

两种传代方法影响人胚胎干细胞转染效率的比较

孙莉^{1,2}, 纵艳艳¹, 魏建峰^{1,3} (¹江苏省脑病生物信息重点实验室, 江苏省徐州市 221004; 徐州医科大学, ²护理学院, ³基础医学院组织胚胎学教研室, 江苏省徐州市 221004)

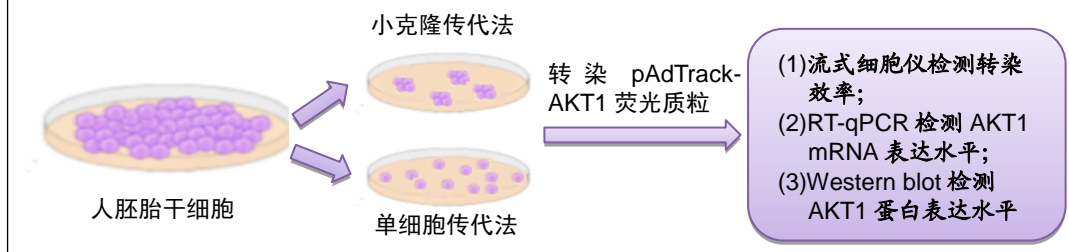
DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1870

ORCID: 0000-0002-1800-8057(孙莉)

文章快速阅读:

文章特点—

(1)人胚胎干细胞呈克隆样密集生长, 本身外排能力较强, 目前常用的转染方法效率均较低;
(2)通过单细胞传代法, 可以降低人胚胎干细胞的汇合度和细胞间的紧密程度, 由此可见, 在脂质体转染前优化细胞状态可明显提高人胚胎干细胞的转染效率。



孙莉, 女, 1990 年生, 江苏省靖江市人, 汉族, 在读硕士, 主要从事细胞生物学和分子生物学方面的研究。

通讯作者: 魏建峰, 博士, 副教授, 江苏省脑病生物信息重点实验室, 江苏省徐州市 221004; 徐州医科大学基础医学院组织胚胎学教研室, 江苏省徐州市 221004

文献标识码:A

来稿日期: 2019-03-19

送审日期: 2019-03-27

采用日期: 2019-05-31

在线日期: 2019-09-26



文题释义:

胚胎干细胞: 是一类起源于胚胎发育早期囊胚内细胞群中未分化的细胞, 具有自我更新、无限增殖和多向分化的潜能。

转染: 是真核细胞主动或被动导入外源 DNA 片段而获得新的表型的过程。

摘要

背景: 现有方法将外源分子如 DNA 导入到人胚胎干细胞用于科学研究的效率普遍较低, 如何优化现有条件, 提高转染效率显得尤为重要。

目的: 比较两种不同的传代方法对人胚胎干细胞系 H9 转染效率的影响, 优化胚胎干细胞转染条件。

方法: 人胚胎干细胞系 H9 分别采用小克隆传代法和单细胞传代法进行传代, 传代后继续培养细胞 48 h, 用 Lipofectamine 3000 转染 pAdTrack-AKT1 荧光质粒 2 d 后, 荧光显微镜下观察荧光质粒的表达, 流式细胞仪检测人胚胎干细胞的转染效率; RT-qPCR 和 Western blot 分别检测转染后 AKT1 在 mRNA 和蛋白质水平的表达。

结果与结论: ①荧光显微镜下观察发现单细胞传代组表达荧光质粒的细胞数量更多, 流式细胞仪检测单细胞传代法的转染效率[(47.18±2.00)%]高于小克隆传代法的转染效率[(19.52±0.86)%], 差异有显著性意义 ($P < 0.01$); ②单细胞传代组转染后 AKT1 mRNA 和蛋白的表达均高于小克隆传代组, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$); ③结果表明, 采用单细胞传代法, 增加细胞与转染试剂脂质体的接触面积可提高人胚胎干细胞的转染效率。

关键词:

人胚胎干细胞; 小克隆传代法; 单细胞传代法; 脂质体转染; 转染效率

中图分类号: R459.9; R394.2; R318

基金资助:

江苏省高校自然科学基金(14KJB310021), 项目负责人: 魏建峰; 江苏省脑病生物信息重点实验室开放课题(JSBI1403), 项目负责人: 魏建峰

Comparison of two passage methods affecting the transfection efficiency of human embryonic stem cells

Sun Li^{1,2}, Zong Yanyan¹, Wei Jianfeng^{1,3} (¹Jiangsu Key Laboratory of Brain Disease Bioinformation, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China; ²School of Nursing, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China; ³Department of Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China)

Abstract

BACKGROUND: In the research of human embryonic stem cells, introducing exogenous molecules such as DNA into cells is a common research method, but the transfection efficiency is relatively low. It is crucial to answer the question of how to optimize the existing conditions to improve the transfection efficiency.

OBJECTIVE: To compare the effects of two different passaging methods on H9 transfection efficiency, in order to

Sun Li, Master candidate, Jiangsu Key Laboratory of Brain Disease Bioinformation, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China; School of Nursing, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Wei Jianfeng, MD, Associate professor, Jiangsu Key Laboratory of Brain Disease Bioinformation, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China; Department of Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China

optimize the conditions required for embryonic stem cell transfection.

METHODS: Human embryonic stem cell lines H9 were cultured for 48 hours after small clone passaging or single-cell passaging. Lipofectamine 3000 was used to transfect pAdTrack-AKT1 fluorescent plasmid into human embryonic stem cells. After 2 days of transfection, the expression of fluorescent plasmids was observed by fluorescence microscope and the transfection efficiency was detected by flow cytometry. RT-qPCR and western blot were used to detect the mRNA and protein expression levels of AKT1 respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: Under the fluorescence microscopy, the number of cells expressing fluorescent plasmids in the single-cell passaging group was more than that in the small clone passaging group, and the flow cytometry analysis showed that the transfection efficiency of cells in the single-cell passaging group was $(47.18 \pm 2.00)\%$, which was significantly higher than $(19.52 \pm 0.86)\%$ in the small clone passaging group ($P < 0.01$). RT-qPCR and western blot analysis showed that the expression levels of AKT1 mRNA and protein in the single-cell passaging group were significantly higher than those in the small clone passaging group ($P < 0.01$). These findings indicate that single-cell passaging can increase the contact area between cells and transfection reagent liposomes, and improve the transfection efficiency of human embryonic stem cells.

Key words: human embryonic stem cells; small clone passaging; single-cell passaging; liposome transfection; transfection efficiency

Funding: the Natural Science Foundation of Colleges in Jiangsu Province, No. 14KJB310021 (to WJF); the Foundation of Jiangsu Province Key Laboratory of Encephalopathy Bioinformatics, No. JSB11403 (to WJF)

0 引言 Introduction

胚胎干细胞是一类起源于胚胎发育早期囊胚内细胞群中未分化的细胞,具有自我更新、无限增殖和多向分化的潜能^[1],故其在医学上具有非常重要的研究价值与应用前景^[2-5]。基因转染是研究胚胎干细胞生理功能和分化发育机制的重要技术手段^[6],但其转染效率受诸多因素的影响,如细胞状态、质粒DNA的大小、转染方法及其操作细节等^[7]。目前常用的转染方法有慢病毒转染、核电转、脂质体转染等^[8],其中脂质体转染无免疫和突变风险^[9],是稳定转染人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)的理想试剂。该研究基于脂质体转染法发现人胚胎干细胞使用单细胞传代法传代的细胞转染效率明显优于小克隆传代法。该法简单稳定有效,将为人胚胎干细胞的转染提供有力的技术支撑,为人胚胎干细胞的临床应用研究增添新的方法和策略。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学实验观察。

1.2 时间及地点 实验于2018年7月至2019年4月在徐州医科大学脑病生物信息重点实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验材料 人胚胎干细胞系H9、pAdTrack-AKT1荧光质粒由作者所在实验室保存。

1.3.2 实验试剂 mTeSR1培养基、消化酶Accutase、Y-27632(STEMCELL公司);基质胶Matrigel(Corning BioCoat公司);转染试剂Lipofectamine 3000、Opti-MEM 1减血清培养基、免疫荧光二抗(Invitrogen公司);反转录试剂及定量PCR试剂(Takara公司);SOX2、OCT4、AKT1抗体(Cell Signaling Technology公司);定量PCR引物(上海生工合成)。

1.3.3 实验仪器 荧光显微镜(Olympus,日本);流式细胞仪(BD,美国);激光共聚焦荧光显微镜(Zeiss,德国);PCR扩增仪2720 Thermal Cycler(Applied Biosystems,美国);稳压/稳流DNA电泳仪(Bio-Rad,美国);细胞培养箱(Thermo,美国);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司,

中国)等。

1.4 实验方法

1.4.1 人胚胎干细胞的复苏、培养及鉴定 采用无饲养层培养条件,细胞培养皿表面均经Matrigel包被过夜。取出冻存于液氮中的人胚胎干细胞系H9,在37℃水浴中快速震荡溶解至有少许冰残留;吸取冻存液,逐滴加入人胚胎干细胞培养基mTeSR1,轻摇混匀,1 000 r/min离心5 min后弃上清,用mTeSR1重悬混匀,接种于包被好Matrigel的细胞培养皿表面,每天换液。细胞使用Accutase初步消化后,用枪头机械刮取细胞碎片,以1:4的比例传代,约7 d传代1次。

1.4.2 人胚胎干细胞的传代 吸弃培养基,加入复温的Accutase消化酶,显微镜下观察克隆边缘的细胞皱缩,克隆内部有裂痕,吸弃Accutase,进行下一步处理:①小克隆传代法:立即终止消化,加入mTeSR1,用枪头轻轻吹打使细胞形成细小碎片,接种至6孔板;②单细胞传代法:将培养皿放入37℃恒温箱,等待约1 min后取出,细胞呈单个状态,加入含10 μmol/L Y-27632的mTeSR1轻轻吹打混匀,接种至6孔板,放置于37℃,体积分数为5%CO₂培养箱培养。

人胚胎干细胞的培养及鉴定

细胞来源: Wicell 公司

基础培养基: 人胚胎干细胞培养基 mTeSR1(货号: 85850)

培养时间: 培养约 7 d 时, 细胞汇合度可达 80%-90%

细胞传代: 约 7 d 传代 1 次

细胞鉴定: ①人胚胎干细胞呈克隆样生长,细胞核大质少;②免疫荧光显示其高表达于性基因 OCT4 和 SOX2

1.4.3 人胚胎干细胞的转染及转染效率检测 当细胞汇合度达到30%-60%(传代48 h后)时进行转染。取2个无菌1.5 mL Eppendorf管,分别加入125 μL Opti-MEM 1减血清培养基,其中一管加入适量Lipofectamine 3000轻柔混匀;另一管加入pAdTrack-AKT1荧光质粒(10 660 bp),涡旋混匀后逐滴加入含Lipofectamine 3000的混合液中,室温孵育10-15 min,形成脂质体复合物。将脂质体复合物逐滴加

入培养基, 轻轻摇动细胞培养板, 使复合物分散均匀。在 37 °C, 体积分数为5%CO₂培养箱内培养48 h, 流式细胞仪检测转染效率。

1.4.4 细胞免疫荧光检测SOX2、OCT4的表达 人胚胎干细胞用37 °C的PBS洗5遍, 40 g/L多聚甲醛4 °C固定20 min, 吸弃多聚甲醛, 常温PBS洗后封闭。一抗稀释于含3% BSA和0.3% Triton-100的PBS(SOX2 1 : 400稀释, OCT4 1 : 800稀释), 4 °C避光过夜, 次日室温30 min复温, 常温PBS清洗后孵育二抗(1 : 500稀释), 避光2 h, DAPI染核5 min, 常温PBS清洗后荧光显微镜观察。

1.4.5 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测AKT1的mRNA表达 Trizol法收集转染后人胚胎干细胞, 按照试剂盒说明书进行实验, 提取总RNA样本、反转录并进行RT-qPCR实验, 检测AKT1的mRNA水平。RT-qPCR程序为预变性95 °C 30 s; 变性95 °C 5 s, 退火60 °C 30 s(40次循环); 每个样本均设置3个重复。引物见表1。

表1 RT-qPCR 所用基因的上下游引物序列
Table 1 Upstream and downstream primer sequences for RT-qPCR

| 基因名称 | 引物序列 | 产物大小(bp) |
|-------|--|----------|
| AKT1 | 上游: 5'- AGC GAC GTG GCT ATT GTG AAG-3' | 48 |
| | 下游: 5'-GTA CTC CCC TCG TTT GTG CAG-3' | |
| GAPDH | 上游: 5'-GGT CAC CAG GGC TGC TTT TA-3' | 141 |
| | 下游: 5'-GGA TCT CGC TCC TGG AAG ATG-3' | |

1.4.6 蛋白质印迹实验(Western blot)检测AKT1的蛋白表达 转染后人胚胎干细胞加入匀浆液, 细胞总蛋白质(20 μg)于10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 100 V电压转膜70 min, 室温下3% BSA封闭3 h, 鼠抗人AKT1抗体(1 : 2 000稀释)4 °C孵育过夜后, 鼠二抗(1 : 10 000稀释)室温孵育1 h。内参蛋白抗体选用兔抗人GAPDH(1 : 2 000稀释)。Quantity One图像分析软件对蛋白条带进行扫描分析, 以GAPDH为参照, AKT1表达的相对含量以目的条带与内参条带灰度值的比值表示。

1.5 主要观察指标 ①荧光显微镜观察人胚胎干细胞转染AKT1质粒后的荧光表达; ②流式细胞仪检测细胞转染效率; ③RT-qPCR检测AKT1的mRNA表达; ④Western blot检测AKT1的蛋白表达。

1.6 统计学分析 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间均数比较采用独立样本t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。统计分析用SPSS 16.0软件, 图表制作用GraphPad Prism 7.0软件。

2 结果 Results

2.1 人胚胎干细胞正常形态及未分化状态鉴定结果 在Matrigal胶上贴壁培养的人胚胎干细胞呈克隆样生长, 细胞

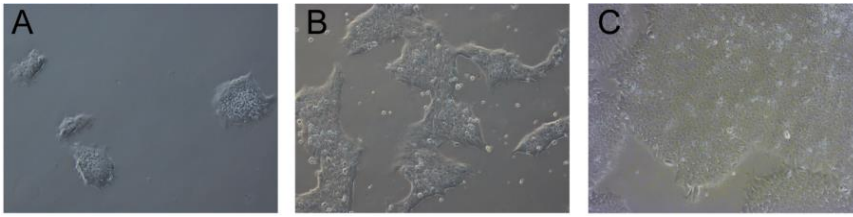
排列紧密, 核质比高, 细胞集落边缘光滑, 生长状态良好, 无边缘细胞向外明显延展和核质比降低等分化表现, 随着培养天数增加细胞集落逐渐融合, 培养7 d时细胞汇合度可达80%~90%, 见图1。通过细胞免疫荧光检测, 人胚胎干细胞均表达其特异性标志物SOX2和OCT4, 见图2。

2.2 人胚胎干细胞转染AKT1质粒后的荧光表达 不同方式传代的人胚胎干细胞在传代后继续培养48 h, 光学显微镜下观察细胞状态, 可见小克隆传代的细胞之间致密紧凑; 单细胞传代的细胞结构清晰, 仍趋向克隆样生长, 细胞与细胞之间连接较松散, 见图3A, D。转染48 h后, 使用荧光显微镜观察不同传代方式的细胞转染效率, 发现在去除ROCK抑制剂Y-27632(可以阻止人胚胎干细胞因分离导致的细胞凋亡, 提高单个人胚胎干细胞的存活率)后, 单细胞传代的人胚胎干细胞仍呈克隆样紧密生长, 见图3E。单细胞传代后转染pAdTrack-AKT1荧光质粒48 h的荧光细胞数目明显多于小克隆传代法, 见图3C, F。流式细胞仪检测单细胞传代的人胚胎干细胞转染效率为(47.18±2.00)%, 小克隆传代的人胚胎干细胞转染效率为(19.52±0.86)%, 单细胞传代法的转染效率高于小克隆传代法($P < 0.01$, $n=5$), 见图4。镜下观察时也未见明显分化的细胞, 表明单细胞传代的细胞用脂质体转染是安全稳定且高效的。

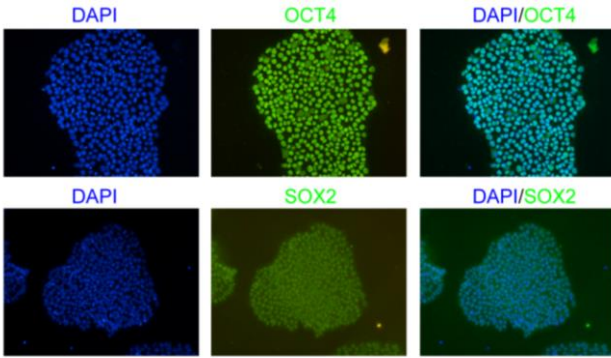
2.3 人胚胎干细胞转染AKT1质粒后其mRNA和蛋白质水平的表达 单细胞传代组AKT1在mRNA和蛋白质的表达水平均显著高于小克隆传代组($P < 0.01$, $n=3$), 见图5。

3 讨论 Discussion

人胚胎干细胞是非常难转染的细胞之一, 目前常用的转染方法的效率均较低^[10-11]。综合比较来看慢病毒转染效率最高, 但是病毒转染具有较大的免疫原性、插入诱变和病毒整合进宿主基因的风险^[12-13]。核转染需要将人胚胎干细胞消化成单个细胞, 转染后细胞存活率低^[14], 且需购买专用的细胞转染试剂盒和核转仪, 费用较高。脂质体转染无免疫和突变风险, 转染效果稳定^[15-16], 但以往的研究认为该法转染效率较低。随着技术改进, 脂质体转染人胚胎干细胞的效率正逐步提高, Lipofectamine 2000是一种有效的转染试剂且在许多研究中应用, 而Lipofectamine 3000是其新一代的改进产品, 与Lipofectamine 2000相比其转染效率更高, 细胞毒性更小^[17]。影响脂质体转染效率的因素包括脂质体复合物的形成、与细胞表面的相互作用、DNA的释放和传递到细胞核等。在单层贴壁培养条件下, 人胚胎干细胞克隆边缘的转染效率高, 克隆内部的细胞密集, 与转染试剂的作用面积小, 加之细胞本身的外排作用^[18], 导致大克隆细胞转染效率低。人胚胎干细胞常规培养呈克隆样密集生长, 单个细胞的存活率较低, 而Y-27632可以阻止单个人胚胎干细胞易发生的细胞凋亡, 在不影响人胚胎干细胞自我更新和多潜能特性的前提下提高单个人胚胎干细胞的存活率^[19], 且在转染之前使细胞处于相对良

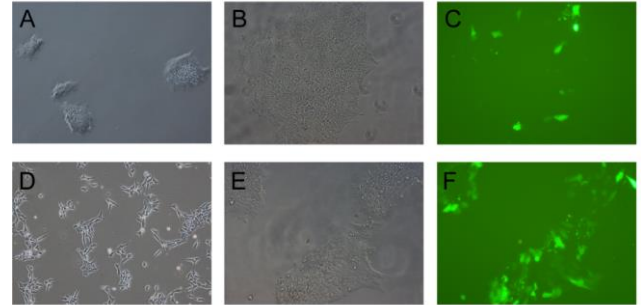


图注：图中 A-C 分别为培养第 1, 3, 7 天时的细胞形态，培养 7 d 时细胞汇合度可达 80%-90%
图 1 无饲养层培养的人胚胎干细胞形态(x100)
Figure 1 Cell morphology of human embryonic stem cells on feeder-free plates (x100)



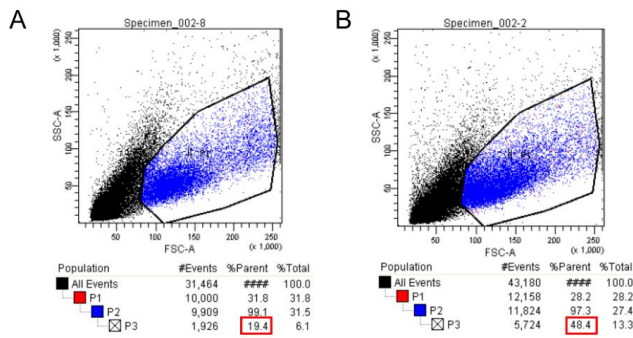
图注：通过细胞免疫荧光检测，结果发现人胚胎干细胞均表达其特异性标志物 SOX2 和 OCT4
图 2 人胚胎干细胞特异性标志物的表达(x100)

Figure 2 Expression of specific molecular markers of human embryonic stem cells (x100)

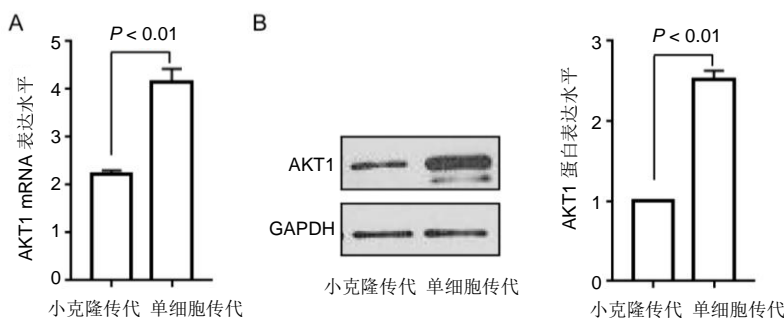


图注：图中 A-C 为小克隆传代，其中 A 为转染前明场下细胞形态，B 为转染 2 d 后明场下细胞形态，C 为 B 图对应的荧光图；D-F 为单细胞传代，其中 D 为转染前明场下细胞形态，E 为转染 2 d 后明场下细胞形态，F 为 E 图对应的荧光图
图 3 两种不同方法传代后的人胚胎干细胞形态及转染 pAdTrack-AKT1 荧光质粒后的绿色荧光蛋白表达(x100)

Figure 3 Human embryonic stem cells with two passage methods and expression of green fluorescent protein after pAdTrack-AKT1 transfection (x100)



图注：图中 A 为小克隆传代流式检测代表图；B 为单细胞传代流式检测代表图；C 为两组人胚胎干细胞转染效率
图 4 流式细胞仪检测人胚胎干细胞转染 pAdTrack-AKT1 荧光质粒的效果
Figure 4 Flow cytometry for detection of pAdTrack-AKT1 transfection efficiency of human embryonic stem cells by two passage methods



图注：图中 A 为 AKT1 的 mRNA 表达；B 为 AKT1 的蛋白表达
图 5 人胚胎干细胞转染 pAdTrack-AKT1 质粒后 AKT1 mRNA 和蛋白表达水平
Figure 5 The mRNA and protein expression of AKT1 in the human embryonic stem cells after transfected with pAdTrack-AKT1 by different passage ways

好的状态，有利于脂质体复合物与细胞的相互作用，故转染效率得以提高。人胚胎干细胞使用酶消化单细胞传代数代，仍可维持细胞多能性、未分化和遗传正常状态^[20-23]。也有研究表明使用单细胞传代5代后可检测到染色体和核型异常^[24]，但作者的研究只在转染时使用单细胞传代，在常规培养中并不使用单细胞连续传代，故细胞基因组的稳定性良好。该研究从安全稳定的脂质体转染法入手，

转染带绿色荧光标记的AKT1质粒来研究现有条件下如何优化人胚胎干细胞的转染效率，通过流式细胞仪检测转染效率结合RT-qPCR和Western blot检测转染AKT1质粒后其mRNA和蛋白表达水平，结果表明单细胞传代降低细胞汇合度和细胞间的紧密程度可明显提高人胚胎干细胞的转染效率；同时也发现细胞密度过小，脂质体毒性作用明显，细胞死亡增多，转染效率亦不高。因此，转染前优化

细胞状态对细胞的转染效率也是至关重要的。

作者贡献: 魏建峰副教授进行实验设计、论文修改, 纵艳艳副教授进行细胞培养指导, 实验实施为孙莉。

经费支持: 该文章接受了“江苏省高校自然科学基金(14KJB310021)”“江苏省脑病生物信息重点实验室开放课题(JSB11403)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 研究用细胞的实验方案符合相关伦理学要求。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过徐州医科大学生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] THOMSON JA, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-1147.
- [2] MORA C, SERZANTI M, CONSIGLIO A, et al. Clinical potentials of human pluripotent stem cells. *Cell Biol Toxicol*. 2017;33(4):351-360.
- [3] SUGAYA K, VAIDYA M. Stem cell therapies for neurodegenerative diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2018; 1056:61-84.
- [4] CUASCUT FX, HUTTON GJ. Stem cell-based therapies for multiple sclerosis: current perspectives. *Biomedicines*. 2019; 7(2):E26.
- [5] PRINGPROA K, SATHANAWONGS A, KHAMPHILAI C, et al. Intravenous transplantation of mouse embryonic stem cells attenuates demyelination in an ICR outbred mouse model of demyelinating diseases. *Neural Regen Res*. 2016;11(10): 1603-1609.
- [6] KIM YS, HWANG KA, GO RE, et al. Gene therapy strategies using engineered stem cells for treating gynecologic and breast cancer patients (Review). *Oncol Rep*. 2015;33(5): 2107-2112.
- [7] LUO C, LÜ D, PAN J, et al. Improving the gene transfection in human embryonic stem cells: balancing with cytotoxicity and pluripotent maintenance. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016; 8(13):8367-8375.
- [8] LAKSHMIPATHY U, PELACHO B, SUDO K, et al. Efficient transfection of embryonic and adult stem cells. *Stem Cells*. 2004;22(4):531-543.
- [9] TARAHOVSKY YS. Cell transfection by DNA-lipid complexes - lipoplexes. *Biochemistry (Mosc)*. 2009;74(12):1293-1304.
- [10] CAO F, XIE X, GOLLAN T, et al. Comparison of gene-transfer efficiency in human embryonic stem cells. *Mol Imaging Biol*. 2010;12(1):15-24.
- [11] FONG H, ELLIOTT KA, LOCK LF, et al. Nucleofection of human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol*. 2011;767: 333-341.
- [12] DAVÉ UP, JENKINS NA, COPELAND NG. Gene therapy insertional mutagenesis insights. *Science*. 2004;303(5656): 333.
- [13] MA Y, RAMEZANI A, LEWIS R, et al. High-level sustained transgene expression in human embryonic stem cells using lentiviral vectors. *Stem Cells*. 2003;21(1):111-117.
- [14] ZWAKA TP, THOMSON JA. Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2003;21(3): 319-321.
- [15] CORREA S, BOEHNKE N, DEISS-YEHIELY E, et al. Solution conditions tune and optimize loading of therapeutic polyelectrolytes into layer-by-layer functionalized Liposomes. *ACS Nano*. 2019;13(5):5623-5634.
- [16] XING Y, WEN CY, LI ST, et al. Non-viral liposome-mediated transfer of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neural Regen Res*. 2016;11(4):617-622.
- [17] RAHIMI P, MOBARAKEH VI, KAMALZARE S, et al. Comparison of transfection efficiency of polymer-based and lipid-based transfection reagents. *Bratisl Lek Listy*. 2018; 119(11):701-705.
- [18] BUNTING KD. ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells*. 2002;20(1): 11-20.
- [19] WATANABE K, UENO M, KAMIYA D, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2007;25(6):681-686.
- [20] HASEGAWA K, FUJIOKA T, NAKAMURA Y, et al. A method for the selection of human embryonic stem cell sublines with high replating efficiency after single-cell dissociation. *Stem Cells*. 2006;24(12):2649-2660.
- [21] GAO X, SPRANDO RL, YOURICK JJ. A rapid and highly efficient method for the isolation, purification, and passaging of human-induced pluripotent stem cells. *Cell Reprogram*. 2018;20(5):282-288.
- [22] SINGH AM. An efficient protocol for single-cell cloning human pluripotent stem cells. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:11.
- [23] TSUKAMOTO M, NISHIMURA T, YODOE K, et al. Generation of footprint-free canine induced pluripotent stem cells using auto-erasable sendai virus vector. *Stem Cells Dev*. 2018; 27(22):1577-1586.
- [24] BAI Q, RAMIREZ JM, BECKER F, et al. Temporal analysis of genome alterations induced by single-cell passaging in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2015;24(5): 653-662.