

## 专题介绍

## 人类胚胎干细胞的培养

自第一株人类胚胎干细胞(hESCs)系面世以来, hESCs 在人类疾病治疗等多领域的潜在应用一直在吸引越来越多的科学家投入到这项研究中。在国际干细胞领域, hESCs 的培养方案已经初步规范化并且随着 hESCs 的自我更新和分化调控机制上新发现的不断涌现, 细胞维持方案也在随之发展和改进。本期专题我们将向读者介绍一种可以较好地维持 hESCs 正常遗传特性、全能性和自我更新能力的 hESCs 维持方案。

## 1 培养试剂

饲养层细胞完全培养液: 90% 高糖 DMEM (Gibco 12430); 10% FBS (Biochrom S0615)。

hESCs 完全培养液: 80% DMEM/F12 (Gibco 11330); 20% 血清替代物(Gibco 10828); 2 mmol/L L-glutamine (Gibco 25030); 2 mmol/L 非必需氨基酸 (Gibco 11140); 0.1 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇(Gibco 21985-023); 4 ng/ml bFGF 溶液(Gibco 13256-029)。

bFGF 储存液:

| 组分                 | 含量         |
|--------------------|------------|
| bFGF               | 10 $\mu$ g |
| 在 PBS 中加入 0.1% BSA | 5 ml       |

保持无菌, 分装后  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

基质胶溶液(用以铺饲养层细胞前处理培养容器底面):

| 组分                                | 含量     |
|-----------------------------------|--------|
| 基质胶(matrigel, Invitrogen, 354234) | 1 ml   |
| DMEM/F12                          | 200 ml |

溶解基质胶前1天, 将产品放在  $4^{\circ}\text{C}$  过夜使其溶化, 用冰冷的 DMEM/F12 稀释分装,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

胶原酶溶液:

| 组分              | 含量    |
|-----------------|-------|
| 胶原酶, IV型(Sigma) | 30 mg |
| DMEM/F12 培养基    | 30 ml |

将胶原酶溶于 DMEM/F12 培养基中, 用  $0.22\ \mu\text{m}$  过滤器过滤除菌。分装后保存于  $-20^{\circ}\text{C}$ , 避免反复冻融。

## 2 制备饲养层

本刊第2期与第4期的专题分别向大家介绍了制备饲养层的方法和培养 hESCs 时制备饲养层的注意点, 在此不再赘述。

## 3 解冻 hESCs

(1) 解冻前 1 h, 将已经用基质胶处理过并且已经铺好饲养层细胞的 6 孔板吸掉 MEF 培养液, 用 PBS 洗两遍后, 添加已经温育好的 hESCs 培养液 1 ml/孔。

(2) 把 hESCs 冻存管从液氮罐中取出, 两手来回搓冻存管 10~15 s, 直到冻存管外的霜除去。

(3) 将冻存管浸入  $37^{\circ}\text{C}$  水浴, 轻轻摇动。注意: 不要浸没盖子。

(4) 用酒精棉球擦拭整个冻存管, 并在超净台中风干。

(5) 在 15 ml 离心管中加入 5 ml 已经温育过的 hESCs 完全培养液, 用 1 ml 微量加样器轻柔地将冻存管内的细胞吸起, 转移至上述 15 ml 离心管中, 解冻的过程尽量快速、温和地进行。

(6) 轻轻混匀两次, 尽量不要吹散细胞团块。静置离心管 5 min, 使细胞团块在重力作用下下沉。

(7) 吸掉上清液。

(8) 重新加入 5 ml hESCs 完全培养液, 重复步骤 6~7。

(9) 加适量培养液重悬细胞团, 并将细胞团均匀地加到 6 孔板中的每个孔内, 1 ml/孔。

(10) 小心地将 6 孔板放入培养箱, 避免震动。

(11) 48 h 后换新鲜的培养液, 之后每 24 h 换液。

(12) hESCs 克隆复苏存活率很低, 每次复苏约 1 周后可在显微镜下观察到小克隆, 复苏后 2 周传代。之后, 每隔 5~7 天传代。

## 4 hESCs 传代

(1) 至少提前一天准备好饲养层细胞, 传代前 1 h, 将已经用基质胶处理过, 并且铺好饲养层细胞的 6 孔板吸掉 MEF 培养液, 用 PBS 洗两遍后, 添加已经温育好的 hESCs 培养液 1 ml, 放回培养箱。

(2) 把待传代的细胞吸掉培养液, 加入足量的 IV

型胶原酶溶液(6孔板, 1 ml/孔)。

(3) 将6孔板置培养箱温育10 min, 可见hESCs克隆逐渐从边缘卷起, 直到整个克隆从孔板底面上脱落。

(4) 用1 ml微量加样器将脱落的克隆转移至一个15 ml离心管。

(5) 加适量hESCs完全培养液, 轻轻混匀。

(6) 将离心管静置5 min, 使克隆块在重力作用下下沉。

(7) 吸掉上清液, 重复步骤5~6。

(8) 吸掉上清液, 加适量的完全培养液, 轻轻敲打6~7个来回。

(9) 将细胞悬液加入已经铺好的饲养层细胞上面, 将培养板上下左右水平地晃动, 使hESCs小克隆块均匀地分布在饲养层上面。

(10) 放入培养箱, 并且小心开关培养箱的门, 避免造成震动。

(11) 48 h后换液, 以后每24 h换液。

## 5 冻存hESCs

(1) 配制2×冻存液, 即80% hESCs完全培养液+20%二甲基亚砜(DMSO), 混匀后置冰上预冷, 当天用当天配。

(2) 状态良好的hESCs克隆用胶原酶温育, 步骤如hESCs传代第2~8步骤。

(3) 将预冷好的2×冻存液逐滴加入, 一边加一边晃动离心管。

(4) 用加样器轻轻混匀克隆块悬液, 分装到冻存管, 写上标签。

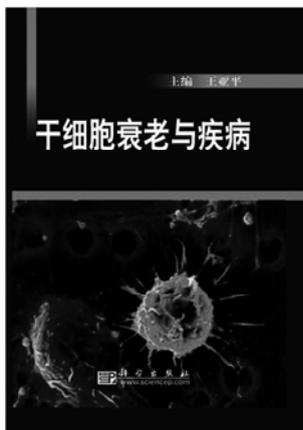
(5) 将冻存管放入程序降温盒, 置-80℃; 从滴加冻存液到放入-80℃冰箱的过程同样要求操作者动作迅速且温和。

(6) 第二天, 将hESCs冻存管转入液氮永久保存。

(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)

## 新书介绍

### 《干细胞衰老与疾病》



干细胞衰老与疾病的发生是生物医学领域内新兴的研究方向。由重庆医科大学基础医学院院长、重庆医科大学干细胞与组织工程研究室主任王亚平教授主编的《干细胞衰老与疾病》已于2009年8月在科学出版社出版, 本书介绍了干细胞生物学及干细胞衰老的理论和最新研究进展、干细胞衰老与相关疾病、干细胞衰老及延缓干细胞衰老的研究方法和临床应用, 内容较为全面, 资料翔实。全书包括11个章节, 涉及干细胞衰老与疾病的研究现状及意义, 衰老的生物学, 衰老的细胞与分子机制, 胚胎干细胞、造血干细胞、神经干细胞、间充质干细胞、生殖干细胞、肿瘤干细胞与衰老, 干细胞衰老和延缓衰老的研究方法, 祖国医学对抗衰老和延缓干细胞衰老的研究等。为从事相关领域研究的科研人员和临床医师提供了一本不可多得的重要参考书。

当当网、卓越网、新华书店及医学专业店有售。定价78.00元。邮购电话: 010-64034601, 010-64019031。地址: 100717, 北京市东黄城根北街16号, 科学出版社。联系人: 温晓萍。免邮寄费用, 请在汇款附言注明您购书的书名、册数、联系电话、是否要发票等。