

干细胞基础实验

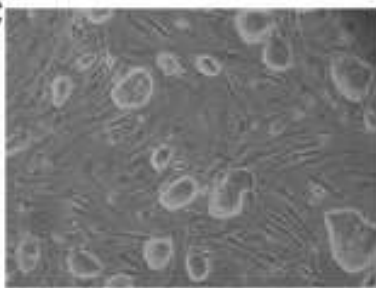
诱导多能干细胞的鉴定

诱导多能干细胞鉴定方法

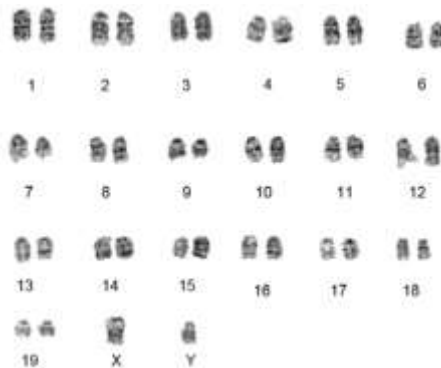
- ✓ 形态观察
- ✓ 核型分析
- ✓ 多能基因表达
 - ✓ 转录组水平
 - ✓ 蛋白水平
- ✓ 分化能力检测
 - ✓ 体外分化
 - ✓ 体内分化

形态观察及核型分析

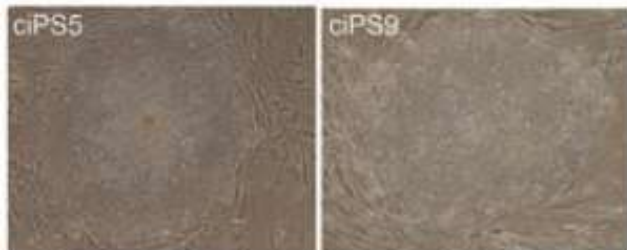
小鼠iPS克隆



鹅卵石状，边缘清晰，难以看清单个细胞，折光性强



人iPS克隆

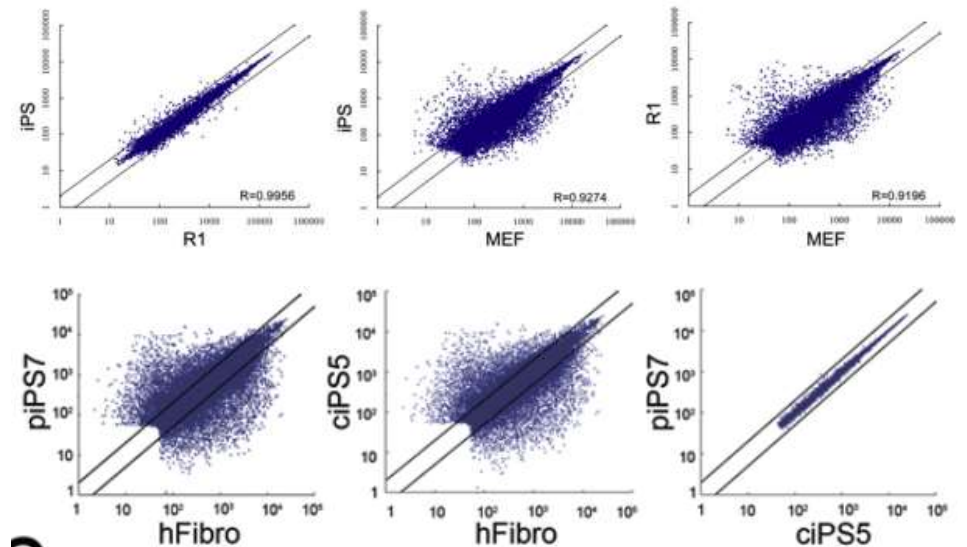
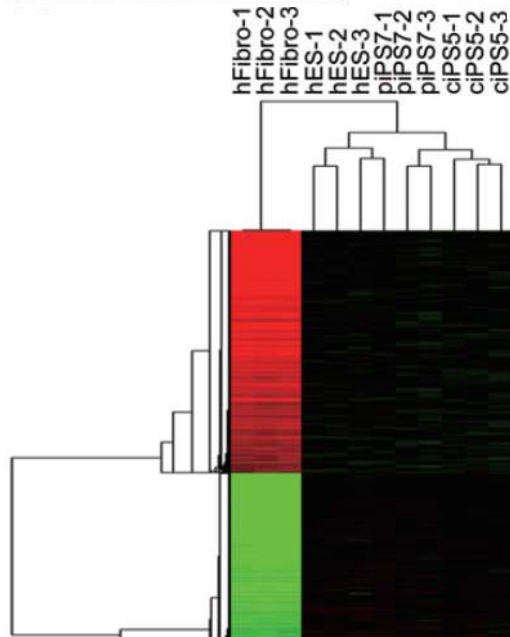
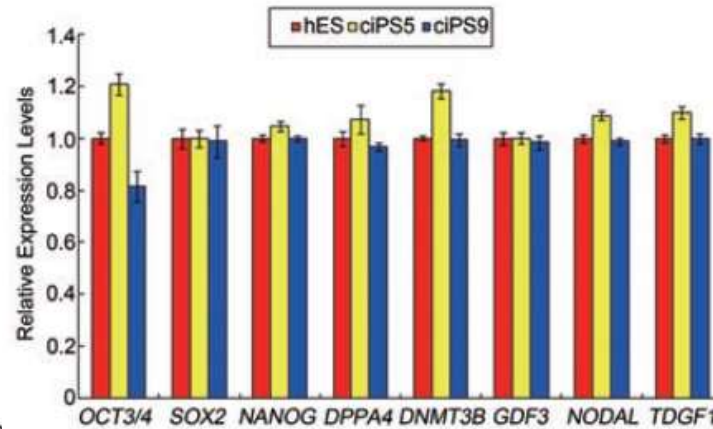
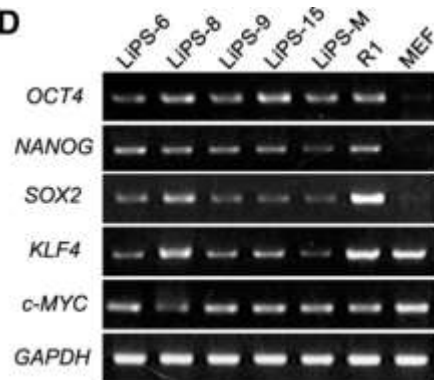


扁平状，边缘易分化，可以看清单个细胞，核质比大



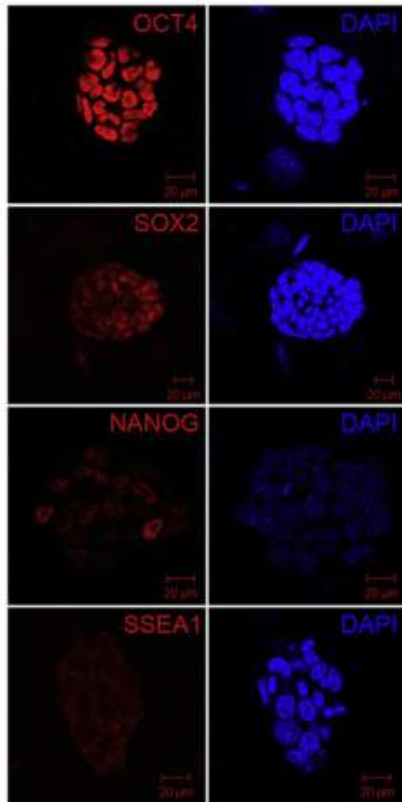
多能基因表达

D

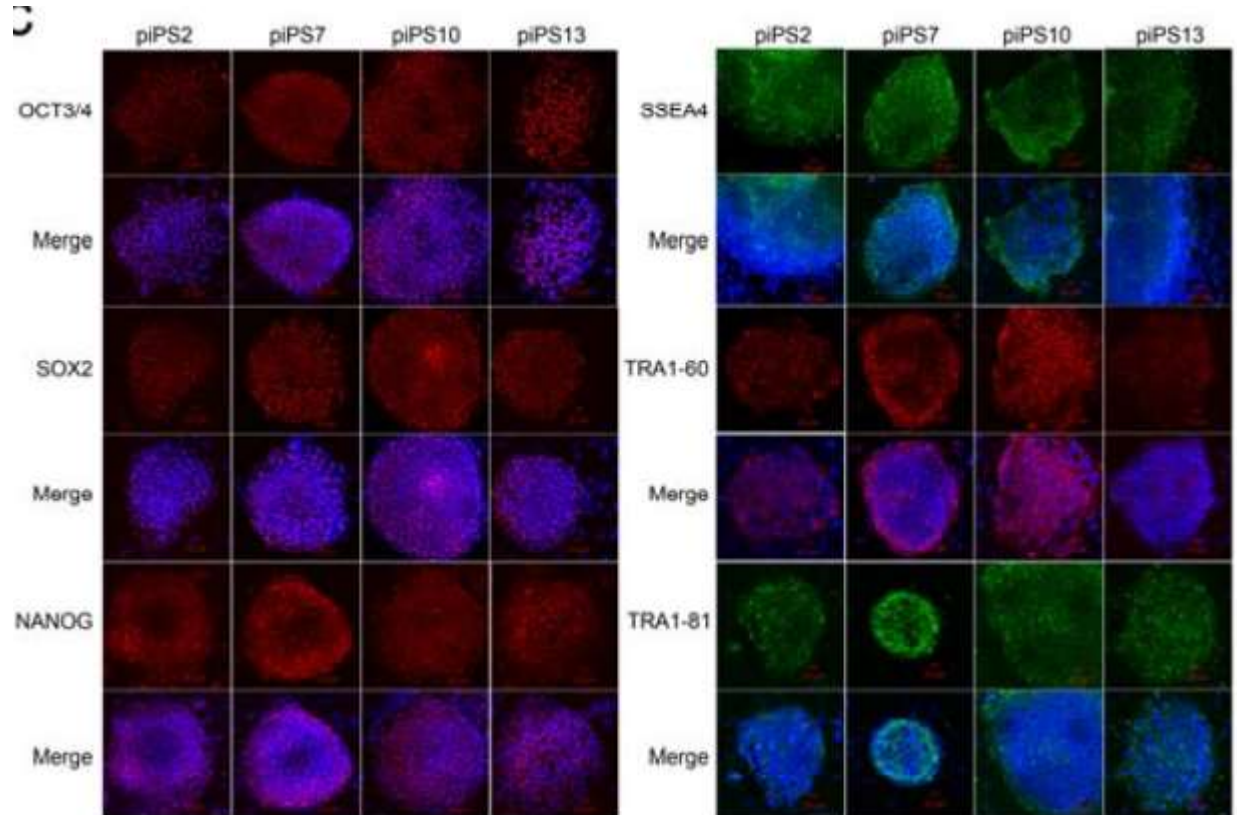


多能基因表达

Oct4 Sox2 Nanog
SSEA1



OCT4 SOX2 NANOG
SSEA4 TRA1-60 TRA1-81

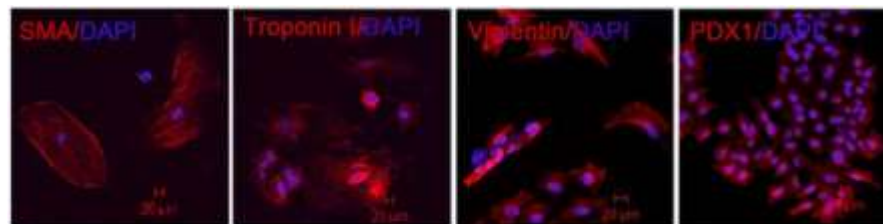
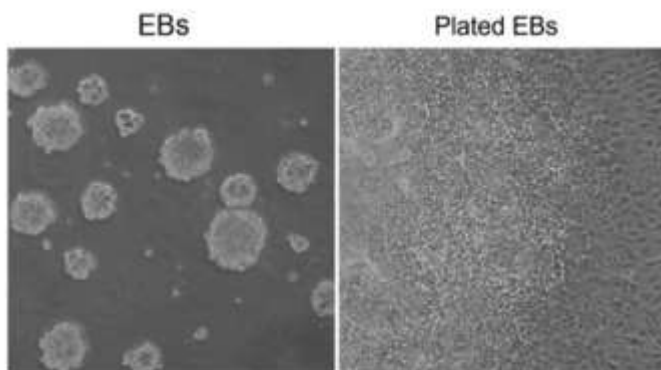


免疫荧光染色

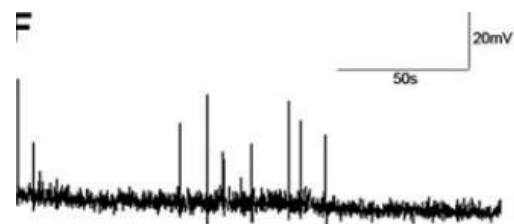
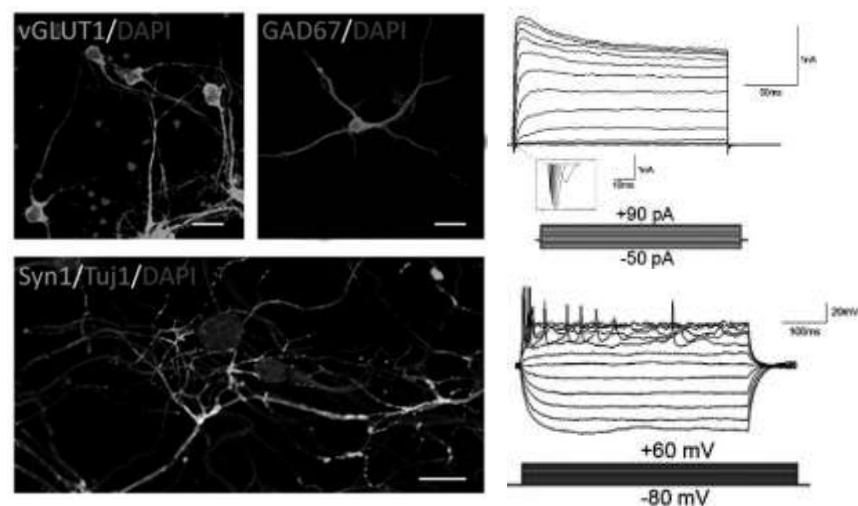
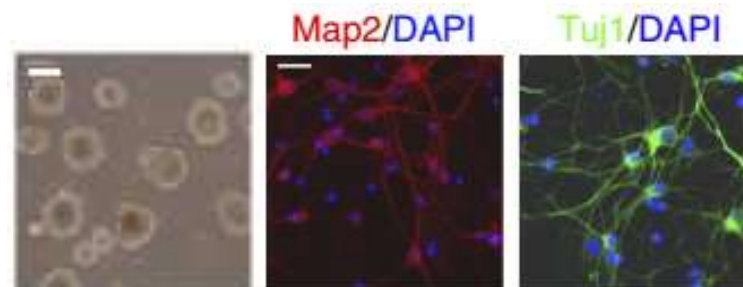
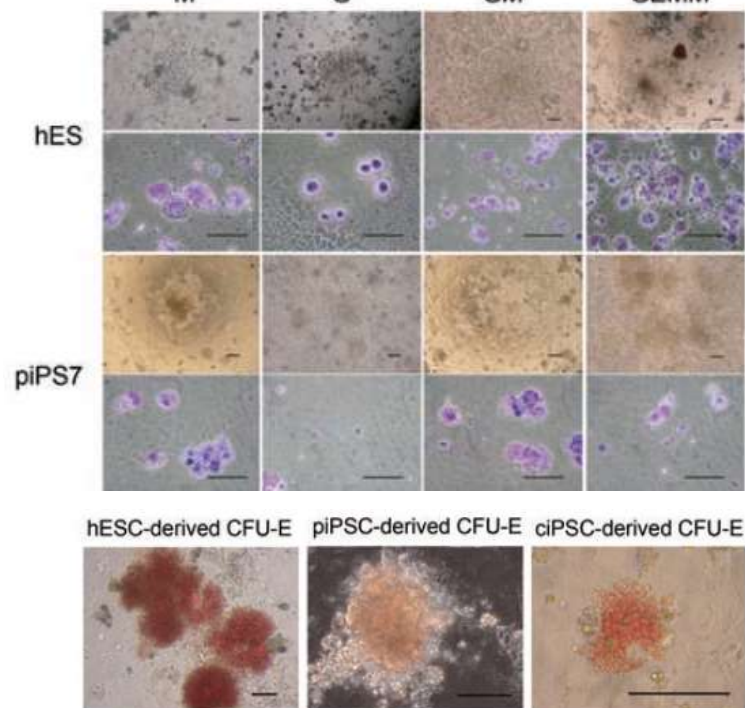
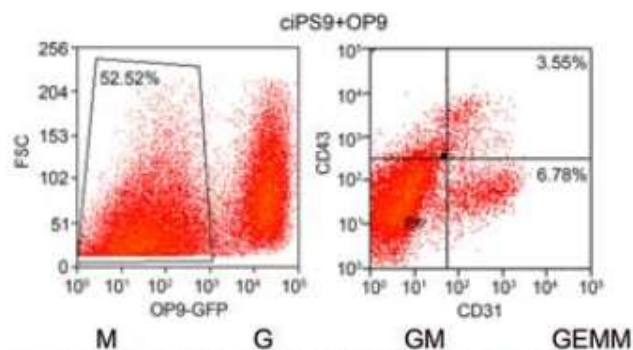
(Immunofluorescent Staining)

- 1) 固定：事先将细胞传至铺有玻璃片的12或24孔板中，每孔加入1 mL 4% 多聚甲醛（PFA，避光），室温固定20分钟或4℃固定12小时以上。
- 2) 透膜：室温，用DPBS清洗三次，每次10分钟，每孔加入1mL 0.5% TritonX-100/PBS 溶液。
- 3) 封闭：室温，用DPBS清洗三次，每次10分钟，每孔加入5% BSA/PBS，室温封闭1小时。
- 4) 一抗：用1.25% BSA将一抗稀释至合适浓度后，在每个盖玻片加100 μ L 一抗溶液，并放置在事先准备好的湿盒中，4℃孵育8-12小时。
- 5) 二抗：弃去一抗，室温DPBS洗涤三次，每次10分钟，按1:500的比例稀释二抗溶液，每个玻璃片加100 μ L，室温避光孵育1小时。
- 6) DAPI 核染：弃去二抗，室温DPBS洗三次，每次10分钟，加入 1:10000 稀释的 DAPI 溶液，室温孵育10分钟。
- 7) 封片：弃去DAPI后，用DPBS室温洗涤10分钟后，加入抗淬灭剂，并用指甲油进行封片后用共聚焦显微镜拍摄。

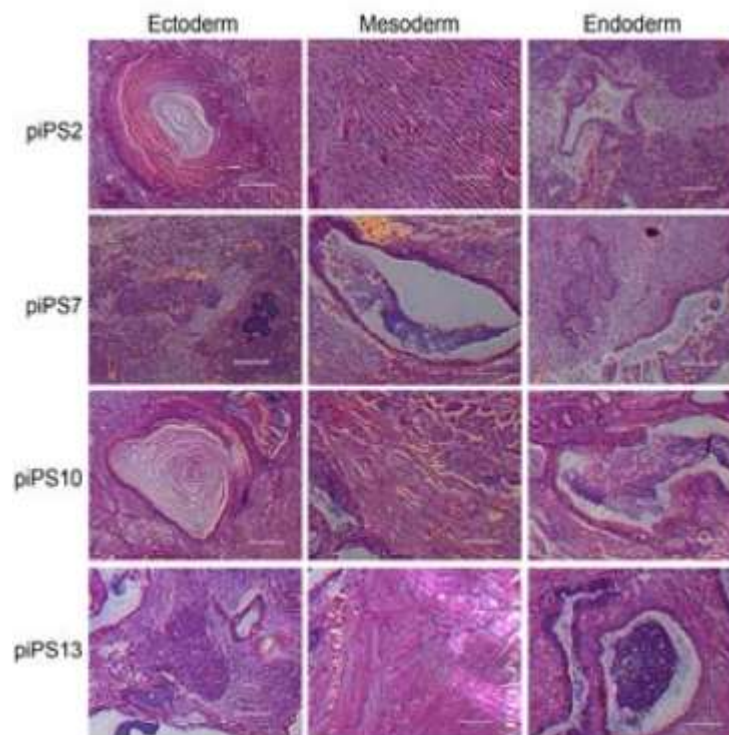
分化能力检测



分化能力检测



分化能力检测



今天实验： RT-qPCR检测多能基因表达

实时荧光定量PCR技术： PCR反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

- SYBRGreen法：

在PCR反应体系中，加入过量SYBR荧光染料，SYBR荧光染料特异性地掺入DNA双链后，发射荧光信号，而不掺入链中的SYBR染料分子不会发射任何荧光信号，从而保证荧光信号的增加与PCR产物的增加完全同步。

- TaqMan探针法：

探针完整时，报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收；PCR扩增时，Taq酶的5'-3'外切酶活性将探针酶切降解，使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离，荧光监测系统可接收到荧光信号，即每扩增一条DNA链，就有一个荧光分子形成，实现了荧光信号的累积与PCR产物的形成完全同步。

今天实验： RT-qPCR检测多能基因表达

- 细胞收样及RNA的提取

- 1) 用DPBS将洗涤细胞一次。

- 2) 用预热的0.05%胰酶37°C消化细胞3-4min（视细胞密度和细胞类型而定具体时间，至轻拍培养皿大部分细胞有脱落即可终止消化），用等体积的FM中和，用枪将细胞尽可能吹散。1000rpm离心5min。

- 3) 去除上清，向收集的细胞中加入预冷的Trizol（106细胞加入1mL左右Trizol），吹打至无明显细胞团块，并在室温放置5min。以下用量以使用1mL Trizol为标准。

- 2) 向Trizol裂解液中加入200μL氯仿，用漩涡混匀器涡旋15s，室温放置5min。

- 3) 在4°C高速离心机上12000rpm离心15min。离心结束后，混合液体将发生分层。小心吸取上层水相到新的1.5mLEP管，加入500μL异丙醇，上下颠倒混匀，室温放置10min。

- 5) 在4°C高速离心机上12000rpm离心15min。

- 6) 弃上清，用1mL 75%乙醇洗涤沉淀，在4°C高速离心机上12000rpm离心5min，小心去上清

- 7) 重复上一步操作，小心去上清。

- 8) 吸掉乙醇，空气中干燥5-10min，使乙醇挥发干净，加20-30ml DEPC水溶解。

今天实验： RT-qPCR检测多能基因表达

- 反转成cDNA

使用ABM公司的all in one反转试剂kit，体系如下：

RNA 1ug

5X Mix 2ul

ddH2O 至10ul

- PCR仪反应程序如下

25°C 10min

42°C 15min

85°C 5min

存储于-20°C

今天实验： RT-qPCR检测多能基因表达

- 荧光定量PCR反应：

按下列组份配制PCR反应体系，每个基因需要2个平行重复。

2×SYBR Buffer（Takara）	10μL
ROX Reference Dye II（Takara）	0.4μL
Primer(10mM)	0.2μL
Primer(10mM)	0.2μL
cDNA Template	0.1μL
ddH2O	9.1μL

实验中首先计算每个模板所需的反应个数，可以增加10%的比例配置不含模板和引物的总体系。

今天实验： RT-qPCR检测多能基因表达

- PCR反应程序如下。

Stage1	1X	95°C 20s
Stage2	40X	95°C 3s
		60°C 30s
Stage3 melt curve	1X	95°C 30s
		60°C 1min
		95°C(1°C/s上升)
		65°C 15s