

Day 0:

1. 将 PBMC 培养基从 4° C 冰箱中取出，室温平衡 20 分钟以上。
2. 取出 PBMC 培养容器，轻轻吹打，将 PBMC 全部转移至离心管，取培养基冲洗容器，将剩余细胞全部转移至离心管中，离心。
3. 在生物安全柜内吸除上清，取 PBMC 培养基轻柔吹打细胞沉淀后，进行细胞计数。
4. 取适量细胞加入 96 孔板的一个孔中，取 Reprogramming Vectors 用培养基重悬后加入同一孔中，稍吹打混匀。标记好细胞名称、日期以及操作人员。
5. 将 96 孔板用封口膜封口，放入离心机，离心后感染。
6. 离心后撕掉封口膜，将 96 孔板放入 CO₂ 培养箱中培养 48 小时。

Day 2:

1. 将 96 孔板从 CO₂ 培养箱中取出，在显微镜下观察细胞，细胞无真菌或细菌污染，状态良好。
2. 将 96 孔板放于生物安全柜中，轻轻吹打，将孔中液体全部转移至离心管，取培养基冲洗孔板，将孔中剩余细胞也全部转移至离心管中，离心。
3. 在生物安全柜内吸除上清，取培养基轻柔吹打细胞沉淀后，将其加入十二孔板的一个孔中，前后左右晃动混匀，将其放入 CO₂ 培养箱中培养 48 小时。

Day 4:

1. 取基质胶处理过的细胞培养容器，在生物安全柜中加入干细胞培养基，使干细胞培养基均匀覆盖培养容器表面。
2. 将十二孔板放于生物安全柜中，轻轻吹打，将孔中液体全部转移至离心管，取 PBMC 培养基冲洗孔板，将孔中剩余细胞也全部转移至离心管中，离心。
3. 在生物安全柜内吸除上清，取干细胞培养基轻柔吹打细胞沉淀后，将其平均加入细胞培养容器中，前后左右晃动混匀，将其放入 CO₂ 培养箱中继续培养 48 小时。

Day 7- Day 25

1. Day 7- Day 25 每 48 小时换液一次。

Day 26-Day 35:

1. Day 26-Day 35 可将已形成的单克隆挑选接种至基质胶预处理后的 24 孔板或 48 孔板。
2. 克隆挑选后，每 24 小时换液一次。
3. 克隆密度长至 80%左右，可进行正常消化传代。