

专题介绍

小鼠胚胎干细胞的培养——饲养层的制备

完全培养液: 90% 高糖 DMEM (Gibco 12430);
10% FBS (Biochrom S0615)

冻存液: 90% 完全培养液; 10% DMSO (Sigma D2650)

取得小鼠胚胎:

1. 性成熟雌小鼠与种雄鼠按 2:1 比例合笼。
2. 每天早上观察雌小鼠阴道口。有乳白色或蛋黄色冻胶状物(阴道栓)即确定为怀孕。见栓当天上午定为怀孕的 0.5 d。

3. 取怀孕 12.5~15.5 d 的雌鼠, 断颈处死, 无菌条件下暴露子宫。

4. 用眼科镊提起近子宫颈端, 分离子宫系膜, 剪断子宫角。

5. 取出整个子宫, 置于有 PBS (Invitrogen 14190)的平皿内。用 PBS 洗涤 3 次, 弃除表面残余血迹。

6. 沿子宫系膜侧剪开子宫, 取出带有胎膜的胚胎, 置于另一盛有 PBS 的平皿内, 充分洗涤, 弃除表面红细胞。

7. 用眼科镊撕破胎膜, 取出胎鼠, 弃除胎膜。

8. 去掉胚胎头部和内脏, 将躯干部分置于另一盛有 PBS 的平皿内, 用 PBS 洗涤两次, 充分弃除红细胞。

要点: 无菌是操作关键, 动物皮毛不能直接或间接接触到子宫, 分离子宫时必须换用另一套无菌的眼科剪和眼科镊。培养同一株胚胎干细胞最好延用相同品系小鼠来源的成纤维细胞。

取得小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF):

1. 用无菌眼科剪将鼠胚躯干剪成 1 mm³ 以下的碎块, 吸置于离心管内。

2. 加适量 0.25% Trypsin-EDTA (Invitrogen, 25200), 将离心管置于培养箱中温育 20 min。

3. 取出离心管, 反复吹打 20~30 次, 加足量培养液终止消化。

4. 分装到 T75 培养瓶中, 一般每 1 个胚胎可以

制成 1~2 个 T75 培养瓶的原代细胞。

5. 置 37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱培养。

6. 第二天换液, 去掉含有胰蛋白酶(trypsin)和较多死细胞的培养液。

7. 待细胞长 3~7 d, 细胞互相重叠爬满整个培养瓶底时即可 1:3~1:6 传代, 此传代后的细胞记为第一代。

要点: 仔细观察原代细胞有无被杂菌污染的迹象, 并且检测支原体, 确定无污染后传代扩增。

MEF 的传代方法:

1. 吸弃培养液上清液。

2. PBS 冲洗两次。

3. 吸去 PBS, 加 0.25% Trypsin-EDTA 消化。在显微镜下观察, 当少量细胞漂浮, 贴壁的细胞层出现裂隙时, 用移液管吹打冲洗瓶底 5~6 次。

4. 即刻加 MEF 培养液终止消化。

5. 细胞悬液转移到离心管中, 1 000 r/min, 5 min 离心。吸弃上清液。

6. 加足培养液, 吹打制成单细胞悬液, 分装到各 T75 培养瓶中。完成传代。

7. 原代细胞中还有少量组织块未被充分消化, 在以后的每次传代过程中要尽量制成单细胞悬液, 组织块会逐渐消失。

要点: 每次传代尽量把成纤维细胞消化、吹打成单细胞悬液, 随着培养时间增长和传代次数的增加, 细胞增殖速度减慢, 3~5 代的成纤维细胞都可用作培养小鼠胚胎干细胞的饲养层。

丝裂霉素 C (mitomycin C) 处理 MEF:

1. 取新的培养瓶, 加 0.1% Gelatin (Sigma G2500) 溶液覆盖预处理 30 min, 用前吸掉 Gelatin 溶液。

2. 取需要处理的 MEF 细胞, Mitomycin C (Sigma M0503) 以 10 µg/ml 工作浓度加在 MEF 培养液里, 混匀。

3. 置培养箱中作用 3 h。

4. 吸弃废液。

5. 用 PBS 洗 5 遍。
6. 加 0.25% Trypsin-EDTA 消化。在显微镜下观察, 当少量细胞漂浮, 贴壁的细胞层出现裂隙时, 用移液管吹打冲洗瓶底 5~6 次。
7. 即刻加适量 MEF 完全培养液终止消化。
8. 细胞悬液转移到离心管中, 离心 1 000 r/min, 5 min。吸弃上清液。
9. 处理过的 MEF 细胞加适量培养液重悬计数, 以 3.0×10^4 个/cm² (MEF) 密度均匀地铺在明胶(gelatin)处理过的培养瓶上。
10. 置培养箱中静置过夜, 使其贴壁。

11. 铺好的饲养层在 1~7 d 内都可以较好地支持小鼠胚胎干细胞的生长并维持其全能性

要点: 注意丝裂霉素 C 的有效期和使用方法。购买的粉剂丝裂霉素 C, 用之前应以适量 PBS 彻底溶解, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 分装后存放于 4 °C。若发现分装的丝裂霉素 C 溶液析出结晶或溶液由浅蓝色转变成紫红色时, 说明丝裂霉素 C 已经失效, 不能再使用。

(中科院上海生命科学研究院生化细胞所干细胞技术平台 徐 兰 刘敏英)

会讯

第 11 届中国细胞生物学学术大会 暨 2009 西安细胞生物学国际会议

为促进我国细胞生物学领域乃至世界各国和地区相关领域专家的交流与合作, 由中国细胞生物学学会主办, 第四军医大学、陕西省细胞生物学学会承办的“第 11 届中国细胞生物学学术大会暨 2009 西安细胞生物学国际会议(www.cccb2009.cn)”将于 2009 年 7 月 5 日至 7 日在西安古都新世界大酒店召开。会议主要内容为: (1) 染色体、基因、蛋白质; (2) 细胞结构与功能; (3) 干细胞、细胞分化和发育生物学; (4) 细胞信号转导和细胞通讯; (5) 免疫细胞生物学; (6) 肿瘤细胞生物学; (7) 细胞外基质与微环境; (8) 细胞工程和转基因生物; (9) 植物细胞生物学; (10) 细胞生物学教学; (11) 神经细胞生物学; (12) 系统生物学。这是一次代表国际发展前沿水平的盛会, 诺贝尔奖获得者 Richard J. Roberts 将为大会做特邀报告。这次大会将为研究者了解细胞生物学最新进展以及加强国内外相互交流和合作提供了一次难得的良机, 为参会者搭建了一个细胞生物学交流的平台, 欢迎踊跃参加。

“Wnt 信号、器官发育和干细胞 国际学术大会”会议

2009年5月24~27日中国厦门

组织者: Elaine Fuchs, Xing Dai, 林圣彩

主办单位: 厦门大学生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞教育部重点实验室

协办单位: Laboratory of Mamalian Cell Biology and Development, The Rockefeller University;
Department of Biological Chemistry, University of California, Irvine

“Wnt 信号、器官发育和干细胞国际学术大会”定于2009年5月24日至5月27日在厦门大学召开。大会将邀请10余位国际上该领域的顶尖专家作专题报告, 包括 Elaine Fuchs (美国科学院院士), Hans Clevers(荷兰皇家科学院院士), Michael Geoff Rosenfeld (美国科学院院士、美国艺术和科学院院士), Marianne Bienz (英国皇家科学院院士)和邓宏魁(北京大学教授、长江特聘教授)等。他们代表了国际 Wnt 信号通路、器官发育和干细胞研究的最高水平。

大会详情请见大会主页:

<http://life.xmu.edu.cn/wntmeeting/index.htm>

大会组委会盛情邀请国内外同行参加, 现已开始接受注册。有意参加者可登录大会主页下载回执(国内)或报名表(国外), 并将填写好的回执或报名表, 于4月30日之前发送至 klmect@xmu.edu.cn。如有论文摘要, 也请于4月30日之前发给会务组。

大会欢迎协办及赞助!

大会联系人: 电话: 黄青松秘书 0592-2185361, 李博安教授 0592-2181987

传真: 0592-2188101, E-mail: klmect@xmu.edu.cn

联系地址: 福建省厦门市厦门大学生命科学学院, 邮编: 361005

国际生物化学与分子生物学大会

2009年8月2~7日 上海

“21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology”(第21届国际生物化学与分子生物学联盟学术大会暨第12届亚洲大洋洲生物化学家与分子生物学家学术大会,简称国际生化大会)将于2009年8月2~7日在上海国际会议中心召开。国际生化大会每三年举办一次,是国际生命科学研究领域最重要的序列会议之一,是首次在我国举办。中国生物化学与分子生物学会和中国细胞生物学学会将共同承办这次盛会。

国际生化大会将提供生命科学最前沿的研究成果。它涵盖了生命科学中的4大主题(基因组动态和基因调控;蛋白质结构、动态与蛋白质组;细胞信号网络;疾病的分子机制),共有36个专题分会场;此外,大会还包括一些其他专题会议,如糖生物学、脂生物学、生物技术与技术转移等(详细内容见 www.iubmb-faobmb2009.cn)。

大会组委会已经邀请并落实了众多来自世界各地的优秀科学家在会议上做报告。12位顶尖科学家已经确认到会做大会主题报告,包括4位诺贝尔奖获得者以及发现iPS细胞的Dr. Shinya Yamanaka和因发现microRNA获得2008年Lasker奖的Dr. Victor Ambros。与此同时,160余位在各自研究领域做出杰出贡献的科学家已经接受邀请,同意在相关的学术专题会上做学术报告。据对这些同意参加会议的报告人的不完全统计,拥有正教授职称的会议报告人已经超过80%,其中来自美国的正教授有60多人(包括8个HHMI的研究员),来自欧洲的正教授有30多人,来自世界其他地区的正教授有20多人(详细名单见 www.iubmb-faobmb2009.cn)。

大会组委会邀请国内广大研究人员、老师、研究生和博士后参加这次生命科学的盛会。在线注册从2009年1月1日已经正式开通。您可以登陆 www.iubmb-faobmb2009.cn 进行在线注册,并获取更多关于此次会议的信息。优惠在线注册的时间是1月1日到4月30日。正常在线注册的时间是5月1日到6月30日。在线注册和论文提交的截止日期为2009年7月1日。



浙江省医学遗传学重点实验室 Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics

由浙江省科技厅、浙江省发展和改革委员会、浙江省财政厅等部门批准，依托温州医学院建设的浙江省医学遗传学重点实验室，于2005年12月和2006年7月通过验收和评估。温州医学院生命科学学院院长管敏鑫教授担任实验室学术委员会主任，温州医学院副校长吕建新教授担任实验室主任。

实验室的主要研究方向有：①与线粒体基因组相关疾病(视神经病变、耳聋、糖尿病、肿瘤等)的分子遗传学研究；②多糖药物与基因表达调控研究；③靶向分子构建与基因治疗载体研究；④微生物基因组生物信息分析。

实验室现正在承担国家“973”重大基础研究前期研究专项(核修饰基因GTPBP3、TRMU和MTO1在与线粒体12S rRNA突变有关耳聋表型中的作用, 2004CCA02200)、国家自然科学基金海外-港澳青年学者合作研究科学基金项目(Leber遗传性视神经病变的发病机制研究, 30628013)、国家“973”研究子课题、“863”计划项目, 以及国家自然科学基金面上项目、浙江省自然科学基金重大和面上项目、国家教育部重点项目等省部级以上研究项目18项。2004年8月以来, 发表SCI收录的学术论文19篇, 已有3项研究成果荣获浙江省科学技术奖。实验室具有良好的学术团队, 学科带头人和主要学术骨干致力于线粒体病的分子遗传学机制研究, 已在American Journal of Human Genetics、Molecular & Cellular Biology、Journal of Biological Chemistry、Human Molecular Genetics、Nucleic Acids Research和Investigative Ophthalmology & Visual Science等有国际影响的杂志发表论文50余篇。担任多种有国际影响的杂志审稿人及国内外科研基金的评审专家, 担任多种学术刊物的编委等。入选国家百千万人才工程1人、教育部高等医药学科(专业)临床医学和医学技术类教学指导委员会2人、浙江省特聘教授1人、浙江省“跨世纪学术与技术带头人培养工程”第一层次人才2人, 浙江省高校中青年学科带头1人。目前实验室有教授9人、副教授3人。

现拥有专业实验室面积合计2 085 m², 建有分子遗传学和细胞遗传学技术平台, 拥有万元以上仪器设备合计263

台(件), 仪器设备值合计5 000万余元。包括基因分析系统(Beckman Coulte CEQ8800)、荧光定量PCR仪(MJ Opticon2)、变性高效液相色谱分析仪(Tronsgenomic公司)、核酸蛋白分析仪(Beckman Coulter的DU800)、蛋白质组学双向电泳分析系统(Bio-Rad公司)、流式细胞分析仪(BD-FACS)、激光共聚焦显微镜(Olympus)、透射式电子显微镜(日立H-7500)、扫描电子显微镜(日立S-3000N)、细胞遗传学图像分析系统、落地超速离心机(Beckman Coulter的OPTIMAL-100XP)等分子和细胞遗传学技术大型仪器。

实验室与美国辛辛那提儿童医学中心、美国路易斯安那州立大学、美国德克萨斯州立大学医学中心等国外科研院所联合开展的线粒体结构与功能, 线粒体基因组与相关疾病的研究已取得初步成果。还与美国贝勒医学院、复旦大学生命科学学院、北京大学医学遗传中心和中国科学院生物膜与膜生物工程国家重点实验室等科研院校建立了良好的合作意向或战略合作伙伴关系。

实验室曾联合主办2005年度和2006年度国际线粒体生物医学学术会议和2006年度世界华人遗传学大会等学术会议。

根据国家“十一五”发展规划及本学科现状, 实验室将贯彻知识创新、科教兴国的战略方针, 将进一步加强医学遗传学的基础研究, 其中将重点发展与人类线粒体病和医学遗传学相关的理论及其在医学领域中的应用, 将浙江省医学遗传学重点实验室建成集科学研究、人才培养和高新技术产业化于一体的实验基地。



实验室分子遗传学技术平台主要设备



实验室细胞遗传学技术平台主要设备