

gibco

///全新的STEMFLEX培养基\\
精心设计，处处改进



在当今的干细胞应用中获得
更高的灵活性和出众的性能

Thermo Fisher
SCIENTIFIC

当今干细胞面临的挑战

用于多能性干细胞(PSC)培养的传统培养基配方是在十多年前研制的，当时研究人员提出的最重要的问题是如何可重复地获取并维持这些细胞。在过去十年中，PSC的使用呈指数型增长，已拓展到包括单细胞传代和基因编辑在内的更复杂的应用领域。事实上，这些最初的培养基已经很难跟上技术发展的步伐。在此期间，研究人员一直不懈地努

力，将技术的进步应用于培养基研制，并期待培养基能够支持期望的应用。到目前为止，针对传统的PSC培养基的实验方案推荐已有多种，但这在新一代PSC应用(如基因组编辑)中存在较大的性能差距。此外，这些实验方案调整又带来了新的问题——不同研究人员获得不一致的性能——很难在实验室内部以及实验室之间获得可重复的结果。

在现代应用领域中的出众性能

在过去十年中，干细胞研究界已从传统的方法转向更具创新性的技术和应用领域，包括基因组编辑和单细胞分析。上述新应用已经在相关的生理学疾病模型方面取得了巨大的进步，会引起干细胞前所未有的应激水平，常常会影响细胞存活。Gibco™ StemFlex™培养基采用了独特的配方，通过上述应激转换支持细胞生长，相比传统培养基，可提供稳定的结果和出众的性能(图1-3)。

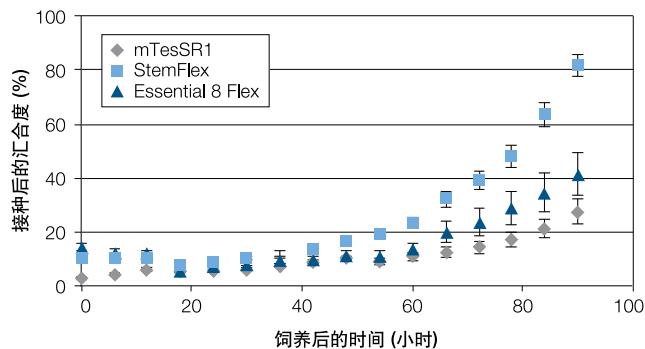


图1. StemFlex培养基可将基因编辑后的细胞复苏速度提高2倍。使用Gibco™ TrypLE™ Select酶将不同培养基配方中扩增的PSC制备成单细胞，通过电穿孔导入Cas9蛋白/HPRT向导RNA(gRNA)复合体。在Rho相关蛋白激酶(ROCK)抑制剂不存在的条件下，每孔接种100,000个活细胞，结果显示，在上述应激性事件后，StemFlex培养基可实现最佳的细胞复苏。

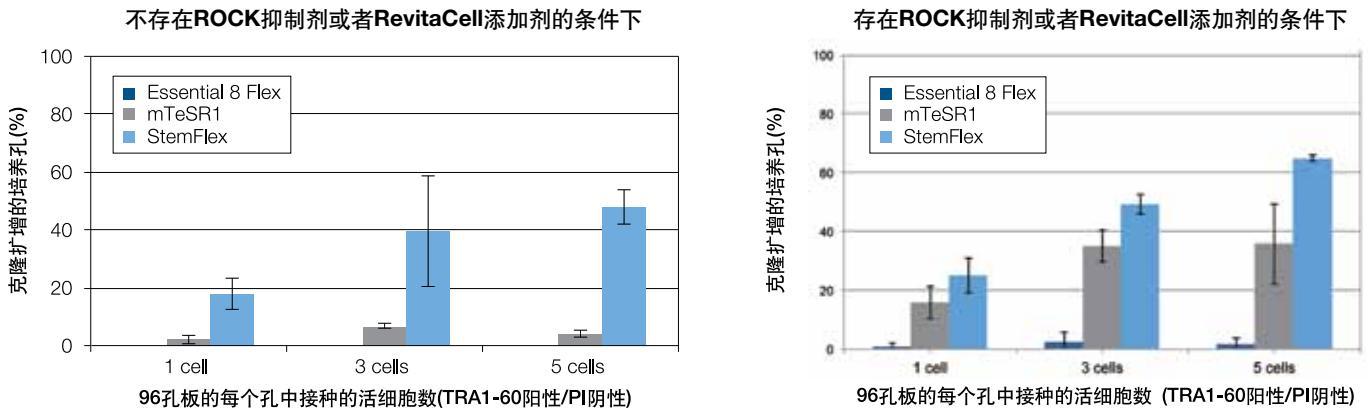


图2. StemFlex培养基可支持流式分选后的PSC复苏，在ROCK抑制剂不存在的情况下，单细胞传代后的克隆扩增率提高达5倍。使用TrypLE Select酶将StemFlex培养基中(基质为rhLaminin-521)扩增大于3代的PSC制备成单细胞，然后进行流式分选，分选出活的多能性干细胞(TRA1-60阳性，碘化丙啶(PI)阴性)，在96孔板的每个孔中接种1、3或5个细胞。接种后，每3天使用新鲜培养基饲养细胞，第14天，在IncuCyte ZOOM™系统(Essen Bioscience)上进行全孔成像，评估汇合度>5%的培养孔的百分比。

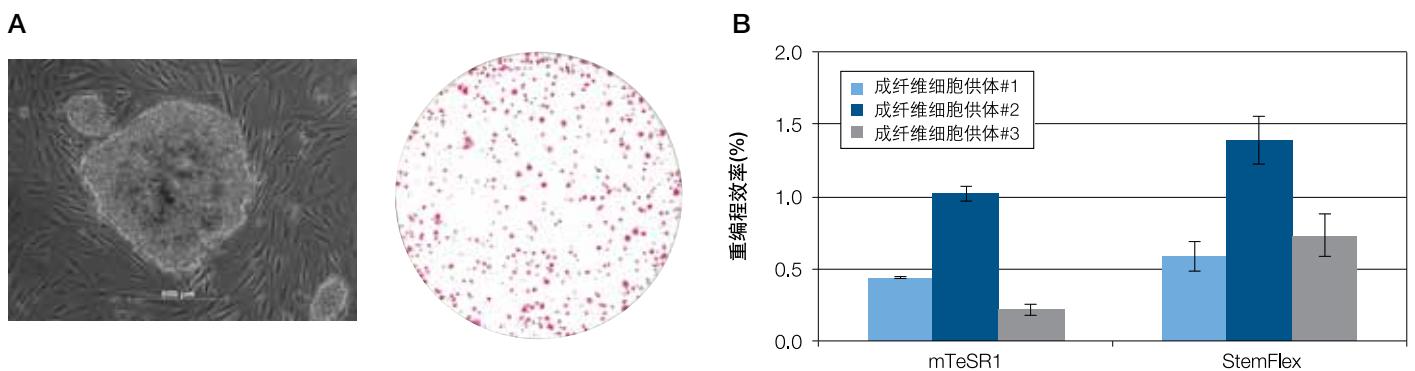


图3. StemFlex培养基可提供改进的工作流程和可靠的集落形成性能，在体细胞重编程后用于克隆筛选。使用Invitrogen™ Cytotune-iPS 2.0仙台病毒重编程试剂盒重编程人真皮成纤维细胞。遵照标准工作流程，在加入干细胞培养基后的第8天，使用mTeSR™1培养基(STEMCELL Technologies) (每天更换一次培养基)或StemFlex培养基(每两天更换一次培养基)饲养细胞。**(A)** 使用StemFlex培养基可以观察到可靠的集落形成。**(B)** 在全部三个供体中，与每天使用mTeSR1培养基的培养方案相比，每两天使用一次StemFlex培养基的培养方案具有更高的重编程效率。

利用改进的工作流程获得出众的结果

采用传统方法进行PSC培养时，需要每天饲养，以维持多能性。频繁的细胞操作给研究人员带来了额外的挑战，包括更高的错误和污染风险、更高的批次间差异。针对上述应用，研究人员提出了一些实验方案建议，解决了传统培养系统面临的一些挑战。但是，这些建议会对下游应用的多能性产生

影响，因而不适用于长期持续使用。StemFlex培养基(及Gibco™ Essential 8™ Flex培养基)通过稳定地维持FGF-2活性(图6)—促进多能性的一种关键因子，真正实现了周末免饲养(图4和5)。此外，StemFlex培养基还使您可以根据实验需要，从不同的基质和传代试剂中灵活选择(表1)。

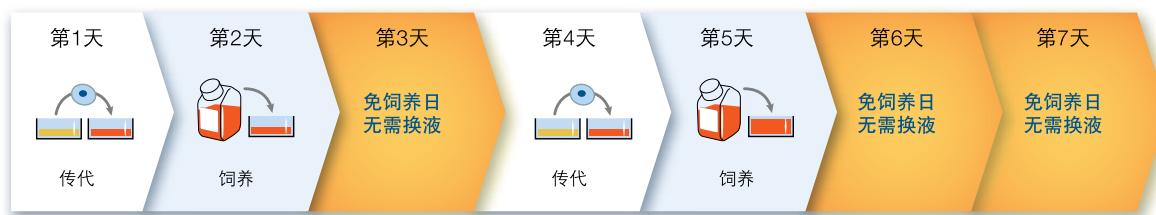


图4. 推荐的周末免饲养方案。与传统的PSC培养基不同，StemFlex培养基无需每天培养换液，真正实现了周末免饲养的PSC扩增和维持。更多的饲养方案选择，可访问thermofisher.com/stemflex

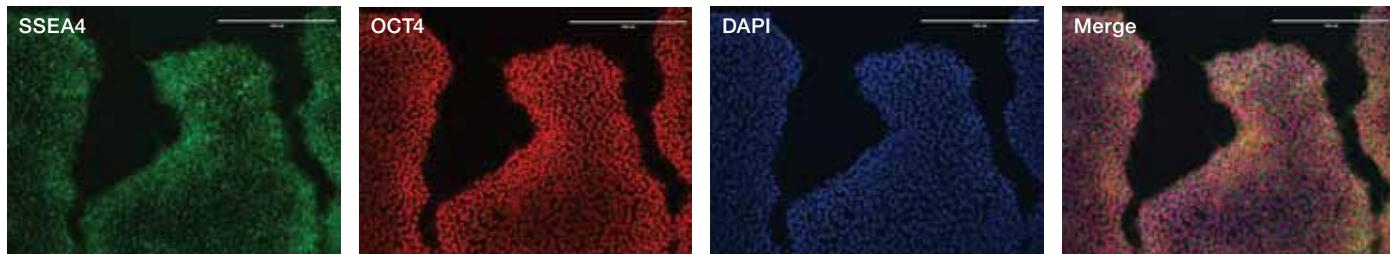


图5. 采用周末免饲养方案时，细胞多能性的长期维持。使用StemFlex培养基，在包被有Gibco™ Geltrex™基质(货号：A14133)的培养孔中传代21代的PSC仍可维持自我更新因子的表达。使用Invitrogen™ PSC四标志物免疫化学试剂盒(货号：A24881)进行细胞多能性标志物染色。

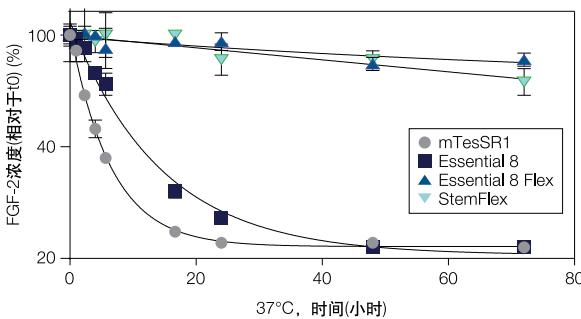


图6. StemFlex培养基可以更稳定地维持多能性。在37°C、5% CO₂孵育条件下，StemFlex培养基提供了更长时间的FGF-2稳定性，可实现灵活的饲养方案，包括周末免饲养方案选择，无需每天饲养。

表1. 灵活选择最佳的基质和传代试剂。

组分	产品	最佳应用
基质	Gibco Geltrex不含LDEV的低生长因子基底膜基质	替代Matrigel基质; PSC扩增和维护的最经济选择
	截短型重组人玻连蛋白(VTN-N)	需要更精简(无外源成份)、成份确定的基质的应用
	重组人层粘连蛋白-521 (rhLaminin-521)	推荐用于应激性应用, 可获得最高的性能, 包括基因编辑和单细胞传代
传代试剂	Versene™溶液	细胞团块传代
	Gibco StemPro Accutase试剂	2–3块细胞聚集物
	TrypLE Select酶含有或不含RevitaCell添加剂	单细胞传代

可提供出众的人多能干细胞无需滋养层培养的可靠系统

StemFlex培养基是我们最新的培养基，可为当今干细胞研究中创新性且具有挑战性的应用提供出众的性能，如细胞重编程、单细胞传代和基因编辑。除了可以提升核心性能外，它还提供了方便且灵活的饲养方案(包括周末免饲养方案)，使研究人员能够根据特定的应用选择最适合的基质和传代试剂。StemFlex培养基以方便的，两个组分的试剂盒形式提供(含450 mL培养基和50 mL添加剂)，当同Geltrex基质搭配使用时，为人PSC无滋养层培养提供了一种经济、可靠的体系。

如图7和8所示，采用周末免饲养方案，StemFlex培养基可实现PSC的长期、无需滋养层培养，长达21代，无任何核型异常征象，且保持了细胞分化为三种胚层的能力。

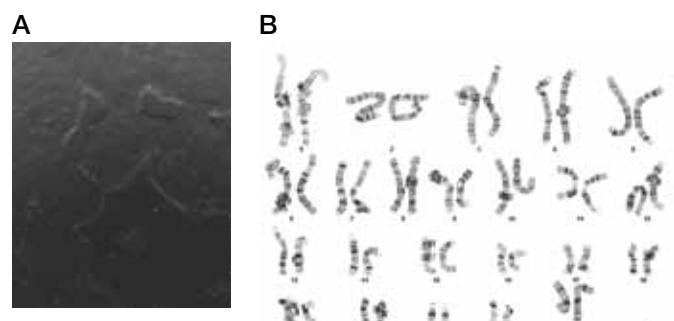


图7. **StemFlex**培养基可长期维持正常的PSC特性。**(A)** 采用灵活的周末免饲养方案传代20代后，PSC培养物显示了正常的形态和**(B)**核型。

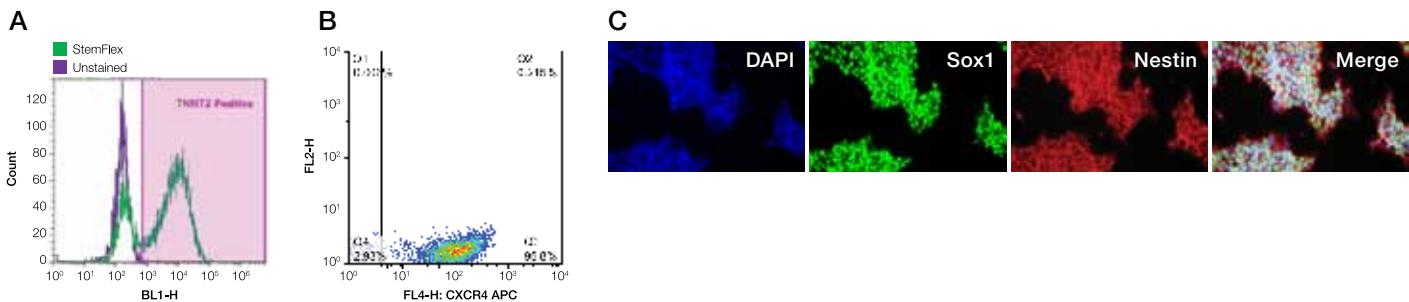


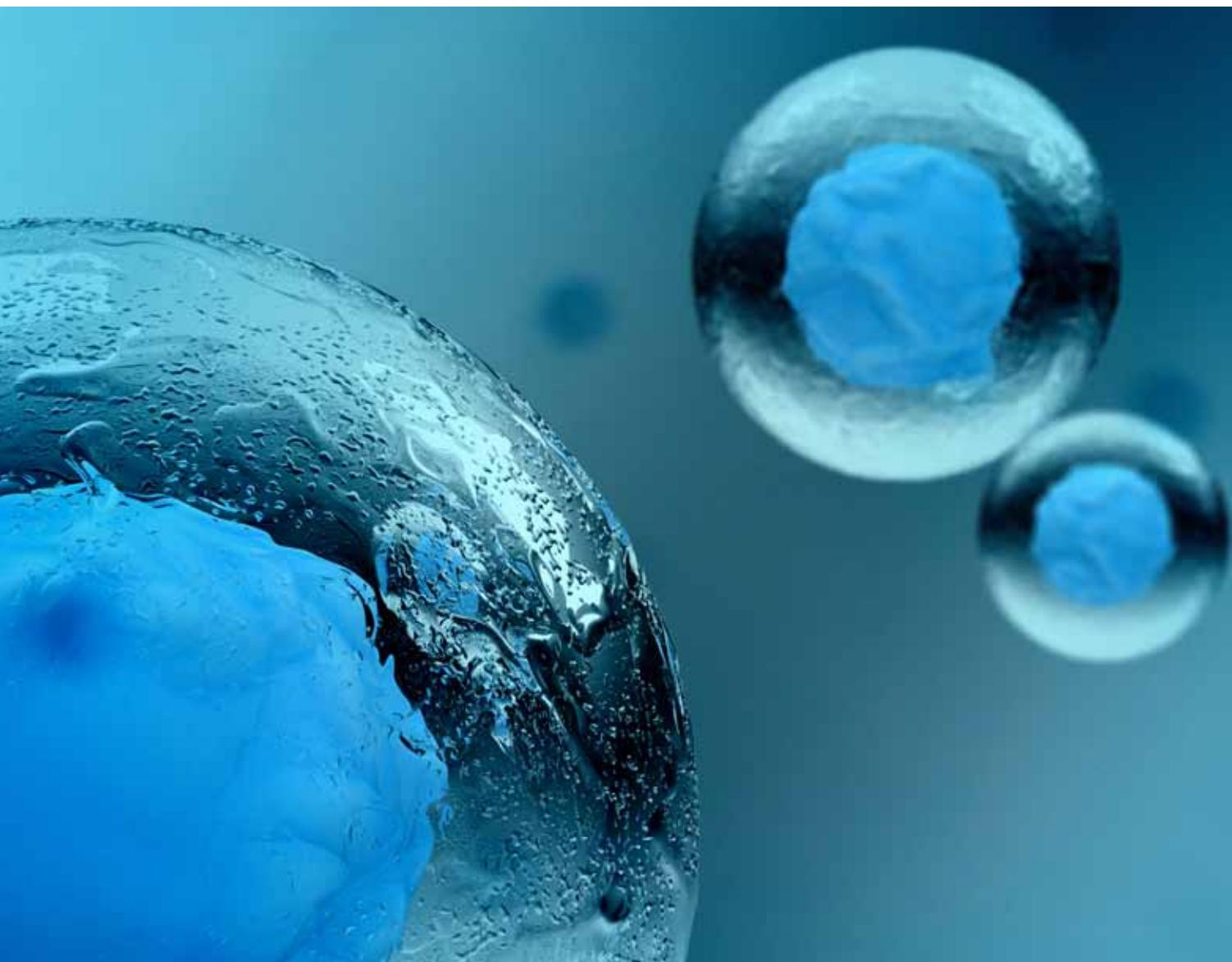
图8. 三系分化潜能的确认。采用灵活的周末免饲养方案传代至少22次后，在StemFlex培养基中扩增的PSC维持了三系分化能力：**(A)** 中胚层，表现为使用Gibco™ PSC心肌细胞分化试剂盒(货号：A2921201)分化后表达TNNT2；**(B)** 内胚层，表现为使用Gibco™ PSC定型内胚层诱导试剂盒(货号：A3062601)分化后表达CXCR4阳性、PDGFRalpha阴性；**(C)** 外胚层，表现为使用Gibco™ PSC神经诱导培养基(货号：A1647801)分化后表达Sox1和巢蛋白。

常见问题 (FAQs)

问题	建议
配制的 StemFlex 培养基是否可以分装并冷冻供以后使用？	配制后，可以分装完全培养基并置于-5°C至-20°C保存达6个月。或者可以分装单次用量的添加剂，置于-5°C至-20°C冷冻保存。避免反复冻融。
StemFlex 培养基相比 mTeSR1 和 TeSR-E8 培养基如何？	StemFlex 培养基较 TeSR-E8 培养基更稳定，所包含的成份少于 mTeSR1 培养基。在诸多应用中(包括单细胞传代、基因编辑和重编程)， StemFlex 培养基的性能优于 mTeSR1 培养基(图3-5)。
将细胞从另一种 PSC 培养基(如 mTeSR1 培养基)切换至 StemFlex 培养基有多难？	将细胞从另一种 PSC 培养基切换至 StemFlex 培养基十分简单直接。为获得最佳结果，我们推荐通过两代切换至 StemFlex 培养基。如果细胞在使用Matrigel作为基质的 mTeSR1 培养基中冷冻保存，则建议将细胞重新解冻至 mTeSR1/Matrigel 培养基，直至完全复苏，然后使用Versene溶液传代或细胞团块传代，切换至 StemFlex 培养基中。
如果我对周末免饲养方案不感兴趣，是否仍然可以每天饲养细胞？	StemFlex 培养基支持大多数饲养方案，包括每天饲养和周末免饲养。如需了解推荐饲养方案列表，请访问 thermofisher.com/stemflex
对于基因编辑和/或流式分选实验，是否可以使用抗生素防止污染？	是的，可以在 StemFlex 培养基系统中使用抗生素以支持基因编辑和流式分选。推荐使用Gibco™ 抗生素-抗真菌溶液(100X) (货号：15240096)。
在克隆扩增过程中获得最佳复苏效果的推荐实验方案是什么，例如，96孔板的每个孔中接种1-5个细胞？	推荐在rhLaminin-521上传代细胞后，至少传代2代后再进行细胞分选，以确保在单细胞传代后获得最佳的细胞存活率。然后将细胞分选至rhLaminin-521基质上，克隆复苏的推荐饲养方案是每三天换液一次直至第14天。 注：该饲养方案仅推荐用于低密度接种(即96孔板的每个孔中接种1-5个细胞)。
StemFlex 培养基是否为无外源性成份且/或成份确定？	StemFlex 培养基配方包括牛血清白蛋白(BSA)，因此不能视为无外源性成份。其相比 mTeSR1 培养基成份更确定，因为配方中含有的成份更少。Gibco Essential 8和Essential 8 Flex培养基为推荐的成份最确定且无外源性成份的PSC培养基。

订购信息

产品	货号
StemFlex培养基	A33494-01
Geltrex不含LDEV的低生长因子基底膜基质	A14133
截短型重组人玻连蛋白(VTN-N)	A14700和A31840
重组人层粘连蛋白-521 (rhLaminin-521)	A29248和A29249
Versene溶液	15040
StemPro Accutase细胞消化液	A11105
TrypLE Select酶	12563
RevitaCell添加剂	A2644501
PSC冻存试剂盒	A2644601



gibco

如需了解更多信息，请登录 thermofisher.com/stemflex

免费服务电话：800 820 8982 / 400 820 8982

销售服务信箱：sales.china@thermofisher.com

技术咨询信箱：lifescience-cnts@thermofisher.com

上海办事处电话：021-61452000

北京办事处电话：010-84461800

广州办事处电话：020-38975100

成都办事处电话：028-65545388

thermofisher.com

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. © 2017 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

ThermoFisher
SCIENTIFIC