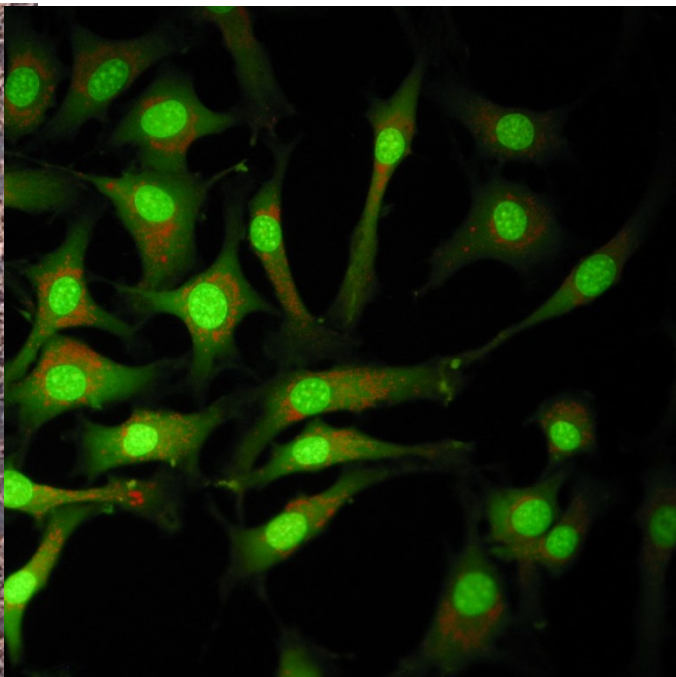
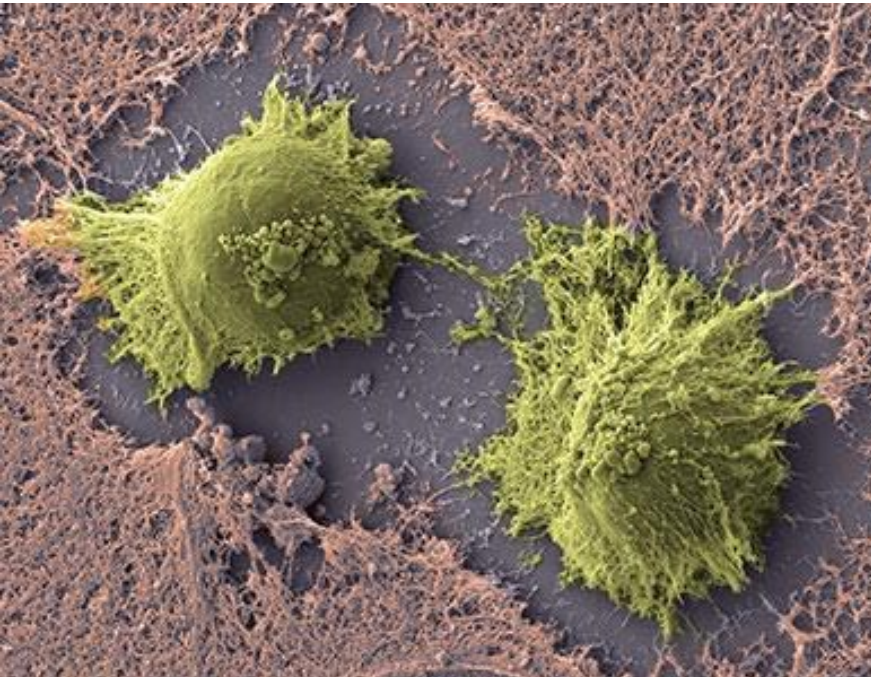


干细胞基础实验课

第三章饲养层细胞的制备及成体

小鼠成纤维细胞原代培养操作



实验报告常见问题

- 缺实验原理

- 机械抄写实验手册：

严格记录实际实验步骤（未完成的步骤需要注明）

液体配置要点、细胞培养皿的规格、培养基和胰酶体积、消化时间、培养时间.....

成纤维细胞培养基

DMEM	44mL
FBS	5mL
L-glutamine	500uL
PIS	500uL

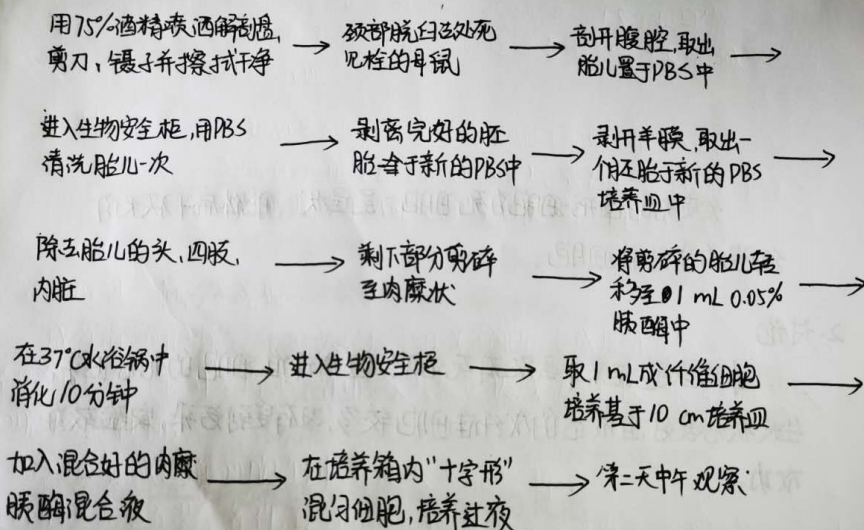
操作技巧: (1) 超净工作台内操作

(2) 先大体积

(3) DMSO

(4) 0.22um

3. 小鼠胚胎成纤维细胞的制备



操作要点和技巧: ① 单手操作, 减少培养液及细胞暴露于空气的时间;
② 手绕过开盖的培养皿操作;
③ 尽量减少开箱培养箱的次数和时间;

步骤	操作要点与技巧
前期准备	在教室听老师讲解实验流程及注意事项, 在缓冲间穿戴好实验服、口罩、实验帽、手套和鞋套, 然后进入细胞房。 实验前向生物安全柜内均匀喷洒酒精, 并擦拭台面, 提前30分钟打开紫外灯进行消毒, 打开生物安全柜和风机。
成纤维细胞培养基配置	DMEM: 44mL; FBS: 5mL; L-glutamine: 500uL; 青链霉素: 500uL。 共50mL待用, 颠倒混匀后, 用0.22um孔径的滤器过滤, 分装出3mL, 其余置于4度冰箱。
2x细胞冻存液配置	DMEM: 4mL; FBS: 4mL; DMSO: 2mL。 共10mL待用, 混匀后用0.22um孔径滤器过滤, 置于-20度冰箱。
MEF分离及初步培养	1. 将脱臼12.5-13天的母鼠颈部脱臼处死, 剖开小鼠腹腔, 取出胎儿并放置于PBS中。 2. 在生物安全柜中, 用PBS清洗胎儿一次, 从子宫中剥离完好的胚胎/胎盘于新的无菌培养皿中。 3. 将胚胎从羊膜中小心剥离, 置于新的无菌PBS培养皿中。 4. 依次除去胎儿的头、四肢、内脏, 用剪刀将剩下部分剪碎成肉糜状。 5. 将剪碎的胎儿用移液枪转移0.05%胰酶中, 1mL胰酶对应一个胎儿, 在37°C水浴锅中消化5分钟。 6. 在细胞超净台中, 用成纤维细胞培养基中和胰酶, 1-2个胚胎一个10cm培养皿。
观察实验结果	将培养皿置于恒温培养箱中, 培养第二天中午12点30分到细胞房观察细胞培养情况。

实验报告常见问题 结果与讨论

- 插入图片反映真实的实验结果
- 实验结果应记录培养时间、培养箱是否异常（是否有异味，参数：二氧化碳浓度、温度、水盘状态）、培养基颜色、澄清度，上清中的死细胞、培养皿底部的细胞密度，形态，细胞间隙是否干净。
- 讨论： 根据实验结果总结实验要点，实验失败可能的原因。

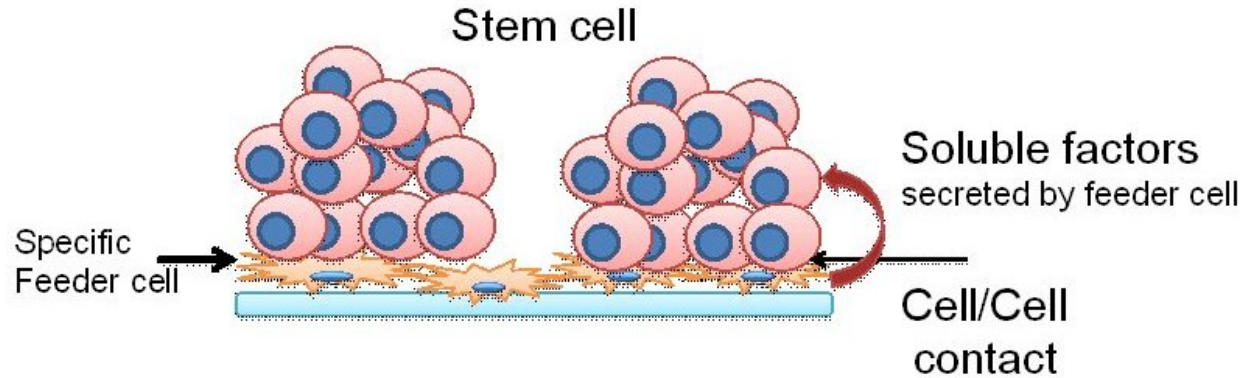
实验内容

➤ 饲养层细胞制备

➤ 饲养层细胞冻存

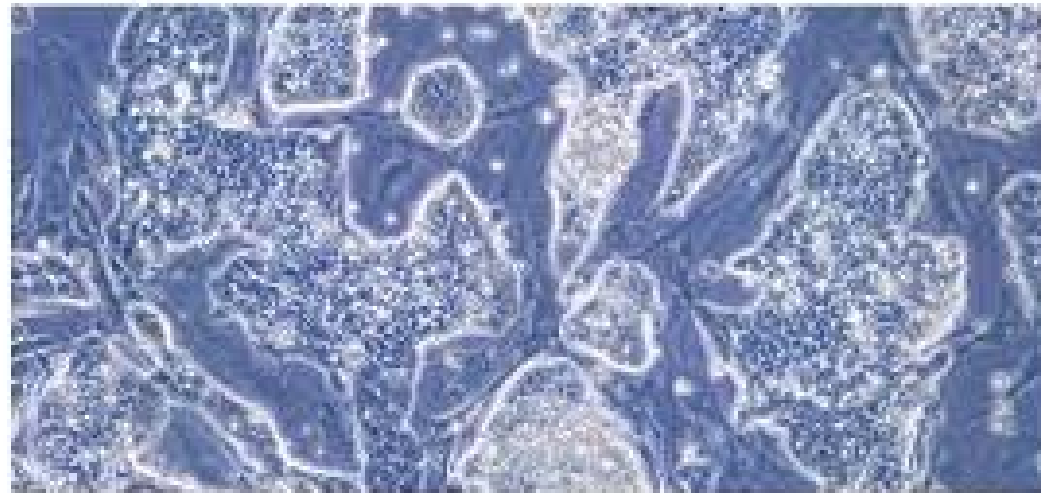
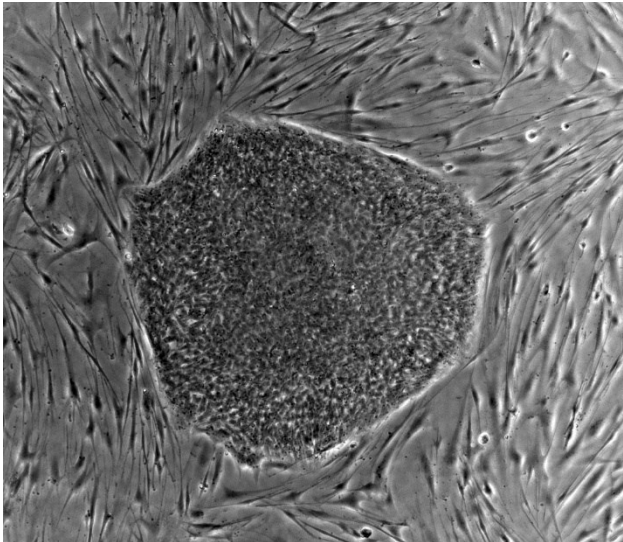
➤ 成体小鼠成纤维细胞原代培养

饲养层细胞（Feeder cells）



为干细胞提供重要的营养元素、生长因子、附着分子、细胞外基质。使胚胎干细胞在长期培养环境中维持多能性和快速增殖能力。

Embryonic stem cells in culture



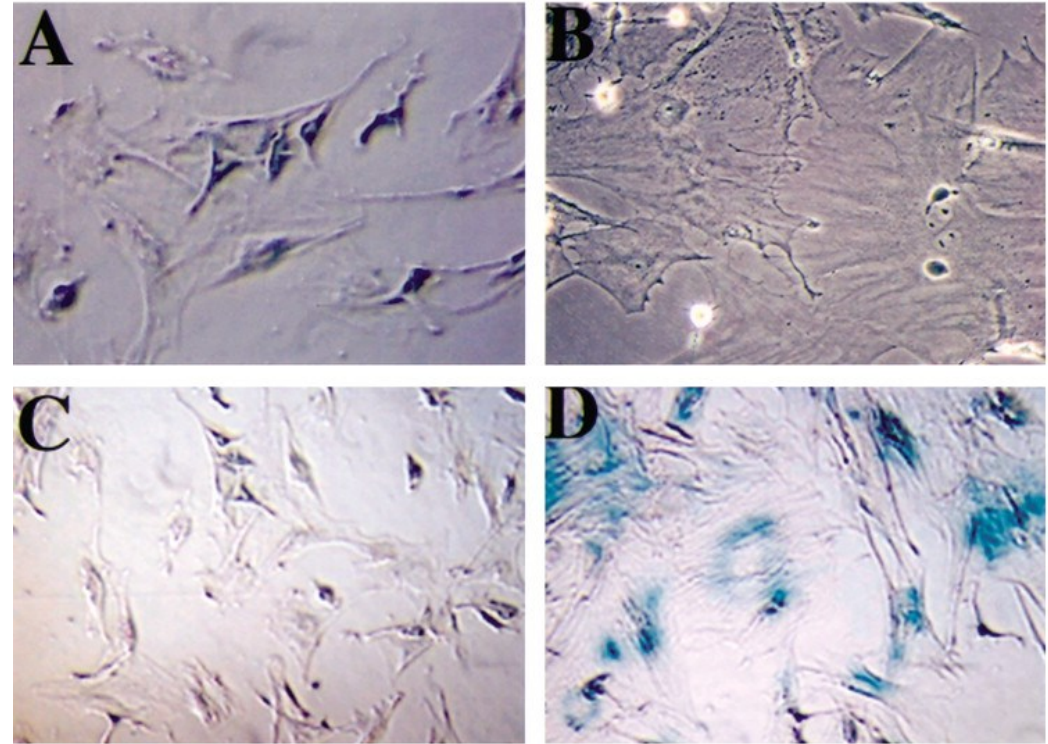
饲养层细胞的质量（quality control）

细胞形态

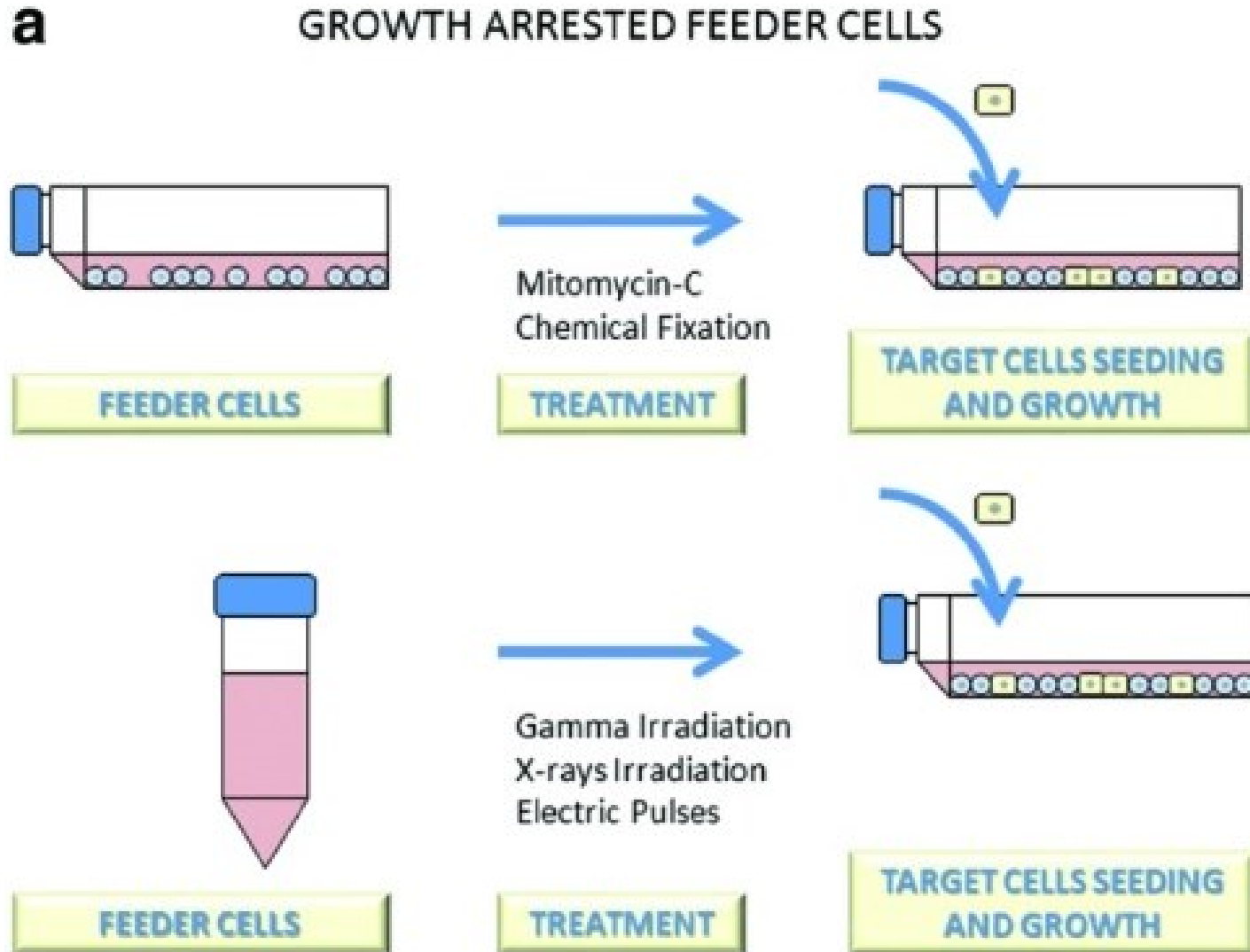


合适的细胞密度

细胞代数: P3代以前的MEF

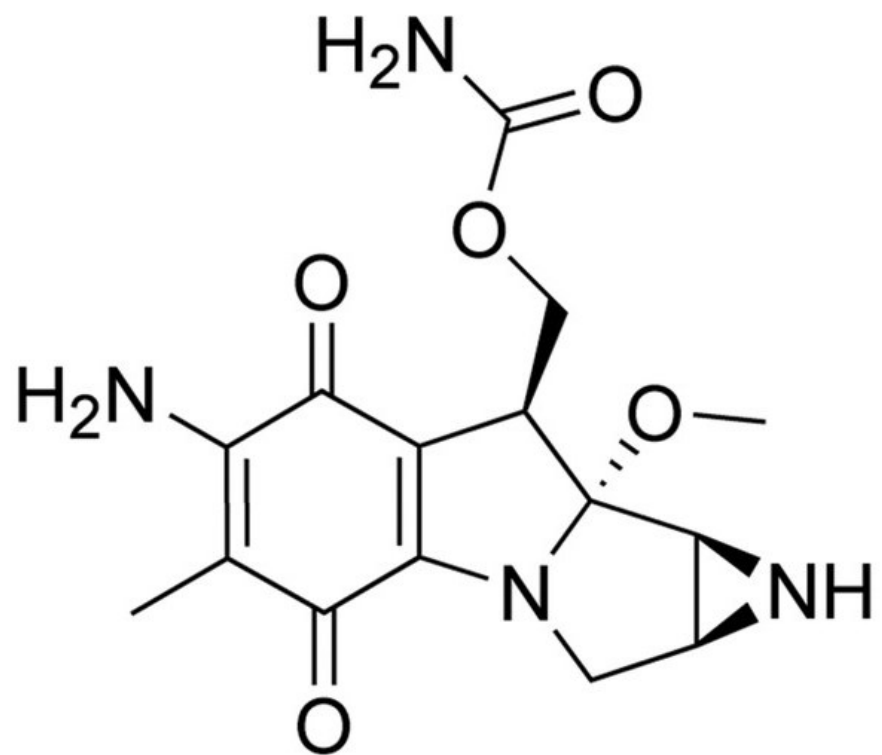


饲养层细胞制备原理：抑制MEF增殖



- 防止饲养层细胞过度增殖导致的老化，对营养成分的过度消耗；
- 维持一定的细胞密度，控制饲养层分泌因子的种类和浓度。

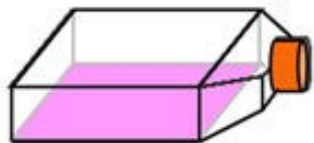
Mitomycin C, 丝裂霉素C



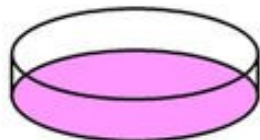
- 链霉菌中提取出来的抗生素；
- 与DNA链形成交联,抑制DNA复制；
- 使用：培养基中加入10 $\mu\text{g/mL}$ MMC处理3小时。

饲养层细胞制备流程

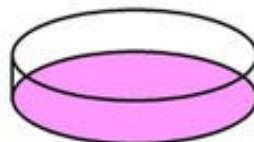
Step 1
CF-1 MEFs (P3) are
digested by 0.25%
trypsin/EDTA to single cells



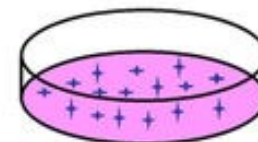
Step 2
MEFs are transferred to the
10-cm dishes and adjust to
 $8 \times 10^4 - 1.1 \times 10^5$ cells/cm²



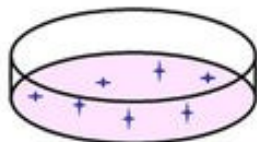
Step 3
Incubate for
2.0–3.0 h at 37°C



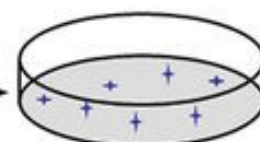
Step 4
Add MMC (10 µg/ml)
to medium and incubate
for 0.5–3.5 h at 37°C



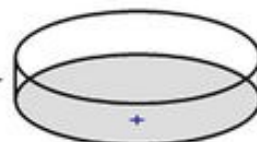
Step 5
Rapidly aspirate and discard
the medium containing MMC
and non-adherent cells



Step 6
Wash with PBS
for 5 times



Step 7
Adherent cells are
digested by 0.25%
trypsin/EDTA



Step 8
Transfer the cells
into a tube and
centrifuge



Step 9
Cryopreserve
for later use



细胞冻存

➤ 目的：将细胞保存在 -196°C （液氮），细胞生理活动停止，保持细胞特性，防止长期培养所致的细胞衰老和死亡。

➤ 低温对细胞的伤害（冰晶、脱水）：

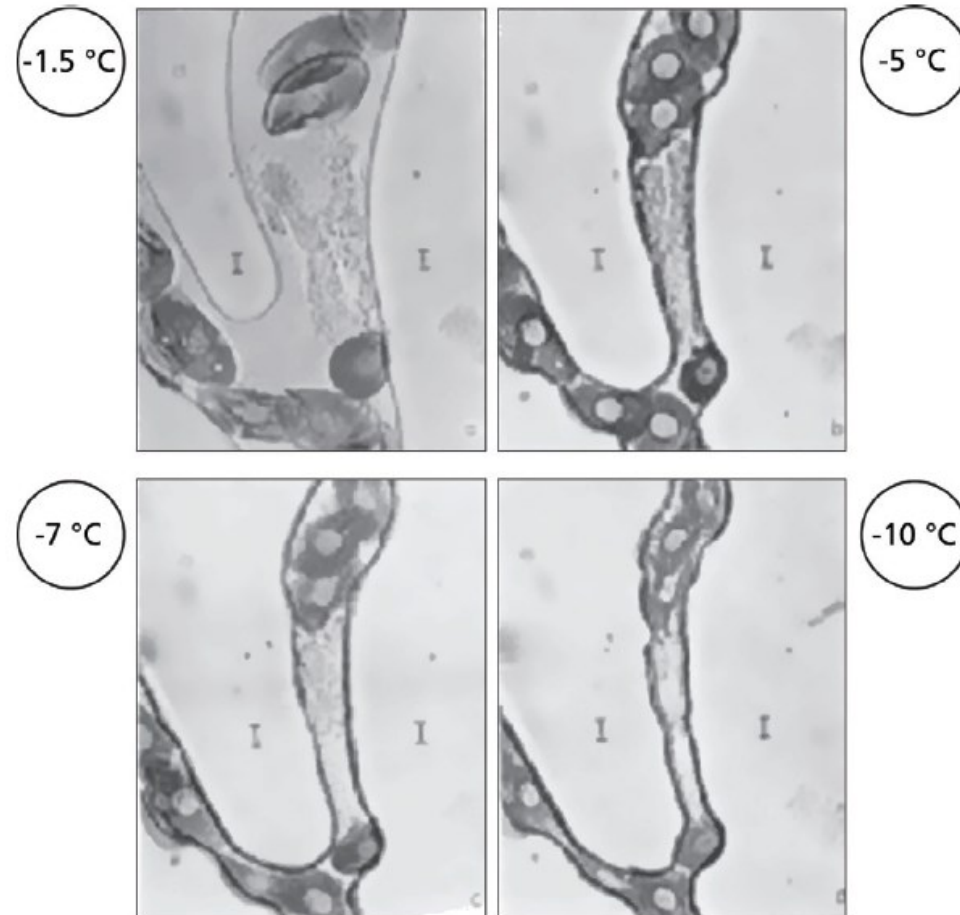
细胞内外产生的冰晶和可融部分电解质浓度增加造成细胞膜和细胞器的破坏；

胞外液体冷冻过程中，溶液的电解质浓度升高，破坏细胞膜的脂质分子。

冷冻过程对细胞造成的伤害

FIGURE 7

Frog erythrocytes in the "unfrozen fraction", which is enclosed by growing masses of ice



细胞冻存

冻存液:

可渗透型的冷冻保护剂DMSO (或者甘油), 提高细胞膜对水的通透性, 降低冻存过程中冰晶形成对细胞产生的伤害。同溶液中的水分子结合, 发生水合作用, 弱化水的结晶过程使溶液的粘性增加从而减少冰晶的形成。

血清减少冷冻过程对细胞的伤害。

合适的降温速度:

冷冻速度过慢, 细胞内水分外渗多, 细胞脱水, 体积缩小, 同时细胞内溶质浓度增。

冷冻速度过快, 细胞内水分没有足够时间外渗, 细胞内形成大冰晶。

4度半小时→ 取出细胞放置于泡沫盒→ 置于-80摄氏度8到12小时→液氮保存。

细胞保存温度

液氮温度（-196 °C）是目前最佳冷冻保存温度。在-196 °C时，细胞生命活动几乎停止，但复苏后细胞结构和功能完好。-70~-80 °C条件冷冻保存细胞，短期内对细胞活性无明显影响，但随着冻存时间延长，细胞存活率明显降低。

磷酸盐缓冲液（DPBS）



用途：常见的细胞培养的溶剂，清洗细胞和组织，pH值和渗透压与体内的生理状态相同。

成分：KCl， KH_2PO_4 ，NaCl， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
因为PBS中加入了 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 ，能与钙离子和镁离子，金属离子结合生成沉淀。无钙、镁离子。

储存：分装后置于四度。

胰酶

➤ 猪胰腺的蛋白酶



➤ 通过降解蛋白，使贴壁细胞从培养皿底部解离，或者促使组织内的细胞彼此分离。

➤ 辅助成分：EDTA（螯合游离的钙离子、镁离子，促进细胞解离），酚红。

➤ 储存：长期储存负二十度，短期储存四度，避免反复冻融。使用前需在三十七度水浴锅中预热。

Feeder细胞的消化、冻存

- 消化前观察细胞形态、密度
- 用1 mL大枪将培养皿内的FM弃掉，沿培养皿侧壁加入1 mL PBS（避免将底部细胞冲起），充分摇晃，弃去，洗三遍。
- 充分混匀胰酶，加入1 mL 37度充分预热的胰酶。
- 37度培养消化1-3分钟（具体时间根据消化状态决定，从培养箱内取出细胞，轻拍细胞皿侧壁，在显微镜下观察底部附着的细胞是否变成球状漂浮在上清内，若底部Mef形态细胞较多，放回培养箱内，延长消化时间1-2分钟）。
- 消化结束后，加入等体积的FM中和胰酶，用大枪吸取液体，充分冲刷培养皿底部，帮助底部的细胞解离。将细胞悬浮液转移到15 mL离心管内。显微镜下观察培养皿底部细胞，若细胞较多，用PBS洗一遍。

细胞冻存

- 1000 rpm 离心4分钟。
- 离心过程中标记冻存管：细胞名称（feeder），细胞规格，冻存时间，组号。
- 离心结束后，弃去上清液，加入250 μ L FM重悬细胞沉淀，缓慢加入等体积四度预冷的细胞冻存液，迅速混匀，将液体加入冻存管中。迅速将冻存管转移到四度冰箱或冰盒内。
- 四度冰箱内脱水半小时，随后将冻存管转移到冻存盒中，转移到负八十度冰箱。

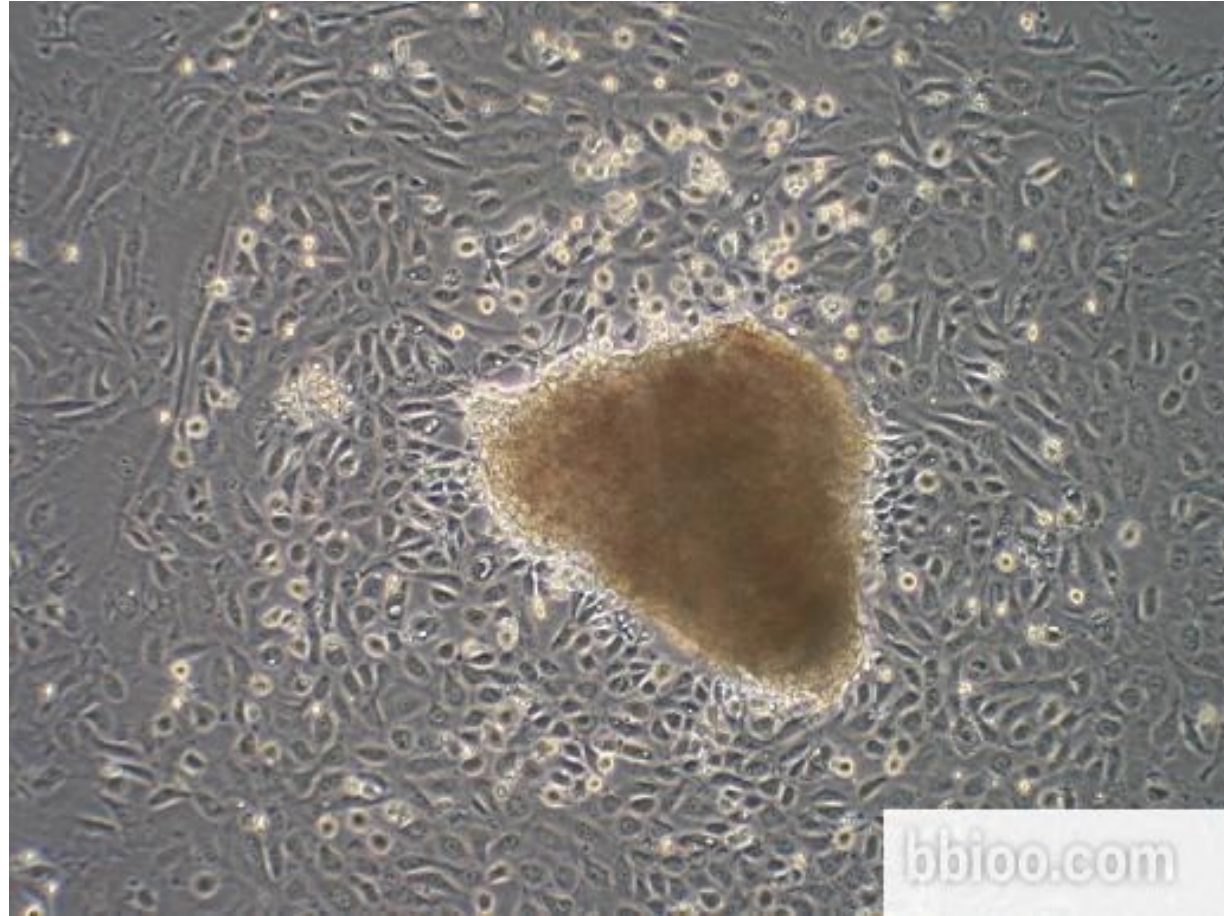
注意：冻存液中的DMSO对细胞有毒性，应缓慢加入FM中。加入后应操作迅速，尽快转移到低温环境中。

成纤维细胞

- 结缔组织主要组成细胞，合成胞外基质和胶原蛋白，在伤口愈合过程中发挥重要作用。
- 细胞星状或者纺锤状，胞体扁平狭长，细胞核呈卵圆形。



成体小鼠成纤维细胞原代培养 组织块贴壁法

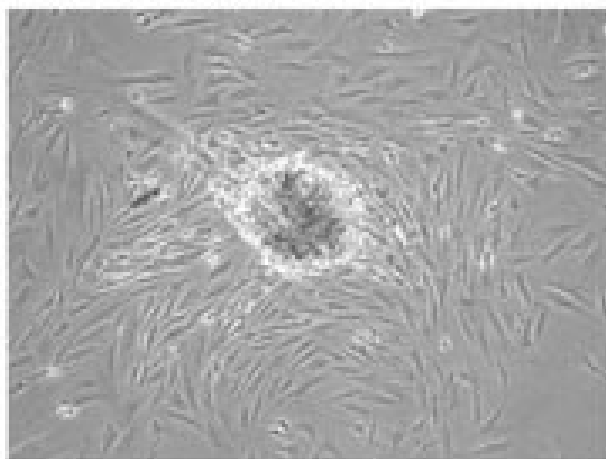


A

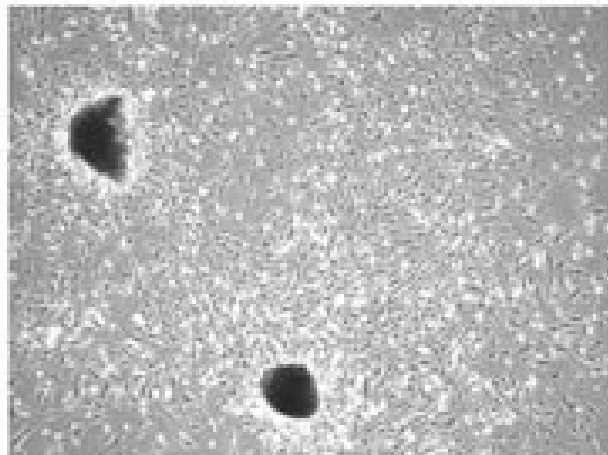
Mouse skin, 4x



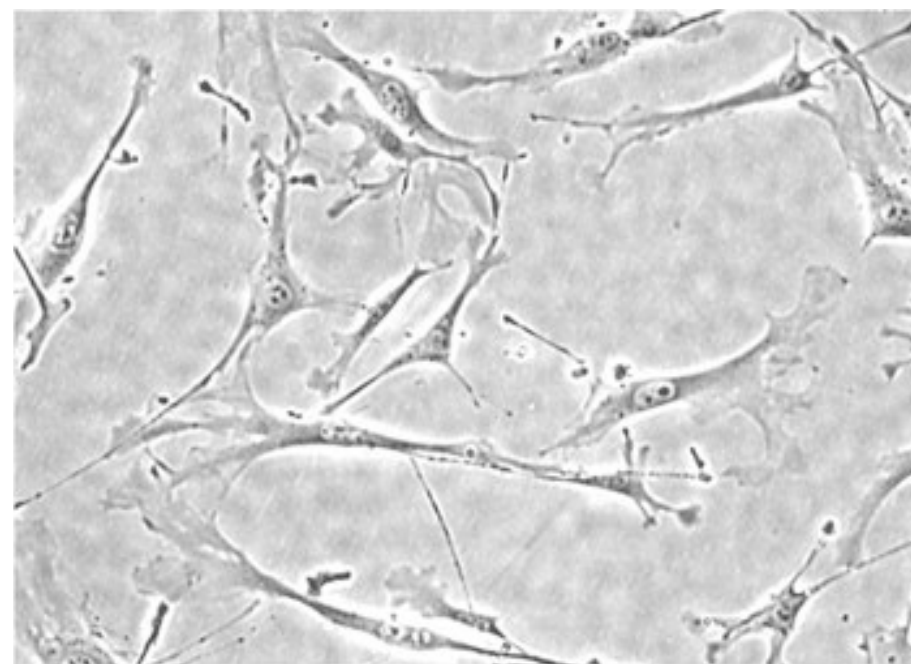
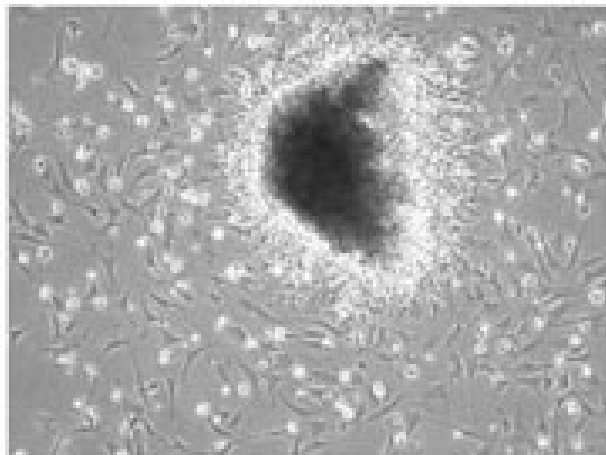
Mouse skin, 10x

**B**

Mouse lung, 4x



Mouse lung, 10x



实验流程（准备室）

- 准备：白瓷盘、手术器械均匀喷洒75%酒精

小鼠断颈处死 ——> 剪下耳朵、尾巴置于75%酒精中浸泡十分钟。

小鼠腹腔均匀喷洒75%酒精 ——> 剪开腹腔，获取内脏，置于PBS中。

颈椎脱臼法处死小鼠

- 将小鼠置于空鼠笼的笼盖上，使其前爪抓住钢丝条，抓住鼠尾迅速水平后拉，另一只手（或手持剪刀）迅速并紧紧下压住头骨后的颈部，断颈处死。



图 4.3 快速并人道地利用颈椎脱臼法处死小鼠

实验流程（细胞间）

- 血清孵育培养皿底部：向培养皿中加入可均匀覆盖皿底的血清，置于37度培养箱待用。
- 于生物安全柜内，用PBS清洗鼠尾和鼠耳三次以上。
- 将组织块剪碎，均匀铺在皿底。将培养皿置于37度培养箱2-4小时。
- 在生物安全柜内加入含有双抗的FM（**F**ibroblast **M**edium），沿培养皿侧壁缓缓加入培养基。

成体小鼠成纤维细胞原代培养

- 组织的内表面朝下接触细胞培养皿底面。
- 组织块越小，爬出细胞越多。
- 缩短体外操作时间，降低机械损伤对细胞产生的伤害。
- 避免培养基直接冲刷、晃动引起组织块从培养皿底部脱落。

- 实验结束后，请将使用过的枪头盒和手术器械带出细胞间，使用过的手术器械用自来水仔细洗干净，不得有小鼠组织残留。清洗后的手术器械放回饭盒连同枪头盒放置在细胞间门口的小车上。
- 废液缸倒掉废液，自来水冲洗后，内外喷**75%**酒精，纸巾擦干后放回细胞间超净台。超净台内使用的物品归位，枪调至最大量程挂回架子上。

每组一皿MEF，加入1 mL新鲜成纤维细胞培养基，加入终浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mmc（100*母液）。皿盖上标记组名，置于37度培养箱，计时。（不做）



水浴锅预热培养基、胰酶、PBS；1 mL冻存液置于4度冰箱融化。



分装血清，每组 2 mL。向35 mm 细胞培养皿中加入1 mL血清，置于37度培养箱。



MMC处理结束后，1 mL PBS洗去残留的MMC（2遍），细胞消化，冻存。