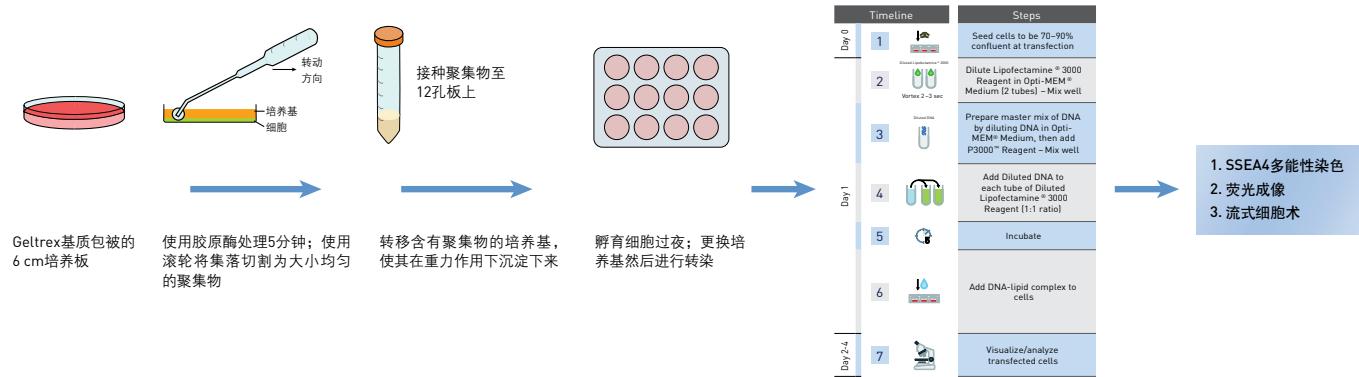


图5. 采用Lipofectamine® 3000试剂转染多能性干细胞的实验方案大纲。将细胞从Geltrex®基质包被的培养板转移至多孔板中，采用Lipofectamine® 3000试剂转染细胞。采用流式细胞仪和荧光成像法评估转染效率。

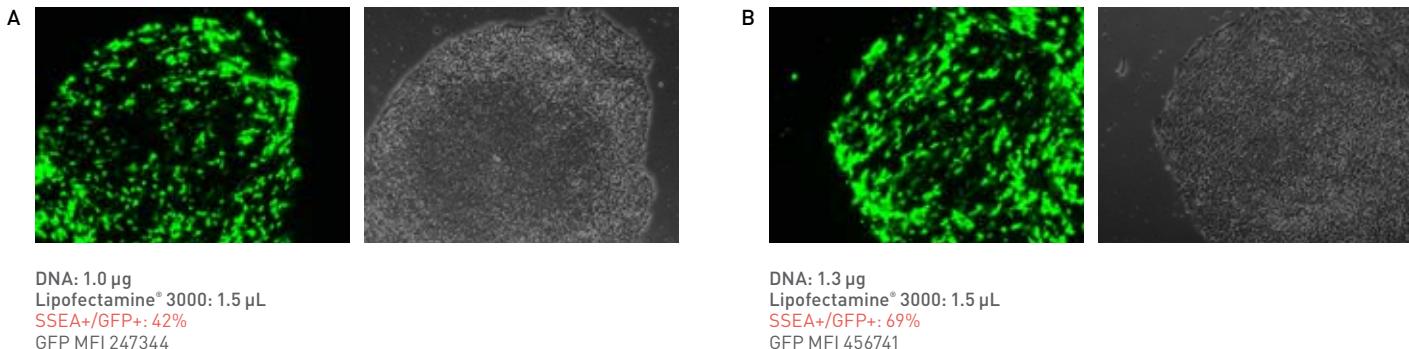


图6. 干细胞转染。采用Lipofectamine® 3000试剂转染(A) H9 ESCs或(B) iPSCs。荧光显微镜观察细胞，然后采用流式细胞仪测定转染效率。

## 总结

Lipofectamine® 3000转染试剂可用于提升难以转染的细胞的转染效率。在本研究中，我们演示了采用出色的转染试剂(如Lipofectamine® 3000试剂)结合Epi5™附着体iPSC重编程试剂盒，无需电穿孔即可实现体细胞的高效重编程。

# 详细的人成纤维细胞重编程实验方案

采用Lipofectamine® 3000转染试剂及Epi5™附着体iPSC重编程试剂盒，无需电穿孔即可实现体细胞的高效重编程。

重编程时间安排				
第-1天	第0天	第1-14天	第15-20天	第21+天
接种细胞至Geltrex® 基质 包被的6孔板中	在成纤维细胞培养基中转染24小时	添加了100 ng/mL FGF的 N2B27培养基(每天更换 培养基)	Essential 8™ 培养基(每天 更换培养基)	集落可供挑取，用于进一步培养和扩增

细胞和试剂	货号	设备
Epi5™附着体iPSC重编程试剂盒	A15960	配备有立体显微镜的无菌细胞培养通风橱(即生物安全柜)
Lipofectamine® 3000转染试剂	L3000015	倒置显微镜
Opti-MEM® I减血清培养基	31985062	37°C、5% CO <sub>2</sub> 培养箱
重组人碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)	PHG0261	37°C水浴箱
KnockOut™血清替代物	10828010	无菌血清移液管(5 mL、10 mL)
Essential 8™培养基	A1517001	离心机
DMEM/F-12, GlutaMAX™添加剂	10565018	15 mL离心管
N-2添加剂(100X)	17502048	经过组织培养处理的6孔板
B-27®无血清添加剂(50X)	17504044	10 μL、200 μL和1,000 μL PIPETMAN®微量移液器及吸头
100X MEM非必需氨基酸(NEAA)	11140050	
β-巯基乙醇	21985023	
胎牛血清, 经过ESC质量认定	1614106	
DMEM, 高糖, GlutaMAX™添加剂	10566016	
0.05%胰蛋白酶-EDTA (1X), 酚红	25300054	
Geltrex® 经hESC验证且不含LDEV的低生长因子基底膜基质	A1413301	
不含钙和镁的杜氏PBS (DPBS)	14190	



# 细胞和试剂制备

## I. 培养基制备

### 成纤维细胞培养基

配制500 mL的成纤维细胞培养基，在无菌条件下将下列组分混匀。成纤维细胞培养基可置于4°C下保存至多1个月。

DMEM	445 mL
胎牛血清 (FBS)，经过ESC质量认定	50 mL
100X MEM NEAA (10 mM)	5 mL

### N2B27培养基

配制500 mL的N2B27完全培养基，在无菌条件下将下列组分混匀。N2B27培养基(不含bFGF)可置于2-8°C下保存至多1周。

DMEM/F-12	479 mL
N-2添加剂 (100X)	5 mL
B-27® 添加剂 (50X)	10 mL
100X MEM NEAA (10 mM)	5 mL
B-巯基乙醇 (1,000X)	908 μL

### bFGF (100 μg/mL)

1. bFGF储液：配制1 mL的100 μg/mL bFGF溶液，在无菌条件下将下列组分混匀：

bFGF	100 μg
不含Ca <sup>2+</sup> 和Mg <sup>2+</sup> 的DPBS	999 μL
KnockOut™ 血清替代物	1 μL

2. 分装bFGF溶液，置于-20°C下保存至多6个月。

3. 每mL N2B27培养基需要使用1.0 μL bFGF。制备不含bFGF的N2B27培养基，在使用培养基时加入新鲜的bFGF，使其终浓度为100 ng/mL。

## Essential 8™ 培养基

1. 配制500 mL Essential 8™培养基，在2-8°C下过夜解冻Essential 8™添加剂。切勿在37°C下解冻添加剂。
2. 将试管轻轻上下颠倒数次，使解冻的添加剂混匀，从Essential 8™基础培养基瓶中取出10 mL，然后在无菌条件下将整管Essential 8™添加剂转移至Essential 8™基础培养基瓶中。
3. 轻轻晃动培养基瓶混匀，即可获得500 mL均匀的完全培养基。
4. Essential 8™完全培养基可置于2-8°C下保存至多2周。使用前，先在室温下预热当天所需的完全培养基，直到触摸感觉不冷为止。切勿37°C下预热培养基。

## II. Geltrex® 基质包被的培养皿的制备

1. 4°C过夜解冻Geltrex®基质。
2. 取出4°C保存的DMEM/F-12。在冰上进行无菌操作，以防聚合。用等量DMEM/F-12 (1:1)稀释Geltrex®基质，轻轻混匀。分装至微量离心管中，立即置于-20°C冻存。
3. 使用1:1稀释的Geltrex®基质及DMEM/F-12，在冰上制备工作储液。一般培养时，我们推荐的最终稀释度为1:100。加入1.5 mL的Geltrex™基质的工作储液，覆盖6孔板中每个孔的整个表面。
4. 37°C下孵育包被的培养器皿1小时。将培养板或培养皿转移至层流通风橱内，使其平衡至室温(约1小时)后使用。如果不立刻使用包被的培养板或培养皿，则使用Parafilm®封口膜密封，置于4°C下保存至多2周。必须注意防止保存的培养皿干燥或被污染。

### III. 成纤维细胞培养

1. 在37°C水浴箱中预热成纤维细胞培养基。
2. 戴上眼部防护设备，加热置于液氮中保存的冻存管可能会发生爆炸。
3. 戴上超低温防护手套。使用金属钳从液氮储存罐中取出BJ成纤维细胞冻存管。
4. 来回在手中转动细胞管约10–15秒除霜。
5. 将细胞管浸于37°C水浴箱中。轻轻晃动。

注：管盖不浸于水中。

6. 当细胞管中只剩一块冰晶时，从水中取出。
7. 用70%乙醇拭擦细胞管外部，放入细胞培养通风橱中。
8. 用1 mL微量移液器吸取细胞至50 mL锥形管中。
9. 使用10 mL移液器，将10 mL预热的成纤维细胞培养基逐滴加入50 mL锥形管中(防止细胞出现渗透压休克)，轻轻晃动锥形管。上下吹打，轻轻混匀。
10. 200 × g离心细胞4分钟，吸弃上清液。
11. 使用适量的成纤维细胞培养基重新悬浮细胞沉淀。一般使用经过组织培养处理的T25培养瓶，将细胞管中的内容物接种于5–7 mL培养基中。
12. 将BJ成纤维细胞培养物置于37°C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育过夜。
13. 第二天，吸弃用过的培养基，加入预热的新鲜成纤维细胞培养基。每隔一天更换培养基，直至培养瓶达到约70%融合。
14. 达到70%融合时，必须分种并重新接种培养物，创建细胞库，或直接接种用于Epi5™ 转染。推荐使用一部分早期传代细胞进行实验。
15. 分种成纤维细胞培养物，吸弃培养器皿中的成纤维细胞培养基。

16. 加入5 mL不含CaCl<sub>2</sub>和MgCl<sub>2</sub>(为确保培养皿中成纤维细胞的适当解离，不得有二价阳离子存在)的室温DPBS冲洗培养皿，使冲洗液在室温下停留5分钟。
17. 吸弃DPBS冲洗液，室温下加入2 mL 0.05%胰蛋白酶-EDTA至培养器皿中(根据培养器皿的大小调整胰蛋白酶的体积，参见表7)。将培养物置于37°C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育约3至5分钟。在显微镜下观察细胞，当细胞开始变圆时停止孵育。
18. 加入4 mL预热的成纤维细胞培养基至培养皿中，终止胰蛋白酶消化。冲洗悬液数次，将全部细胞从培养器皿表面冲下，收集所有细胞，制备单细胞悬液。将细胞悬液转入15 mL离心管中。
19. 200 × g离心细胞4分钟，吸弃上清液。
20. 用2至3 mL预热的新鲜成纤维细胞培养基重悬细胞沉淀，上下吹打，形成单细胞悬液。
21. 计数细胞，将适量细胞接种至经过组织培养处理的新培养皿中，加入适当体积的培养基。每3至4天定期分种一次，一般可以分种1至6份。

### IV. Epi5™ 附着体载体重编程

接种人成纤维细胞至Geltrex® 基质包被的培养皿中6孔板每孔中接种50,000至100,000个细胞，细胞~30–60%融合(参见图7)，每孔加入2 mL成纤维细胞培养基，置于37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下培养过夜。  
采用Lipofectamine® 3000试剂在6孔板中转染人成纤维细胞。

1. 将Opti-MEM® 培养基预热至室温，按下文所述制备A管和B管。
2. 将两种Epi5™ 重编程载体混合物各1.2 μL(共2.4 μL)加入标记为A管的1.5 mL Eppendorf® 管的118 μL Opti-MEM® 培养基中。加入4.8 μL P3000™ 试剂，充分混匀。

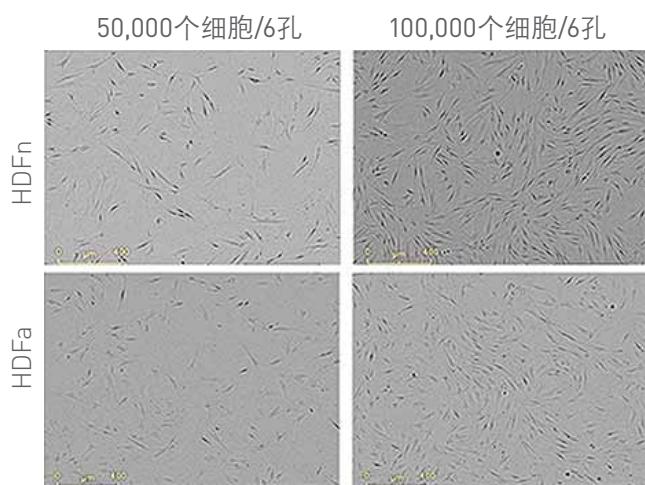


图7. 新生儿(HDFn)和成体(HDFa)人皮肤成纤维细胞的接种密度。

- 在标记为B管的1.5 mL Eppendorf®管中，使用121 μL预热的Opti-MEM®稀释3.6 μL Lipofectamine®3000试剂。

**注：**使用Opti-MEM®培养基稀释的Lipofectamine®3000试剂应在稀释后15分钟内用完。时间过长会导致转染效率下降。

A管和B管内容物(6孔板的每个孔所需)的制备如下表所示：

组分	体积
<b>A管</b>	
Epi5™重编程载体	1.2 μL
Epi5™ p53和EBNA载体	1.2 μL
Opti-MEM®培养基	118 μL
P3000™试剂	4.8 μL
<b>B管</b>	
Lipofectamine®3000试剂	3.6 μL
Opti-MEM®培养基	121 μL

- 制备转染预混液，加入A管和B管内容物，充分混匀。
- 室温下孵育转染预混液5分钟。
- 再次混匀，将全部250 μL转染预混液加至接种有人成纤维细胞的Geltrex®基质包被的培养板的各个孔中，每孔包含2 mL新鲜的成纤维细胞培养基。

- 将培养板置于37°C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育24小时。

#### 去除转染试剂并复苏细胞

- 转染24小时后，吸弃培养板中的培养基。每孔加入2 mL添加了100 ng/mL bFGF的N2B27培养基(在使用之前新鲜加入)。
- 每天更换N2B27培养基，每孔加入2 mL添加了100 ng/mL bFGF的N2B27培养基，更换用过的培养基，共计14天。

#### 过渡至*Essential 8™* 培养基

- 在第14天吸弃用过的N2B27培养基，更换为*Essential 8™*完全培养基。每天更换培养基，每孔2 mL。
- 每隔一天用显微镜观察培养板中是否出现具有转化细胞特征的细胞团块。在转染后第15至21天内，iPSC集落将生长至适合转移的大小。
- 第21天，集落形态明显，可供挑取用于进一步培养和扩增。数据示例如图8所示。

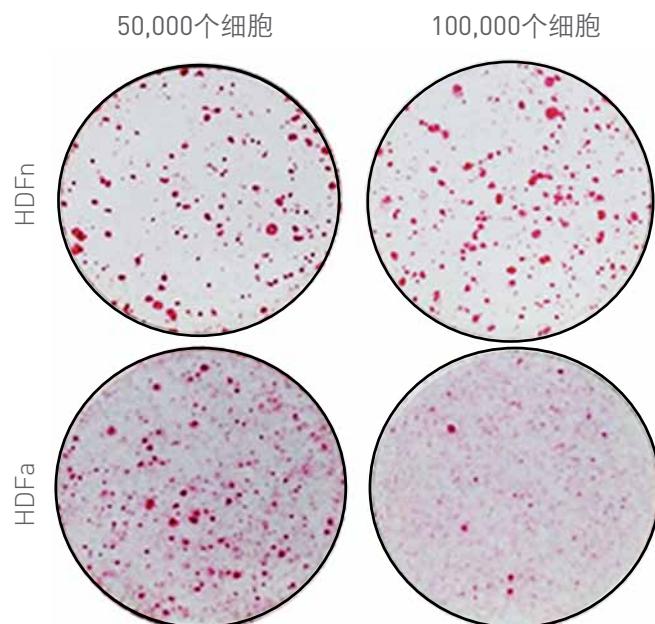


图8. 新生儿(HDFn)和成体(HDFa)人皮肤成纤维细胞重编程后获取的碱性磷酸酶阳性集落。

## 赛默飞世尔科技

### 上海

上海市浦东新区新金桥路27号3,6,7号楼  
邮编 201206  
电话 021-68654588\*2570

#### 生命科学产品和服务业务

上海市长宁区仙霞路99号21-22楼  
邮编 200051  
电话 021- 61453628 / 021-61453637

### 北京

北京市东城区北三环东路36号环球贸易中心C座7层/8层  
邮编 100000  
电话 010-87946888

### 广州

广州国际生物岛寰宇三路36、38号合景星辉广场北塔204-206 单元  
邮编 510000  
电话 020-82401600

### 沈阳

沈阳市沈河区惠工街10号卓越大厦3109 室  
邮编 110013  
电话 024-31096388\*3901

### 西安

西安市高新区科技路38号林凯国际大厦  
1006-08单元  
邮编 710075  
电话 029-84500588\*3801

### 南京

成都市临江西路1号锦江国际大厦1406 室  
邮编 610041  
电话 028-65545388\*5300

### 武汉

武汉市东湖高新技术开发区高新大道生物医药园C8栋5楼  
邮编 430075  
电话 027-59744988\*5401

### 昆明

云南省昆明市五华区三市街6号柏联广场写字楼  
908单元  
邮编 650021  
电话 0871-63118338\*7001

欲了解更多信息，请扫描二维码关注我们的微信公众账号



免费服务电话: 800 820 8982/400 820 8982  
信息咨询邮箱: cnbidmarketing@thermofisher.com

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

仅供研究使用。不可用于临床诊断。© 2020 Thermo Fisher Scientific Inc. 版权所有。除非另有说明，所有商标均为 Thermo Fisher Scientific 及其子公司所有。Tween 是 Croda International Plc 的商标。