

实验方法

实验程序：人胚胎干细胞培养

基底膜是连续薄片状的特化细胞外基质，其存在于真皮-表皮的接合处以及消化系统、呼吸系统、生殖系统和泌尿系统的所有内腔-衬覆上皮的基部，这形成了内分泌腺和外分泌腺软组织细胞的基础。

Corning® Matrigel® 基质是从EHS(Engelbreth-Holm-Swarm)小鼠肉瘤中抽提得到的可溶性的基底膜抽提物，在室温下能凝胶化形成真正的重组基底膜¹。康宁基底膜基质的主要成份是层粘连蛋白，还有胶原IV、巢蛋白和硫酸肝素糖蛋白²⁻³。已经报道康宁基底膜基质中含有生长因子、胶原酶、血纤维蛋白溶酶原激活剂和其他不明确的成分⁴⁻⁵。

康宁基底膜基质广泛地作为底物用于在不同的条件或特定的培养基下培养人胚胎干(hES)细胞¹⁻¹⁰。从历史上看，胚胎干细胞的分化和培养技术需要利用血清和/或小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)饲养层⁶。人胚胎干细胞研究的理想环境由对人胚胎干细胞特异的细胞培养表面和无血清的特定培养基组成。康宁人胚胎干细胞特异的基底膜基质和STEMCELL Technologies' mTeSR[®]1 (WiCell研究中心许可研发的)、高质量的表面和培养基共同创造了第一个完整的环境以支持人胚胎干细胞独立饲养增殖。

康宁人胚胎干细胞特异的基底膜基质是干细胞研究的最佳表面。通过STEMCELL技术，康宁基底膜基质已经可以兼容mTeSR1，这对人胚胎干细胞的研究提供了必须的可重复性和一致性。康宁基底膜基质可以和多种培养基一起使用，对于人胚胎干细胞的培养来说，康宁基底膜基质已经被作为广泛接受的无饲养层细胞的底物。

利用mTeSR1培养基，下列实验程序对于人胚胎干(hES)细胞的培养是最优化的。为了使用无动物蛋白的培养基，根据制造商的推荐能使用TeSR[™]2。

材料

- 康宁人胚胎干细胞基底膜基质，5 mL瓶(康宁货号354277)。
- Falcon®标准组织培养处理板或皿(6孔平底板，康宁货号353046；或100 mm皿，康宁货号353003)。
- mTeSR1培养基试剂盒(STEMCELL Technologies，货号05850；人胚胎干细胞维持培养基)。
- Dulbecco磷酸生理缓冲液(DPBS)。
- L-谷氨酸 200 mM。
- MEM非必需氨基酸(例如，Invitrogen货号11140-050)。
- 小牛血清(FBS)-加热到56°C，30分钟，热灭活。
- DMEM/F12培养基(Invitrogen货号113330-032)。
- β-巯基乙醇。

Corning Restricted

- 康宁中性蛋白酶(康宁货号354235)。
- 0.2 μm ，低蛋白结合滤器。
- 康宁Delipidized BSA (康宁货号354331)。
- 10%正常山羊血清，或封闭血清。

人胚胎干细胞培养需要的设备

- 二级生物样品处理的超净工作台。
- 湿润组织培养箱，37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 浓度。
- 低速离心机(例如，Beckman GS-6)。
- 台式离心机(例如，Eppendorf 5417R)。
- 移液器-Aid[®] (例如，Drummond Scientific)。
- 血细胞计数器(例如，Nebauer, Reichert)。
- 倒置显微镜和2X、4X和10X物镜(例如，Olympus CKX31)。

实验程序：

1.0 制备分装的CORNING[®] MATRIGEL[®]基底膜基质

在冰上4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜解冻康宁基底膜基质。一旦解冻，涡旋药瓶以确保康宁基底膜基质均匀分散。在药瓶的顶部喷上70%的乙醇并在空气中干燥。将产品放置在冰上并使用无菌技术操作。使用预冷的管子、移液管将材料分装成合适的小份并立即重新冷冻。避免反复冻融。

注意：如果康宁基底膜基质没有被合适的解冻，在溶液中可以看见块状物。在处理时请保持康宁基底膜基质全程在冰上。颜色的变化可能发生在冷冻或解冻康宁人胚胎干细胞基底膜基质药瓶的过程中，由于二氧化碳与重碳酸盐缓冲液和酚红的相互作用，颜色会从淡黄色变化到深红色。颜色的变化是正常的，不影响产品功效，在与5%的二氧化碳平衡后颜色将消失。

预防措施

- 康宁人胚胎干细胞基底膜基质在22 $^{\circ}\text{C}$ 到35 $^{\circ}\text{C}$ 下将会快速凝胶化。
- 储存：康宁人胚胎干细胞基底膜基质应该储存在-20 $^{\circ}\text{C}$ 。请不要储存在无霜冰箱中。
- 除特殊说明外，所有的程序都要在无菌的条件下进行。

2.0 配制康宁基底膜基质的工作溶液

向25 mL的DMEM/F-12中加入一份分装的康宁人胚胎干细胞基底膜基质用以包被4个6孔培养板或3个100 mm培养皿。配制分装小样的说明书是批次特异的并且基于蛋白质的浓度(参看产品说明书)。分装的小样能够在-70 $^{\circ}\text{C}$ 中储存长达6个月。经典的分装小样的体积在270-350 μL 之间。

3.0 包被程序

3.1 向6孔培养板的每孔中加入1.0 mL稀释好的康宁人胚胎干细胞基底膜基质，或向100 mm培养皿中加入8 mL。涡旋培养板或培养皿以将康宁基底膜基质溶液在表面中均匀分散。

注意：在包被过程中培养板或培养皿应该全程放置在冰上。这一部分的准备液体积应多于6孔培养板或100 mm培养皿。不同大小的培养容器应采取不同的规模。

3.2 在使用移液器将液体加入到每孔时请避免在康宁Matrigel™中产生气泡。如果在孔中有气泡，请在4℃下将培养板300 x g离心10分钟(离心机应该预冷到4℃)。对于培养皿中的气泡，请使用预冷的移液器吸头戳破。

3.3 在使用前至少将培养板放置在室温(15-25℃)下培养1个小时。

3.4 吸出包被溶液。确保移液器的吸头不会刮伤包被表面。

3.5 培养板现在可以使用了。

注意：请直到准备使用培养板时在去除康宁人胚胎干细胞基底膜基质。包被好的培养板可以在4℃存放长达一周的时间。请确保培养板被密封好以防止失水(例如，保鲜膜)。如果康宁基底膜基质溶液没有完全覆盖表面，那么培养板对于人胚胎干细胞的培养就不是最优化的。因此，当培养板某些区域的溶液被蒸发时我们不推荐使用该培养板。

4.0 人胚胎干细胞的培养

注意：下列的实验程序都是在Corning® Matrigel®人胚胎干细胞基质6孔培养板上使用mTeSR®1培养基培养人胚胎干细胞时优化的。实验结果的变异是由使用的细胞系、培养基、分化的状态和分离技术等决定的。对于您自己的系统，您应该优化条件。来自条件培养基的转变不需要任何适应。在传代时，细胞可以培养在康宁人胚胎干细胞基底膜基质6孔培养板的mTeSR1上。如果您使用TeSR™2培养基，请按照产品说明书的实验程序操作。

4.1 配置mTeSR1

4.1.1 在室温(15-25℃)下解冻mTeSR1 5X附加物(成分#05852，来自mTeSR1培养基试剂盒)，或在2-8℃过夜解冻。

注意：请按照制作商的推荐操作。为了获得最佳的结果，请确保TeSR1培养基试剂盒(mTeSR1基础培养基和mTeSR1 5X附加物)的组分的批次号以同一字母结尾(例如，D)。如果需要，5X附加物可以无菌地分装成工作小样并储存在-20℃。请在3个月内使用冷冻的分装样品。应该在1天内解冻分装小样，以此配制完全的mTeSR1培养基。不要在解冻后重新冷冻分装小样。

4.1.2 无菌操作，向400 mL基本培养基中加入全部100 mL 5X附加物，使总体积为500 mL。混匀。当存放在2-8℃时完全的mTeSR1可以稳定2周以上，冷冻在-20℃时可以稳定6个月。请在室温(15-25℃)下解冻培养基，或在2-8℃过夜解冻。

注意：如果准备使用无菌地完全mTeSR1，可以使用0.2 μm、低蛋白结合的滤器过滤培养基。

4.2 使用mTeSR1培养人胚胎干细胞

注意：通常，在STEMCELL技术的限定下，来自6孔冷冻保藏培养板的1孔的人胚胎干细胞、

低温贮藏的无血清培养基、mFreSR®(货号05854/05855)能成功地解冻到1个6孔培养板的1个孔中。如果细胞已经使用其他方法冷冻保藏，那么这可能不同。使用其他维持程序培养的人胚胎干细胞(例如，使用小鼠胚胎饲养层或条件培养基)可以使用这一程序解冻到mTeSR®1或TeSR™2上。在开始程序前，准备好所有管、加热的培养基和培养板，确保尽量快的解冻程序。

4.2.1 在37 °C水浴中，通过持续摇动冷冻小管直到残余小的冰球，快速解冻人胚胎干细胞。从水浴中移出小管并用70%的乙醇擦拭。

4.2.2 使用2 mL移液管将冷冻小管的内容物转移到15 mL的圆锥管中。

注意：使用2 mL移液管将最小化细胞团的破损。

4.2.3 将5-7 mL温热的mTeSR1逐滴加入管中，在培养基加入时轻柔的混合。

4.2.4 在室温(15-25 °C)下将管离心，300 x g，5分钟。

4.2.5 吸出培养基，保持留下的细胞团完整。使用2 mL移液管，轻柔的在1-2 mL的mTeSR1中重悬细胞团，小心操作以维持细胞的集聚。

4.2.6 在一角上轻轻地倾斜培养板，使多余的康宁基底膜基质溶液收集到该角上，去除康宁Matrigel™人胚胎干细胞基质6孔培养板上多余的培养基(包被溶液)。使用血清学移液管或抽吸的方法去除溶液。确保移液器的吸头不刮伤包被的表面。

注意：如果培养板已经储存在2-8 °C，那么在去除康宁人胚胎干细胞基底膜基质溶液之前请将培养板移至室温(15-25 °C)下放置30分钟。

4.2.7 转移2 mL细胞团块到康宁人胚胎干细胞基底膜基质6孔培养板的每孔中。确保细胞团块在每孔中均匀分配。左右前后移动培养板使孔内的细胞团块均匀分散。

4.2.8 在37 °C、5% CO₂浓度的湿润培养箱中培养细胞。

4.2.9 每天更换培养基。在解冻5-7天后检查未分化的克隆准备传代培养(密集的中心)。

注意：在解冻后如果只观察到几个克隆，那么它可能需要在一个新的Corning® Matrigel®人胚胎干细胞基质6孔培养板的同样大小的孔中传代和重培养。

5.0 康宁人胚胎干细胞基底膜基质6孔培养板上人胚胎干细胞的传代培养

5.1 在37 °C下加热康宁中性蛋白酶、分装的mTeSR®和DMEM/F-12培养基。

5.2 使用显微镜鉴定分化的区域，使用移液器吸头刮掉或抽吸的方法去除分化的区域。

注意：在高质量的培养下，这一筛选不应超过每孔细胞的20%。

5.3 从人胚胎干细胞培养物中吸出培养基，并用DMEM/F-12漂洗(2 mL/孔)。

5.4 向每孔的人胚胎干细胞中加入1 mL康宁中性蛋白酶(1 mg/mL)，在37 °C培养6-8分钟，或者直到在显微镜下观察到克隆的边缘开始卷起。

5.5 吸出康宁中性蛋白酶，向每孔中加入2 mL的DMEM/F-12漂洗3次以除去残余的康宁中性蛋白酶。漂洗之后，使用5 mL无菌移液管向每孔中加入2 mL的mTeSR1，通过小的圆周运动轻柔的破碎刮擦克隆。开始于克隆的边缘并按照您的方式逐渐进行到克隆中间。尝试尽可能的切成许多的小块。利用相差显微镜(2x或4x物镜)执行这一操作是最容易的。

5.6 将分离的细胞团块转移到15 mL圆锥管中，使用额外的2 mL DMEM/F-12或mTeSR1漂洗孔来收集残余的团块。向15 mL管中加入清洗液。

5.7 通过几次上下吸取液体，轻柔的使细胞团块分散(不要形成单细胞悬液)。向含有mTeSR1的康宁人胚胎干细胞基底膜基质6孔培养板的每孔中加入0.5 mL细胞悬液，轻轻地将培养板放置在37 °C、5% CO₂浓度的湿润培养箱中培养。作为1个粗略的指南，分离细胞的比例为1:3到1:6。确保细胞团块在每孔中的均匀分配。左右前后移动培养板使孔内的细胞团块均匀分散。

注意：如果克隆不处于最佳密度，那么每隔4-7天请使用1:6到1:10的分离比分离细胞(例如，来自6孔板中的1孔细胞可以分散接种到6孔板的6-10孔)。如果克隆太密或太稀，那么请相应地调整分离比例。重要的是请不要涡旋培养板的内容物，这样将会导致克隆聚集在培养板的中心。将培养板放入培养箱之前，请轻柔的左右前后摇动培养板，以此来使细胞团块均匀地分散在培养板的表面。

6.0 人胚胎干细胞的维持

注意：紧接着人胚胎干细胞的分离，培养物应该安静稳定地培养到下一天(第2天)。在接种细胞后从第2天开始更换培养基。

6.1 从康宁人胚胎干细胞基底膜基质6孔培养板中吸出营养枯竭的培养基，并加入2.5到3 mL预热的mTeSR1培养基。

6.2 从第3天到第7天，请每天更换人胚胎干细胞培养物的培养基。监控克隆确保它们大多数没有分化。

6.3 第5到第7天，细胞通常需要传代培养。

注意：当克隆变大、开始融合、相比于边缘克隆的中心变得密集和逐渐变亮时，在mTeSR1上的人胚胎干细胞就准备开始传代培养了。在接种到mTeSR1之后，根据接种总量的大小和密度，培养物通常要传代培养5-7天。

7.0 未分化的人胚胎干细胞的鉴定

7.1 形态学

监控未分化的人胚胎干细胞。未分化的人胚胎干细胞生长为致密、多细胞的克隆。它们应该显示出高核质比和显著的核仁。这些克隆有明显的边缘¹²。在相位差下观察时，健康的人胚胎干细胞克隆在中央时多层的，这会导致逐渐变亮的细胞的成簇。分化的细胞失去了完整的边缘，在克隆内细胞形态不均一，将会出现明显不同的细胞类型¹³。

7.2 细胞表面标记的免疫组化检测

7.2.1 除去培养基。使用2 mL的PBS洗涤细胞2次。

7.2.2 在室温下，使用1 mL 4%的多聚甲醛固定细胞20分钟。

7.2.3 使用2 mL的PBS洗涤细胞2次，每次5分钟。

7.2.4 在室温下使用 1 mL 的 0.1% BSA、溶于 PBS 的 10% 正常山羊血清*封闭细胞 45 分钟到 1 个小时。

注意：对于 Oct-3/4 染色，请在 0.1% Triton X-100 中透化处理，并在室温下使用 0.1% BSA、溶于 PBS 的 10% 正常兔血清封闭细胞 45 分钟。

7.2.5 在封闭时，请使用 PBS 配制一抗的工作溶液至需要的终浓度，PBS 中含有 0.1% BSA 和 10% 正常山羊血清*。

7.2.6 在封闭之后，向每孔中加入 1 mL 稀释的一抗工作溶液，在 2-8 °C 过夜培养细胞或在室温下培养 1 个小时。

7.2.7 使用 2 mL 含有 1% BSA 的 PBS 洗涤细胞 3 次，每次 5 分钟。

7.2.8 在含有 1% BSA 的 PBS 中稀释二抗(共轭结合荧光)。在黑暗条件下，向每孔中加入 1 mL 二抗培养细胞，室温下培养 60 分钟。

注意：如果使用预共轭连接的抗体，那么不需要二抗。

7.2.9 使用 2 mL 含有 1% BSA 的 PBS 洗涤细胞 3 次，每次 5 分钟。

7.2.10 使用 4 mL 的 PBS 覆盖细胞，并在荧光显微镜下成像。

*来自合适物种的替代正常血清取决于二抗的宿主。使用流式细胞仪分析和实时荧光定量 RT-PCR 也可以进行进一步的表征鉴定。

参考文献

1. Xu, C., et al., Nature Biotechnology 9:971 (2001).
2. Xu, C., et al., Stem Cells 22:972 (2004).
3. Stojkovic, P., et al., Stem Cells 23:306 (2005).
4. Sjögren-Jansson, E., et al., Developmental Dynamics 233:1304 (2005).
5. Xu, C., et al., Stem Cells 23:315 (2005).
6. Wang, L., et al., Blood 105:4598 (2005).
7. Levenstein, M.E., et al., Stem Cells 24:568 (2006).
8. Ludwig, T.E., et al., Nature Biotechnology, Brief Communications 24:185 (2006).
9. Xu, R.H., et al., Nature Methods 2:185 (2005).
10. Meng, Y., et al., FASEB J 24:1056 (2010).
11. Englund, MC., et al., In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 46:217 (2010).
12. Sridharan, I., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 381:508 (2009).
13. Ren-He, Xu, et al., Nature Biotechnology 20:1261 (2002).