

专题介绍

用小鼠胚胎干细胞制备拟胚体

分化培养液: 高糖 Dulbecco's modified Eagle's medium (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)。

胚胎干细胞(embryonic stem cells)在一定的培养条件下可以长期维持其自我更新能力和多向分化潜能; 同时也可以在一定条件下自发分化, 形成具有内、中、外 3 胚层结构的拟胚体(embryoid bodies)。拟胚体被认为再现了胚胎从原肠运动前到早期原肠运动这段时间的发育过程, 而这个阶段的胚胎处于刚着床于子宫壁的阶段, 技术上很难获得。因此拟胚体被广泛用于研究胚层间相互诱导、器官空腔化形成等胚胎早期发育事件, 已成为干细胞研究领域不可或缺的技术手段。

目前已经报道的拟胚体制备方法有多种, 在技术方法上差异较大, 结果也不尽相同。这一期专题中, 我们将向读者介绍一种拟胚体的形成方法, 我们已经证明, 以出现节律性搏动的心肌样细胞为指标, 用这种方法形成的拟胚体出现搏动心肌的比例达 90%, 且结果稳定, 重复性高。

1 小鼠胚胎干细胞的培养

小鼠胚胎干细胞培养的具体方法可参照本刊第 31 卷第 3 期的专题介绍, 在此不再赘述。

2 去除饲养层细胞的干扰

利用小鼠胚胎成纤维细胞和胚胎干细胞贴壁速率的差异, 去除培养物中绝大多数的成纤维细胞。方法是:

- (1) 正常培养的小鼠胚胎干细胞继上次传代满

48 h 后, 将细胞从培养器皿上消化下来, 吹打成单细胞悬液。

- (2) 以小于 5×10^4 个/cm² 的密度接种到细胞培养皿上, 放入培养箱静置 30 min。

- (3) 用移液管收取上清液以及上清液中还未贴壁的细胞, 转移到离心管, 离心。

3 制备拟胚体

离心后, 用分化培养液重悬细胞至大约 $(1 \sim 1.5) \times 10^5$ 个/ml 的浓度, 然后进行悬滴。悬滴的方法:

- (1) 准备若干个 10 cm 悬浮培养皿, 在皿内加 5 ml PBS。

- (2) 打开皿盖, 平放于台面上, 使盖子内表面朝上, 20 μ l 一滴, 逐滴滴在皿盖上。

- (3) 滴满后的皿盖用自然的力度扣至皿底上, 盖好, 小心放入培养箱中。

- (4) 48 h 后, 在每一个液滴中均可以用肉眼看见一个白色颗粒状物体, 此即为拟胚体。用微量加样器小心地将拟胚体吸出, 进行后续的实验。

要点: 新手初次悬滴法制备拟胚体的时候可将液滴间距控制得大一些, 待熟练后可使间距缩小, 得到更多的 EB; 我们已经证明, 理想的细胞悬液的浓度为 $(1 \sim 1.5) \times 10^5$ 个/ml, 太稀或太浓都不利于形成的拟胚体保持均一性。取下的拟胚体若在分化培养液中贴壁培养 6 天后, 可以观察到有自发的心肌分化, 表现为有节律的搏动。用上述方法得到的拟胚体出现搏动心肌的比例可达到 90% 以上, 且重复性非常高。

(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 5 期 683~688 页的文章“车前子多糖抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞增殖及其机制”存在以下表述错误, 作者“郭贇”有误, 应该为“郭鋈”。特此更正。