

专题介绍

胚胎干细胞培养中的饲养层制备

在本专题的第2期, 我们已向读者介绍了如何制备饲养层细胞来培养小鼠胚胎干细胞。实际工作中, 陆续有来自全国各地的科研工作者来电询问饲养层的制备和培养等问题, 这些问题主要分为两类: 一, 饲养层细胞的培养出现污染、细胞死亡、增殖停滞等; 二, 用自行制备的小鼠胚胎成纤维细胞作饲养层培养胚胎干细胞效果不理想, 特别当培养人胚胎干细胞时, 干细胞状态不好却不知症结在哪里。

这一期中, 我们针对这几个比较常见的问题, 提几点建议, 希望大家在干细胞研究的道路上走得更顺利。

1 使细胞培养规范化, 标准化

出现第一类问题的实验室一般原因是刚开始从事细胞培养, 各方面条件还未标准化。常规培养强调三点:

(1)严格无菌。无菌培养设备到位后, 要做的就是日常清洁和消毒, 防止细菌、真菌、支原体等常见微生物污染; 条件有限的实验室可以在常规培养时添加抗生素预防污染。

(2)培养设备维护。定期检测并调试培养箱内的温度、湿度和二氧化碳浓度, 不稳定的设备经过较长时间运行后实际参数会有较大偏差, 这一点很容易被忽略。对温度或二氧化碳浓度有特殊要求的细胞株要分开培养。

(3)培养试剂。劣质的血清不但不能满足细胞的生长需要, 而且会携入支原体、内毒素等污染, 建议购买品牌信誉良好的已经灭活好的血清, 若条件有限也可自行热灭活处理, 但是血清加热灭活后部分蛋白成分变性, 对细胞生长的支持能力往往有所下降。

2 细胞扩增过程时间长导致细胞老化, 增殖缓慢

小鼠胚胎成纤维细胞传代培养至3~4代后, 增殖速度就明显减慢。我们建议取一次原代细胞, 连续扩增至一定代数后用丝裂霉素处理, 计数批量冻存, 需要时复苏细胞, 使贴壁后即可使用。

3 培养人类胚胎干细胞对饲养层细胞的要求

一般地, 培养人类胚胎干细胞同样要用小鼠胚胎成纤维细胞作饲养层, 制备饲养层的方法在专题第2

期已经作了详细的讲解, 但是培养人胚胎干细胞时, 还有几点不同:

(1)品系要求不同。目前多数人胚胎干细胞系, 如来自 WiCell 的 H1、H9 等都适应于 CF-1 小鼠的饲养层细胞。国内常用的近交系小鼠不适用于用来制作培养人胚胎干细胞的饲养层(如图1);

(2)所用的小鼠胚胎发育阶段不同, 按照我们的经验, 用于培养人胚胎干细胞的饲养层应取自不大于12.5天的小鼠胚胎;

(3)扩增的时间不能太长, 一般传到第2代就可用丝裂霉素处理;

(4)铺饲养层前需用基质胶预处理培养器皿。

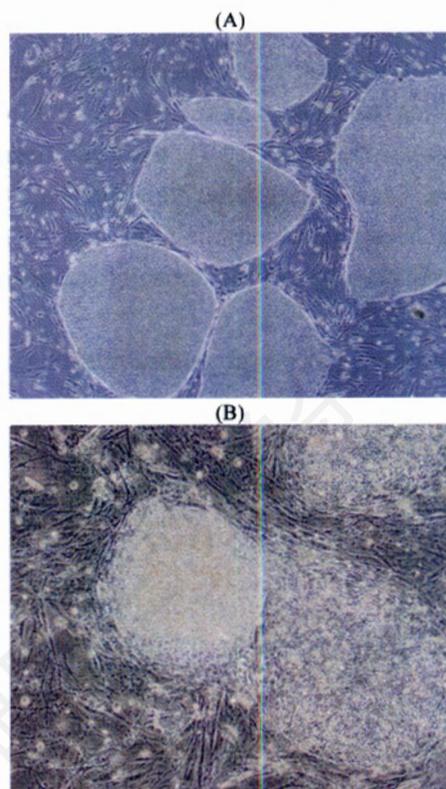


Fig.1 Different morphologic status of H1 by using two different feeder cells

A: Feeder cells from CF-1 mice; B: Feeder cells from no CF-1 mice.

(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)