

专题介绍

小鼠胚胎干细胞的培养

完全培养基: 高糖 DMEM (GIBCO 12430); 15% 胎牛血清(BIOCHROM S0615); 0.1 mmol/L 非必需氨基酸(GIBCO 11140-050); 2 mmol/L 谷氨酰胺(GIBCO 25030); 0.1 mmol/L β -巯基乙醇(GIBCO 21985); 1 000 U/ml 白血病抑制因子(CHEMICON ESG1107)

冻存液: 90% 胎牛血清或完全培养液; 10% 二甲基亚砷(DMSO, Sigma D2650)

一 小鼠胚胎干细胞复苏

1. 操作前把培养液在 37 °C 水浴中温热。
2. 从液氮中取出一支冻存管的小鼠胚胎干细胞, 放入 37 °C 水浴中晃动, 直到只剩下小冰晶。
3. 吸取冻存管内的细胞悬液加至有少量完全培养液的 15 ml 离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min。
4. 吸弃上清液, 加 4~6 ml 培养液, 吹打悬浮。
5. 重复吹打, 制成单细胞悬液, 尽量避免气泡。
6. 转移到 1 个已经铺好饲养层的 25 cm² 培养瓶中培养。

7. 每天换液。

要点: 复苏过程中“速融”是关键。由于在常温下 DMSO 对细胞有毒性, 应尽量缩短复苏的时间。离心去掉 DMSO。

二 小鼠胚胎干细胞传代

1. 一般在复苏后第 2~3 天传代, 视克隆的大小和密度而定。
2. 吸弃废液。
3. 用 PBS (不含钙镁) 轻轻冲洗两遍。
4. 加 0.5~1.0 ml 的胰蛋白酶(0.25%)-EDTA (0.02%) 溶液至培养瓶, 左右晃动, 使胰酶覆盖整个瓶底, 消化细胞。

5. 在显微镜下观察, 直到细胞层全部脱落(一般需要 1~2 min)。

6. 加适量(4~5 ml)完全培养液终止消化。

7. 多次轻轻吹打细胞, 制成单细胞悬液。

8. 细胞悬液转移到 15 ml 离心管, 1 000 r/min 离心 5 min。

9. 吸弃上清液, 加足量的培养液, 吹打混匀, 细胞悬液分装到各铺好饲养层的 25 cm² 培养瓶中, 一个培养瓶加 5~6 ml ES 培养液。

10. 放入培养箱中。

11. 每天换液。

要点: 传代比例 1:4~1:10, 即长满一个培养瓶的细胞可以传代至 4~10 个同样大小的培养瓶中。细胞离心后重悬液必须吹打成单细胞悬液。

三 小鼠胚胎干细胞冻存

1. 按传代的方法把细胞消化下来, 制成细胞悬液。

2. 1 000 r/min 离心 5 min。

3. 弃上清液, 逐滴加已经预冷的冻存液并不断摇动混匀。

4. 分装到冻存管中, 标记。

5. 将冻存管置程序降温盒, -80 °C 过夜, 转入液氮。

要点: 冻存液的配方是 90% 完全培养液和 10% 的 DMSO, 如果细胞株比较珍贵需要提高复苏存活率的话可以增加冻存液中血清的比值, 甚至可以用血清代替完全培养液。由于在常温下 DMSO 对细胞有毒性, 应将配好的冻存液在冰上预冷。快速分装到各个冻存管以后马上置程序降温盒, -80 °C 过夜。

(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)

勘误

发表在本刊 2009 年 31 卷第 2 期 151~156 页的文章“激光显微切割技术推进全面解析植物雄配子发生的分子机制”存在以下表述错误:

序号	页数	行数	错误内容	正确内容
1	151	摘要第 1 行	雄配子(又称小孢子, 即花粉)	雄配子体(花粉)
2	151	第 1 段第 1 行	雄配子(即小孢子、花粉)	雄配子体(花粉)