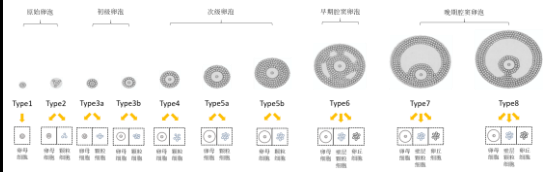


干细胞基础实验 小鼠胚胎干细胞培养(1)

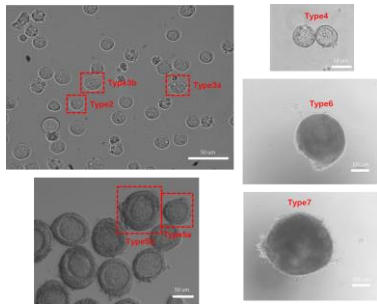
陈嘉瑜
2021年9月

1. 背景 小鼠卵母细胞发育



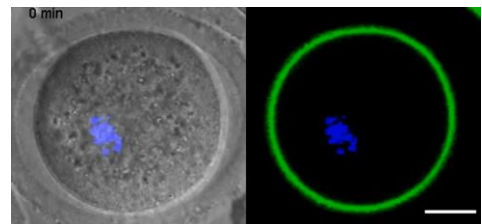
2

1. 背景 小鼠卵母细胞发育



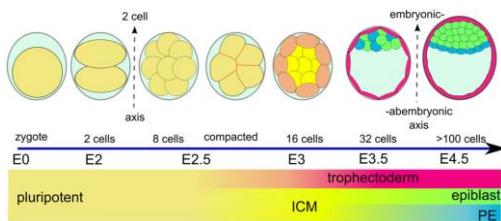
3

1. 背景 小鼠卵母细胞发育-减数分裂



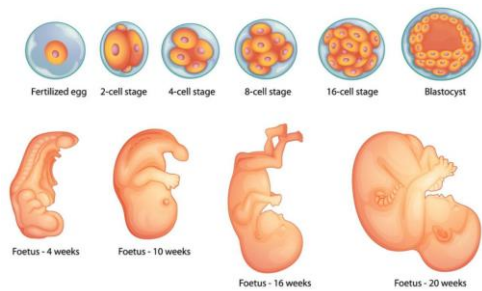
4

1. 背景 小鼠早期胚胎发育



5

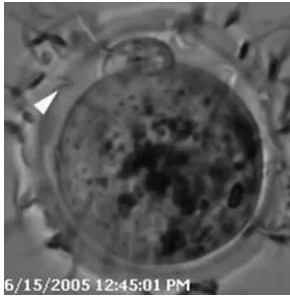
1. 背景 人胚胎发育



6

1. 背景

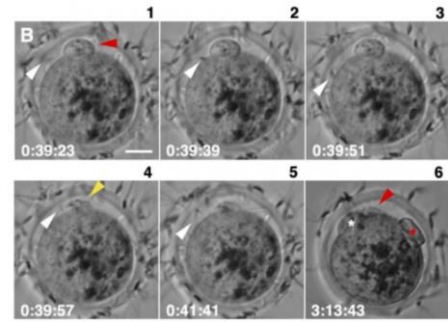
早期胚胎发育-受精



7

1. 背景

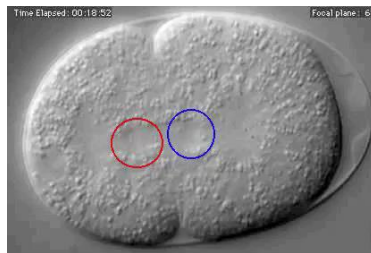
早期胚胎发育-受精



8

1. 背景

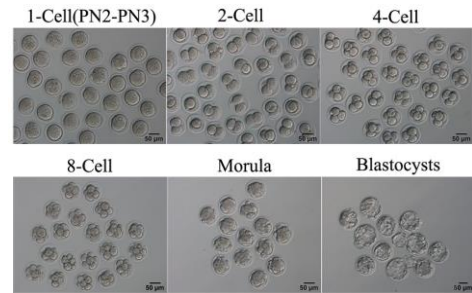
早期胚胎发育-卵裂



9

1. 背景

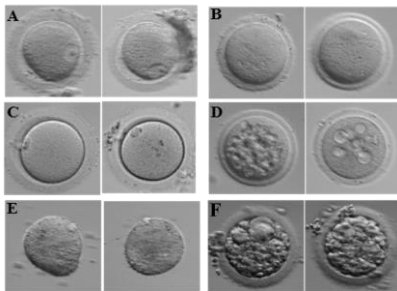
早期胚胎发育-卵裂



10

1. 背景

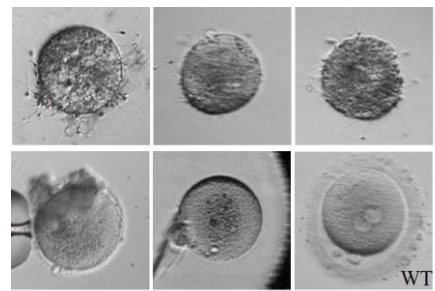
胚胎异常引起不孕不育



11

1. 背景

胚胎异常引起不孕不育



12

2. 小鼠胚胎干细胞建系

小鼠胚胎干细胞建系流程及培养基

- 按1:1雌雄比例将小鼠合笼，次日早上发现有阴道栓的雌鼠。将见栓雌鼠取出，从输卵管中获取E0.5天的受精卵，并培养于G1胚胎培养体系中，放置于37℃，5% CO₂培养箱中继续培养。
- 配置小鼠胚胎干细胞建系培养液(derivation ESM)

DMEM	39,995 ml
FBS	7.5 mL
L-Glutamine (100×)	500μL
NEAA (100×)	500 μL
Nucleosides (100×)	500 μL
2-mercaptoethanol (100×)	500 μL 本次不添加
Pen/Strep (100×)	500 μL
LIF (10000×)	5 μL
Total	50 mL

13

2. 小鼠胚胎干细胞建系

小鼠胚胎干细胞建系流程及培养基

- 胎培养至E2.5天，此时胚胎发育至8-细胞或桑椹胚时期。在96孔平底细胞培养板中准备饲养层细胞，放置于37℃，5%CO₂培养箱中培养。

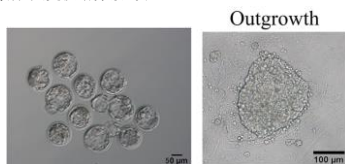


14

2. 小鼠胚胎干细胞建系

小鼠胚胎干细胞建系流程及培养基

- 胚胎培养至E3.5天，此时胚胎发育至囊胚时期。在无菌条件下，去除囊胚透明带。将囊胚种到预先铺有feeder，并含有小鼠胚胎干细胞建系培养液的培养板中。每个孔放置1枚囊胚。培养板置于37℃，5% CO₂培养箱中，培养3天。这3天中，不要移动或观察细胞。
- 3天后，细胞更换新鲜建系培养液。观察细胞状态。此后，每隔1天更换培养液1次。

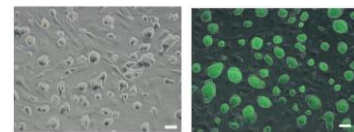


15

2. 小鼠胚胎干细胞建系

小鼠胚胎干细胞建系流程及培养基

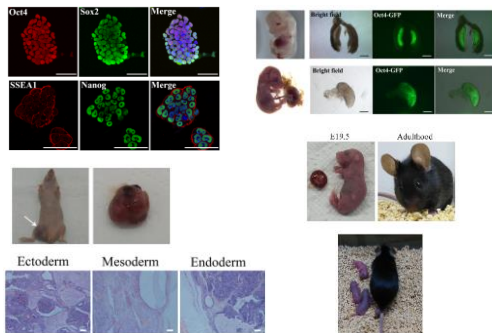
- 7天后，根据细胞克隆大小和状态，采用0.05%胰酶对细胞进行消化，将细胞从96孔板中，传至24孔板中。此时，24孔板中已经提前铺有feeder，并含有预热的建系培养液。培养板置于37℃，5% CO₂培养箱中进行培养。
- 每天更换培养液1次，根据细胞密度及状态，逐渐将细胞扩增传代至35mm细胞培养皿中。
- 冻存细胞。
- 对细胞进行核型分析，标志基因及RNA检测。
- 进行实验记录，统计胚胎发育率，建系效率等数据。对各时期细胞形态进行拍照和记录。



16

2. 小鼠胚胎干细胞建系

小鼠胚胎干细胞的验证与分化检测



17

3. 本次课程操作

(1) 配置小鼠胚胎干细胞建培养液(ESM)

Total	50 mL
DMEM	40.5 mL
干细胞FBS	7.5 mL
L-Glutamine (100×)	500 μL
NEAA (100×)	500 μL
Nucleosides (100×)	500 μL
Pen/Strep (100×)	500 μL
LIF (10000×)	5 μL

18

3. 本次课程操作

(2) 复苏冻存的feeder细胞

- 在15 ml离心管中加入3 ml FM;
- 从冰箱中取出保存的feeder细胞, 快速放入37°C水浴锅中, 摇晃至细胞大部分融化;
- 向冻存管加入500ul FM, 将冻存管中的feeder细胞移入已预先加有3ml FM的离心管中, 混合;
- 1000 rpm离心5分钟;
- 离心完毕, 弃去上清, 加入2 ml FM重悬后, 接种于培养皿中;
- 24h后观察细胞状态。

19

3. 本次课程操作

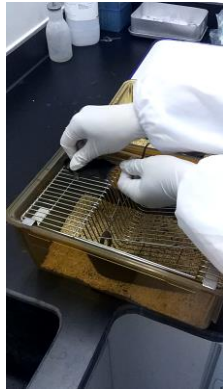
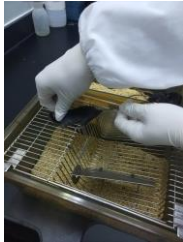
(3) 获取小鼠卵母细胞

- 颈椎脱臼, 小鼠牺牲①酒精消毒, 撕开皮肤;
- 从两侧背部暴露子宫、卵巢和输卵管;
- 用剪刀、镊子配合取出完整输卵管, 放置于含有500ul 预热的PBS-BSA 培养皿中;
- 在体式显微镜下分离出卵母细胞;
- 用滴管将卵移动入100ul的消化液体中;
- 37度消化5 min;
- 在PBS-BSA中清洗胚胎, 拍照记录;

20

3. 本次课程操作

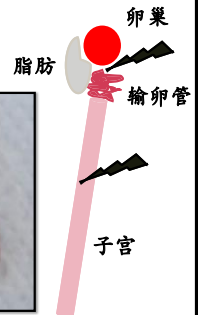
小鼠颈椎脱臼



21

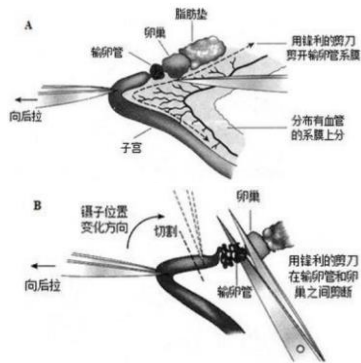
3. 本次课程操作

酒精喷洒背部, 撕开皮肤
取出输卵管及部分子宫



22

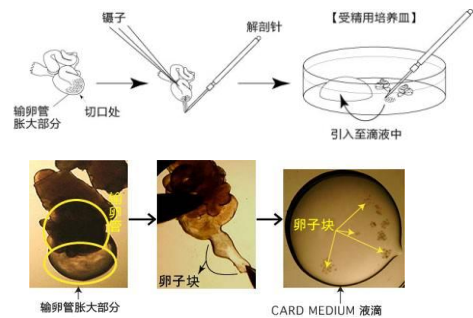
3. 本次课程操作



23

3. 本次课程操作

卵母细胞获取及消化



24

