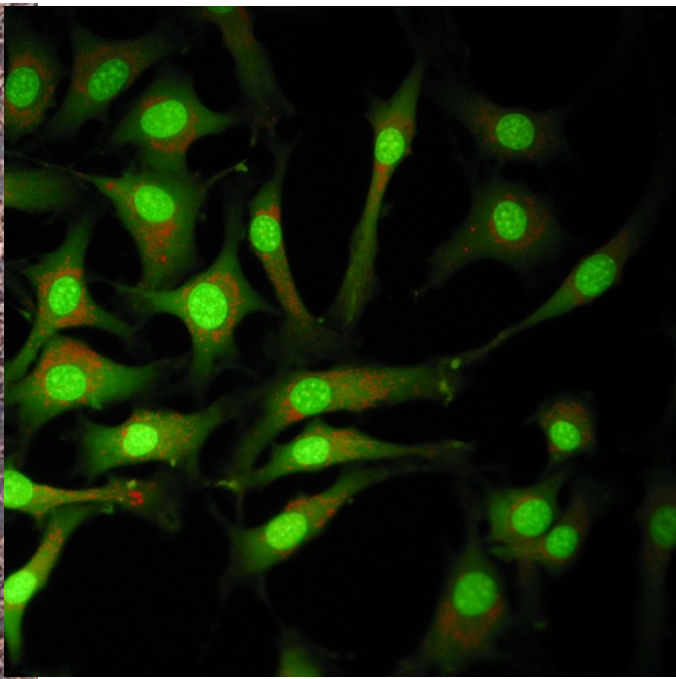
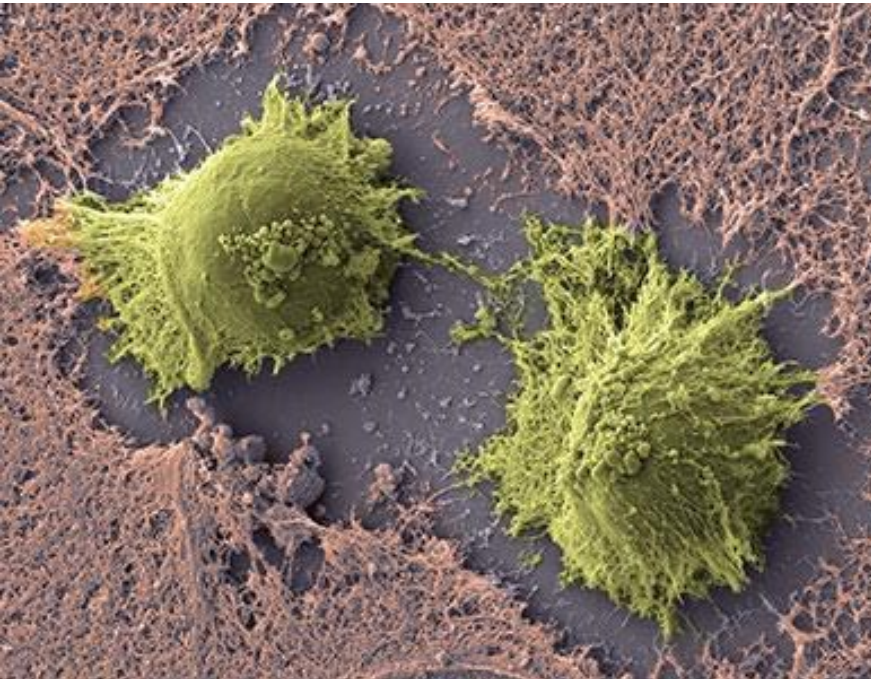


干细胞基础实验课

第一章小鼠胚胎成纤维细胞制作



分组

共十个超净台：5组2人组，5组单人组

考核方式

- 课堂表现（出勤率，实验操作）：40%
- 实验结果：20%
- 实验报告：40%（电子版）
独立完成，严谨认真记录实验结果，重视实验技巧的总结。

实验报告格式说明

- 实验目的
- 实验器材与试剂
- 实验原理
- 实验步骤
 - 图表、流程图，总结操作要点和技巧
- 实验结果与讨论
 - 图，严谨记录实验结果（包括失败结果）。
- 思考题
 - 切勿抄袭！

格式规范

0.05%trypsin、44ML、 5ml、 500ul、 0.22 孔径的滤器

格式规范

缺单位：

“0.22 孔径的滤器”， 0.22 μm 孔径的滤器

数字与单位之前空格，升的单位为大写

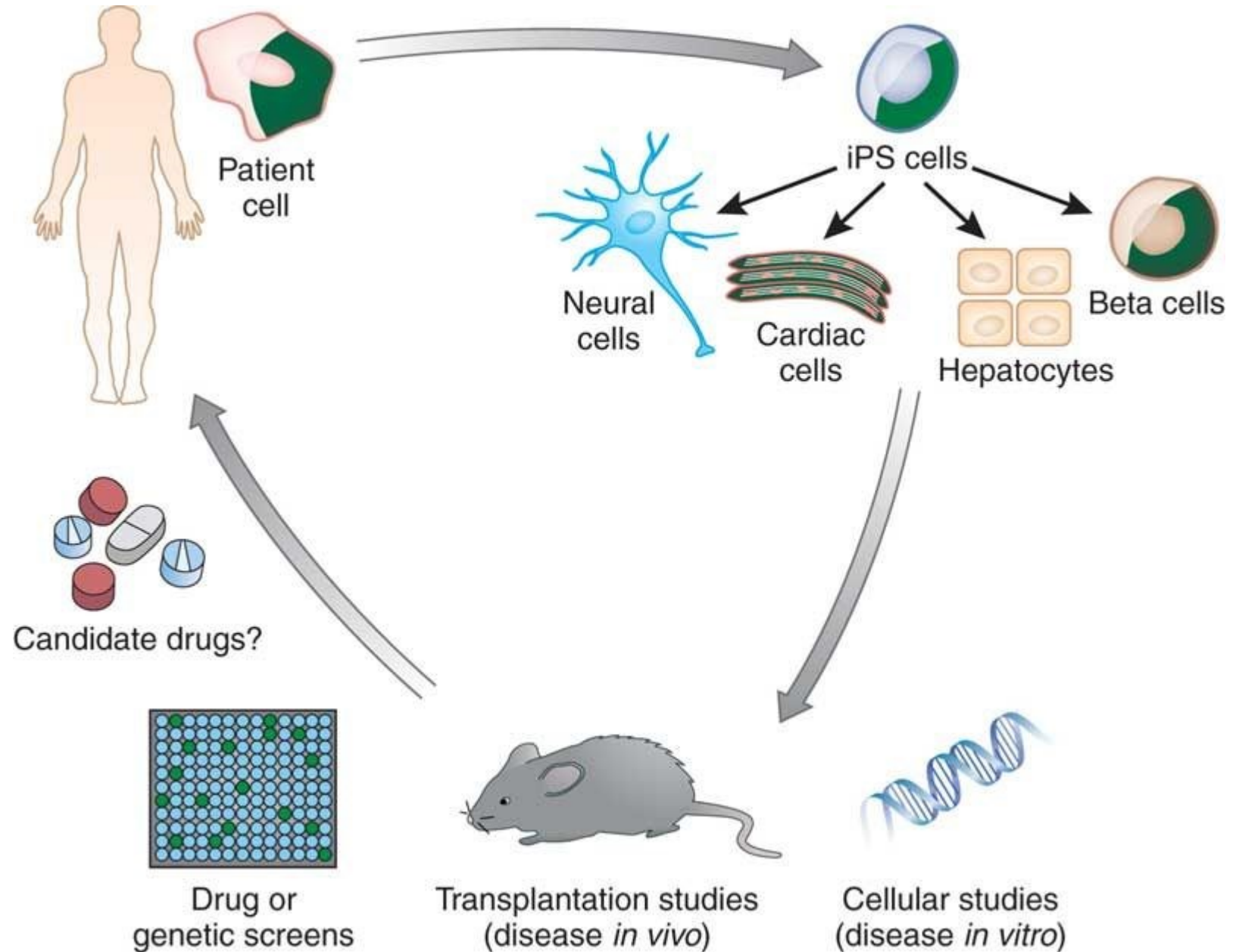
0.05% trypsin、44 mL、5 mL、500 μL

实验步骤:

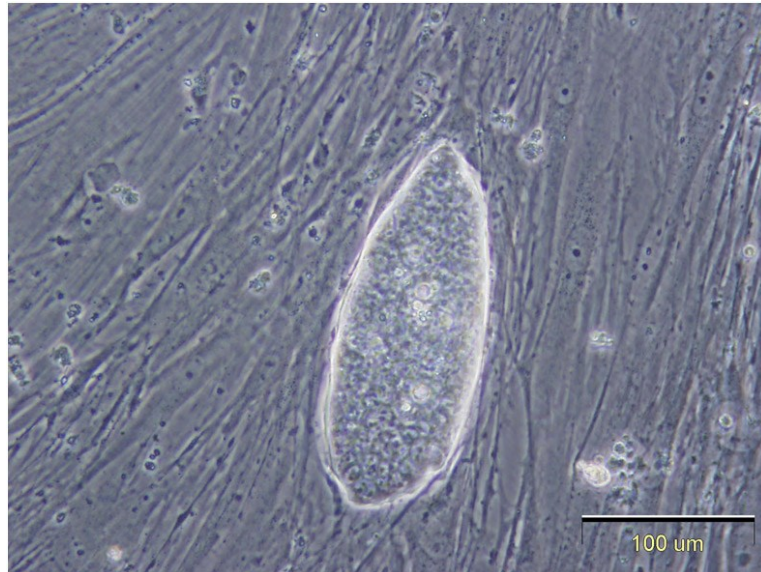
	实验步骤	要点技巧
实验准备	在缓冲间穿戴好实验服、口罩、帽子、手套、脚套 实验前,用酒精擦拭生物安全柜台面,关闭柜门,紫外辐照30分钟后,打开生物安全柜门和风机。	进入安全柜的物品要经酒精擦拭才能放入柜中。
配制培养基	成纤维细胞培养基配制 / 50 mL DMEM: 44 mL FBS: 500 μ L L-glutamine: 100 μ L 双抗: 500 μ L 细胞冻存液 / 10 mL DMEM: 4 mL FBS: 4 mL DMSO: 2 mL	1. 先加体积大的成分。 2. 注意添加顺序。 3. 混匀后, 0.22 μ m 过滤。 DMSO与水混合会大量放热, DMSO与DMEM混合后应静置待温度下降加入血清。 混匀后用0.22 μ m过滤器。
小鼠胚胎成纤维细胞制作	取交配后12.5-13.5天的母鼠引颈处死。 剖开小鼠腹腔, 取出胎儿放置在PBS培养皿中。 在安全柜中, 用PBS清洗胎儿一次, 从子宫中剥离胎儿。 将胚胎置于无菌PBS培养皿中; 将胚胎从羊膜中小心剥离, 置于新的PBS中。 依次除去胎儿的头、四肢、尾巴、内脏, 用剪刀将剩下的部分剪碎至肉糜状。 将剪碎的胎儿用移液枪吸取至0.25%胰酶中 1 mL 胰酶对应一个胎儿, 在37°C水浴箱消化10 min 在细胞超净台中, 用成纤维细胞培养基中和胰酶, 转移至3-5 cm培养皿中。	1. 生物安全柜中操作时, 手不要越过打开的培养皿上方。 2. “单手开盖”, 减少培养液及细胞暴露时间。 3. 剪碎胎儿所用时间应合理安排, 不宜过长或过短。 4. 培养皿或培养瓶打开时如果有液桥形成, 要及时用真空泵吸开, 防止污染。 5. 减少开培养箱的次数。
实验结果观察	第二天中午12点倒细胞培养液到细胞观察观察细胞形态、密度、是否污染。	

干细胞培养的应用

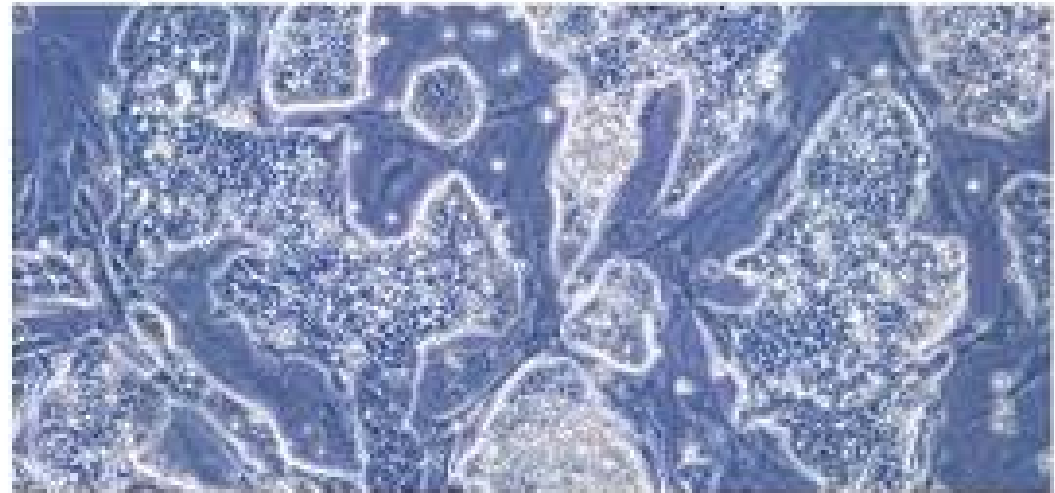
- 作为发育、疾病发生等过程的体外研究模型。
- 药物筛选。
- 再生医疗。
器官修复、组织再生



小鼠胚胎干细胞



Embryonic stem cells in culture



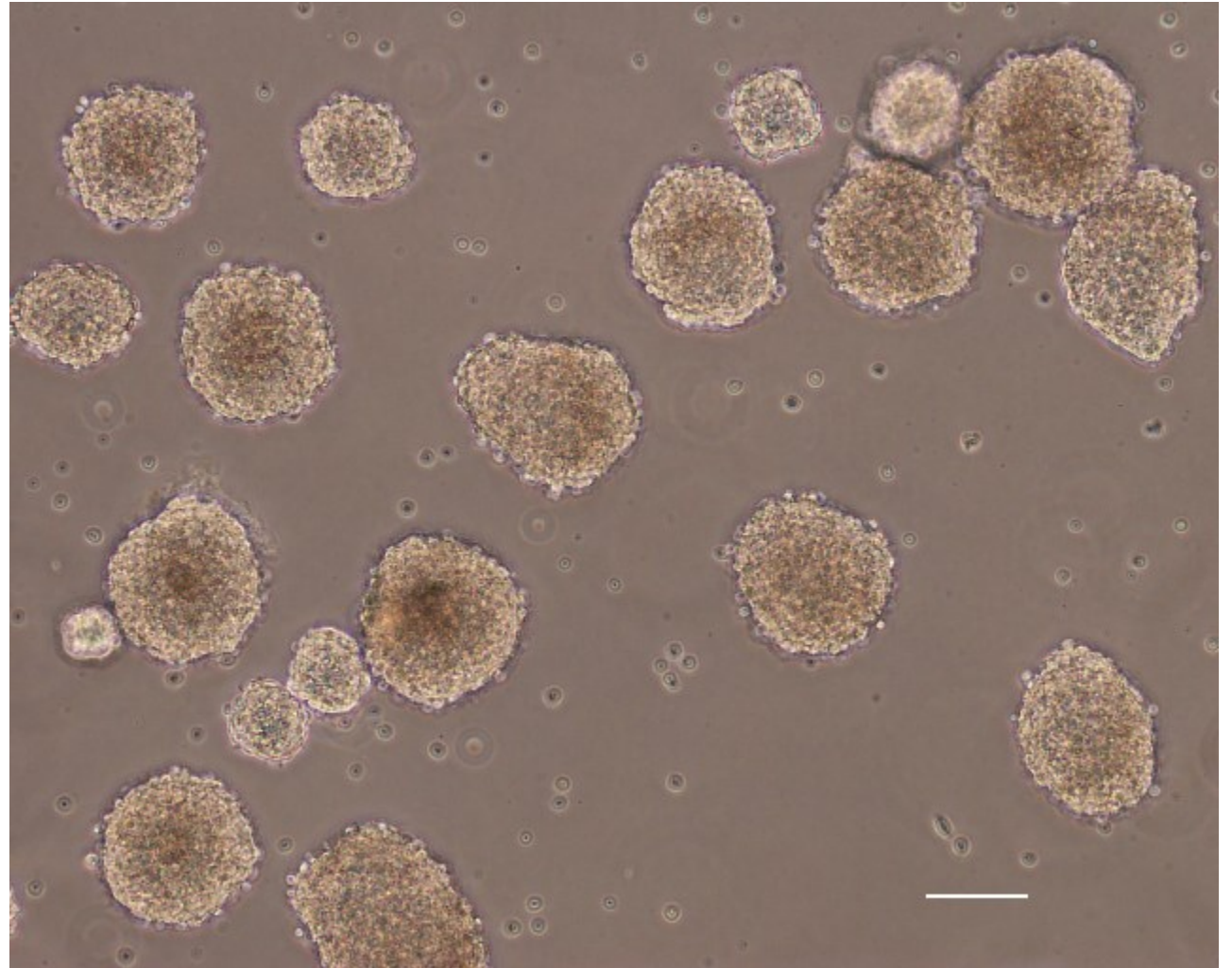
from A Nikitin, Cornell University; www.people.cornell.edu/pages/ant56/newswebb.html

神经干细胞

多向分化潜能:

- 神经元
- 星形胶质细胞
- 少突神经胶质细胞

来源: 大脑皮层原代培养
ES、iPS分化



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。



干细胞培养

概念：使干细胞在最接近体内环境的人造环境中生长，并保持接近体内的生理状态。

人造环境： 温度、氧气、二氧化碳含量、湿度、PH值

培养仪器

培养基

实验操作技巧

干细胞可来源于原代培养的细胞，或者来源于已经建立的细胞系或者细胞株。

干细胞培养特点：

对环境变化敏感脆弱（微生物侵染、温度、湿度、气体变化）， 需要无菌培养环境、复杂的培养条件以维持干细胞的特性。

万级层流细胞培养室

- 采用空气洁净技术控制空气中的微生物污染，提供细胞培养间适宜的温度、湿度。

洁净室的分类标准

洁净度级别	尘粒最大允许数/立方米		尘粒最大允许数	
	≥0.5um	≥5um	浮游菌/立方	沉降菌/皿
100	3,500	0	5	1
10,000	350,000	2,000	100	3
100,000	3,500,000	20,000	500	10
300,000	10,500,000	60,000	NA	15

空气等级划分	典型应用环境
1 级/10 级	电脑芯片生产设施
100 级（等同于国际 ISO CLASS 5 级）	制药生产/填装操作，医药工业的无菌制造间；植入体内物品的制造间；外科手术，移植手术室，对细菌感染特别敏感的病人的隔离治疗室；生物安全柜，Forma 培养箱
1000 级	高质量光学产品的生产、装配 飞机陀螺仪、装配高质量卫星轴承等
10,000 级及更优	牙刷硬毛制造、飞机组件制造，GMP 厂房、液压设备或气压设备的装配、精细食品饮料工业、医药工业
100,000 级及以下	药品准备区域，诸如IV级药品准备区（Chandler, S. W., 1993）以及医院、医院室内场所，食品饮料生产、医药工业、或一些高档写字楼和机场

每立方米空气中的最大允许直径大于0.5微米粒子数来确定其空气洁净度等级

万级层流细胞培养室

人员和物品出入

风淋室

清除人体和物品表面附着的尘埃
防止非洁净空气的侵入



传递窗

洁净区与非洁净区间小件物品的传递，以减少细胞培养室的开门次数，降低对洁净区的污染。



生物安全柜



安全柜作用是提供无尘无菌的环境，并防止实验对象（细菌、病毒）外溢，保障操作人员安全、细胞培养室洁净环境。

无菌：空气过滤系统、紫外灯照射；定期清洗过滤网。

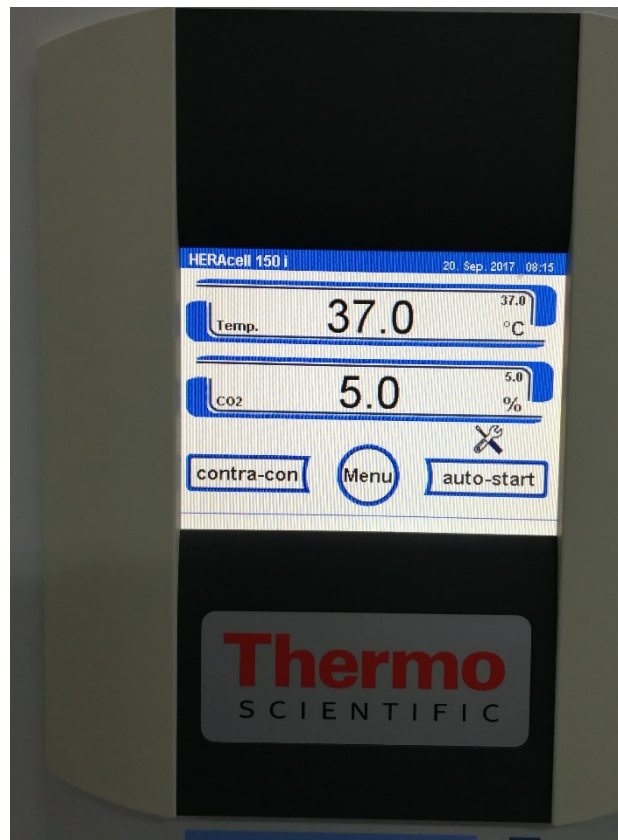
二氧化碳细胞培养箱

为细胞生长提供稳定的温度（体内温度）、二氧化碳水平（5%）、湿度（95%）。需要定期添加灭菌水（底部水盘），定期高温灭菌。

过滤系统

加热系统

二氧化碳控制系统



内部环境的评判：气味、水盘洁净度、培养液的颜色浑浊度。

细胞污染

➤ 化学污染

➤ 生物类污染（细胞形态变化、培养基浑浊、培养基变色）

微生物：酵母、细菌、真菌、支原体、病毒。其中支原体和病毒污染肉眼不易观察，较为隐蔽。

检测方法：观察（细胞形态变化、培养基浑浊、培养基变色）。

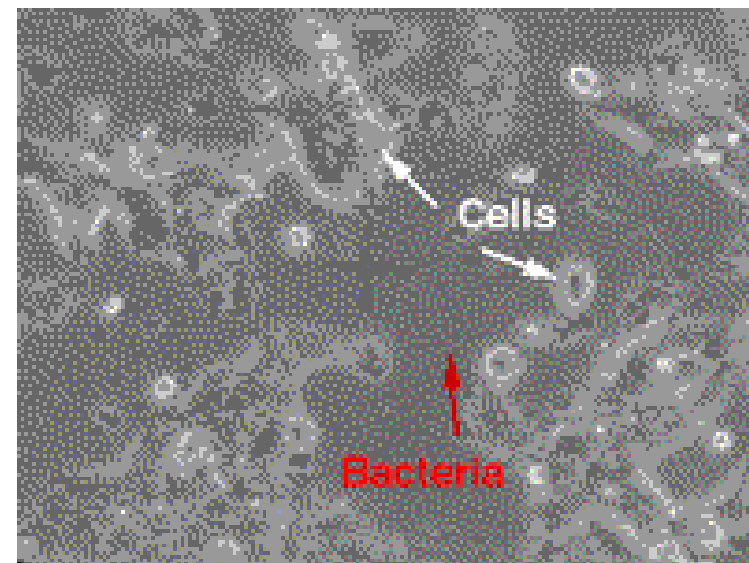
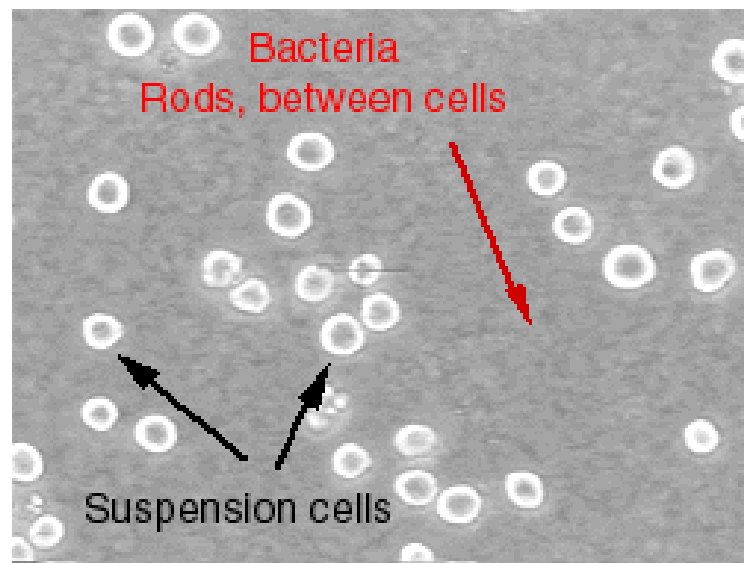
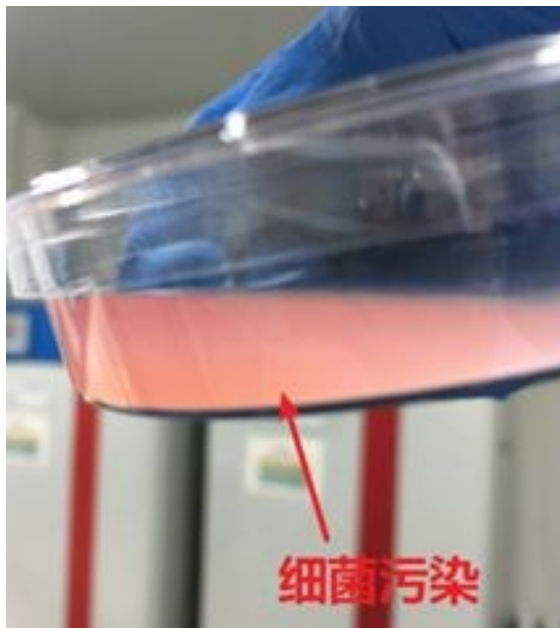
支原体污染可收取超过24小时的培养基，95度加热后作PCR检测。**应定期进行支原体污染检测！**

➤ 细胞交叉污染：

培养基观察：颜色和澄清度



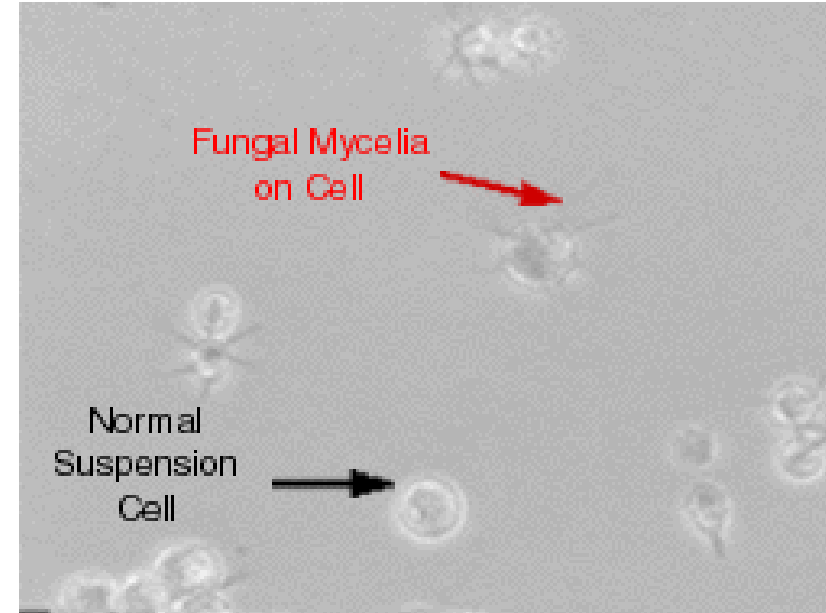
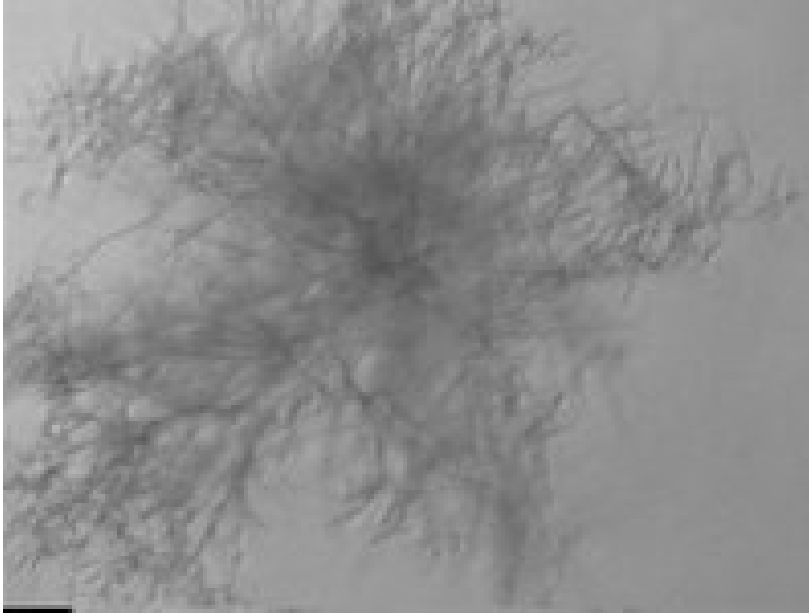
细菌污染



培养基浑浊；
显微镜下观察，培养基中存在大量自主运动的、大小一致的细沙样黑点。

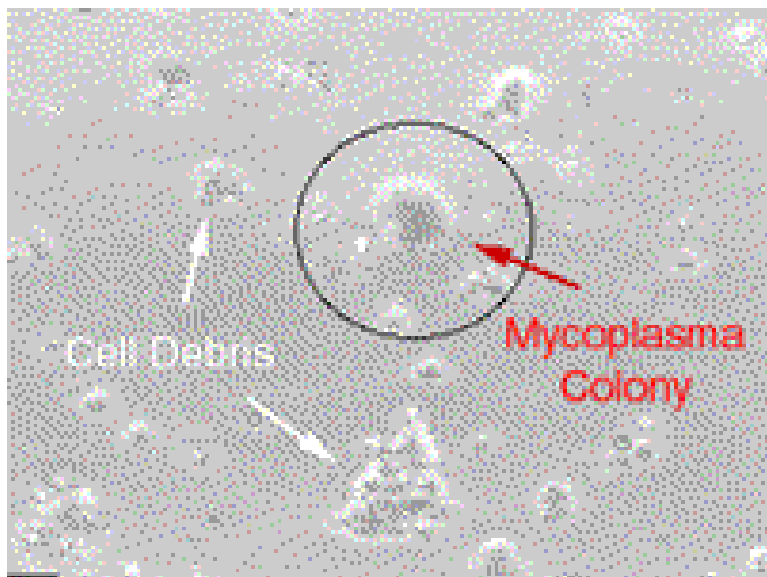
真菌污染

菌丝



培液不变浑浊但是会变黄，一般肉眼可见培养液中有团块的霉菌菌落，镜下呈细丝竹节管状，有菌丝结构。霉菌梅雨季节多见，一般霉菌污染应及时扔掉污染细胞，彻底清洁培养箱

支原体污染



特殊细胞培养板：支原体群落

隐蔽的细胞污染，很难用肉眼观测到；

附着在哺乳动物细胞膜上，抑制细胞生长和代谢。

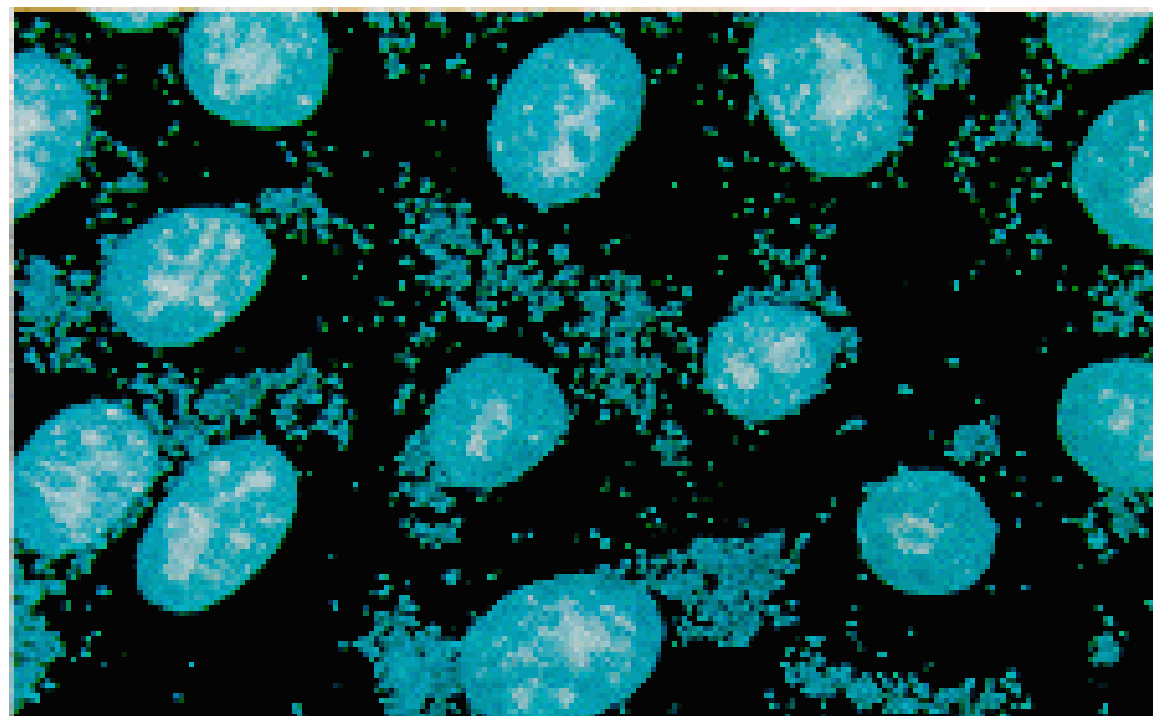
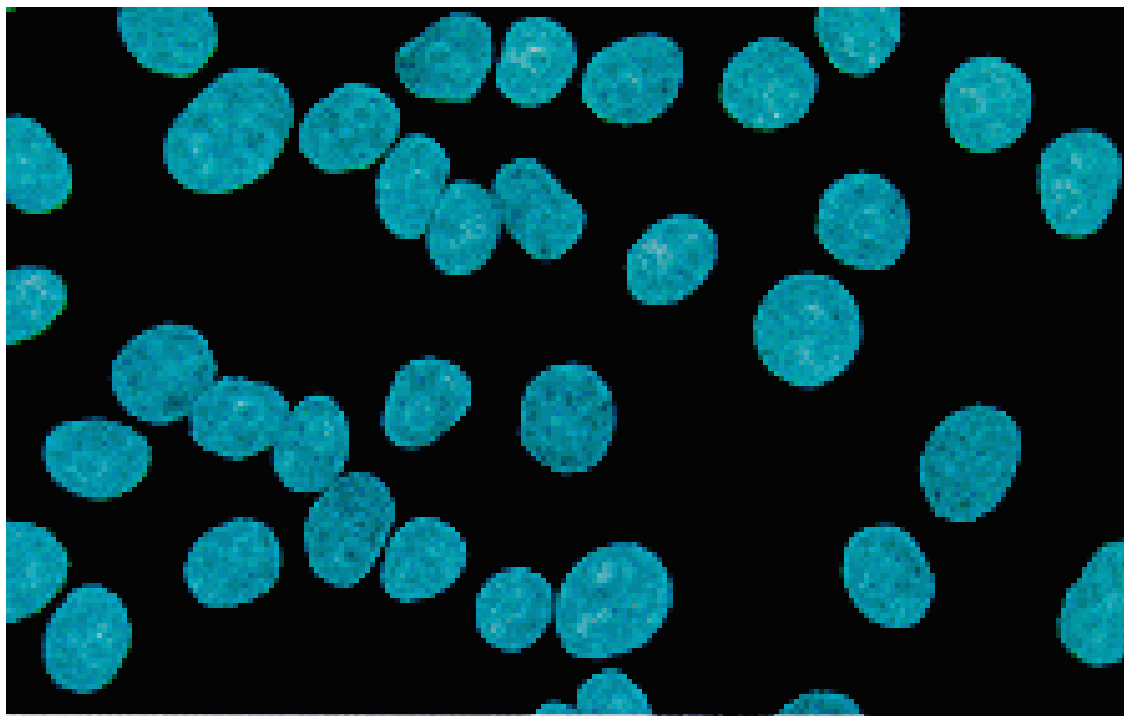
早期的支原体污染：不引起细胞形态、培养基pH值变化；

严重的支原体污染：细胞皿底部细胞间之间有黑点，引起培养基变为酸性（黄色）；

污染极易传播，同一培养箱的细胞，同一液氮罐储存的细胞。

抗生素：大部分的抗生素只能起到抑制而不是根除的效果。

支原体污染



干细胞无菌操作技巧

要点：

培养箱和生物安全柜（100级），细胞培养室（10000级层流）

体外操作环境条件不适宜细胞生长，**速度**和**无菌**

技巧：

“单手操作”技巧，减少培养液及细胞暴露的时间。

手不要置于打开的培养皿、培养基上方。

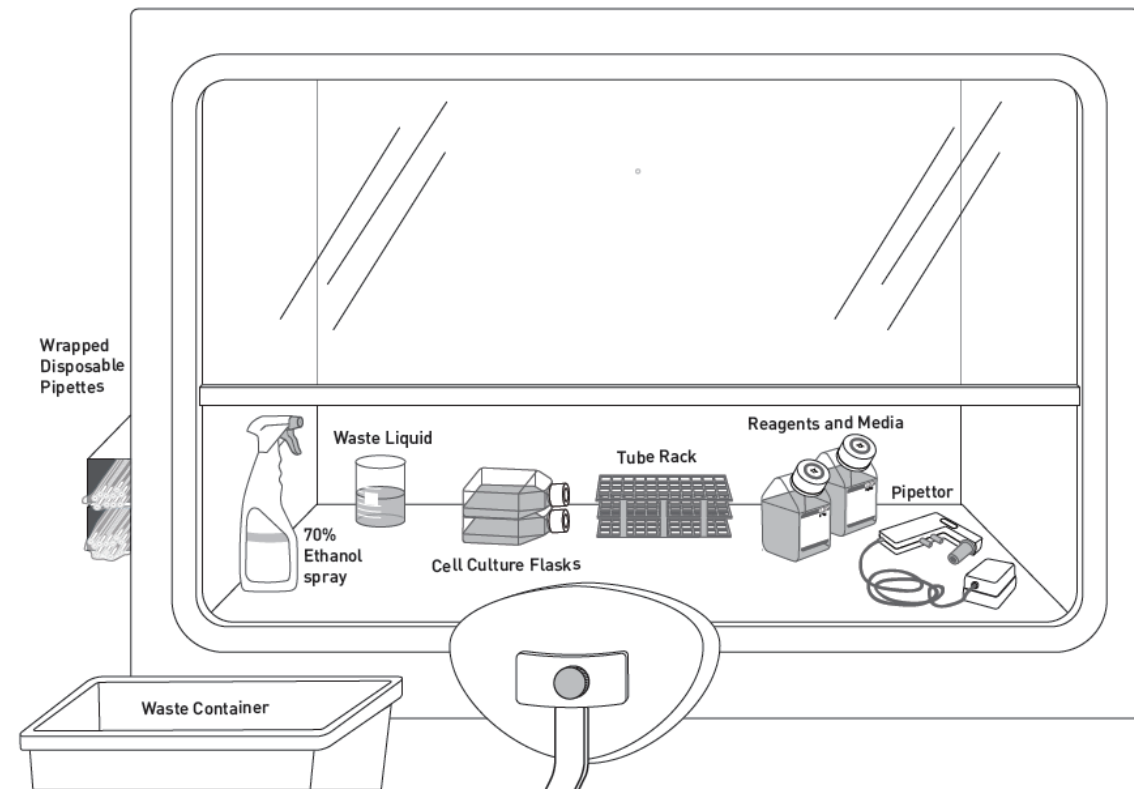
实验内容合理规划，尽量减少开培养箱的次数和时间。

培养皿和培养瓶有液体溢出时，及时用真空泵吸干液体。“液桥”容易引发污染。

除了配液外，不要颠倒培养基！

移液枪倒吸液体后，需及时清理！

细胞间工作基本流程



缓冲间实验服、口罩、帽子、手套穿戴。



生物安全柜紫外照射半小时
培养基置于水浴锅预热



打开风机和生物安全柜门，等待风机稳定（降低臭氧浓度）



用75%酒精喷壶擦拭物品的外表面；实验操作。



生物安全柜台面整理，酒精擦拭，
废液缸和真空泵的清洁，紫外照射。

注意：禁止在生物安全柜外打开细胞培养所用的试剂和耗材。

细胞培养液和培养器械处理

- 高温高压灭菌：手术器械
- 过滤：适用于遇热易变性的试剂

孔径0.22微米针式滤器或者滤瓶



- 避免反复使用细胞培养皿、移液管、枪头。

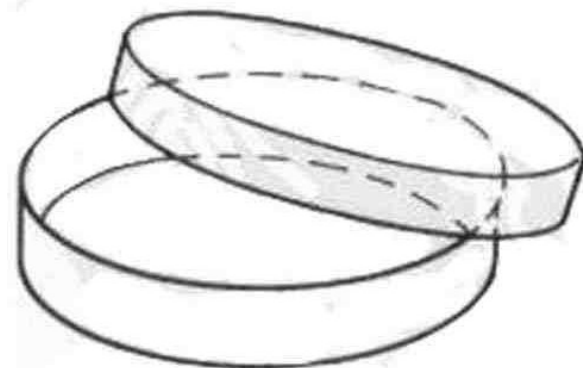
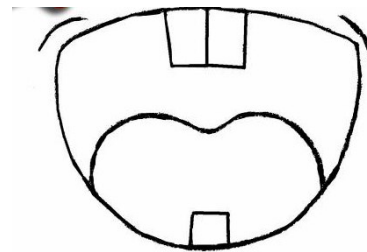
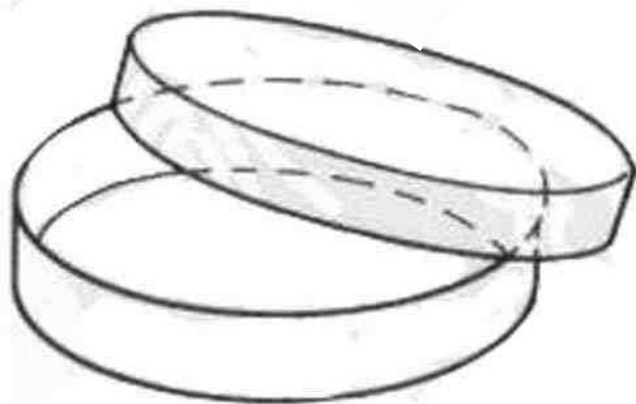
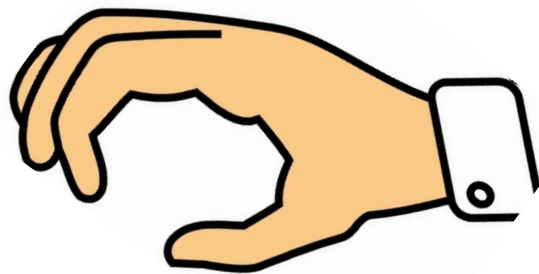
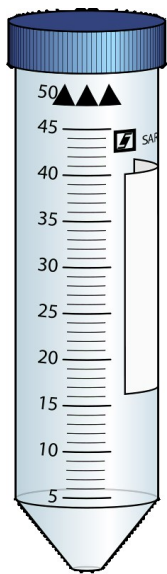
45度开瓶，避免直立，减少落菌机会



超净台内物品摆放科学，操作迅速，减少培养皿
和培养液的开盖时间



错误操作



错误操作



实验内容

- 细胞培养试剂的分装
- 成纤维细胞培养基和细胞冻存液的配置
- 小鼠胚胎成纤维细胞的制备

细胞培养试剂的分装

➤试剂分装的目的：

将大规格的培养试剂按照实验需求进行分装，可避免污染和反复冻融导致的成分失活、降解。

区分长期和短期储存的条件，储存周期。

➤ 试剂的融化和储存

胎牛血清：需要四度融化，分装后放于负八十度冰箱。

谷氨酰胺（GLU）、胰酶（TE）、双抗37度融化，分装后放于负二十度冰箱。

细胞培养基

作用：

为细胞生长提供所需要的所有营养物质；
具有缓冲能力使培养基pH值维持在7左右；
维持细胞渗透压，无菌。

天然培养基：

胚胎裂解液、细胞裂解液、血清、血浆

人工培养基：

基础培养基+血清+细胞培养添加剂+小分子

培养基的组分

水（超纯水）

盐离子

氨基酸

维生素： 生物合成类的辅助因子，自身不能合成。生物素，叶酸，核黄素，维生物B12。

血清： 血液凝结后上层澄清液体。提供生长因子、附着因子。

激素

信号分子（生长因子）或者抑制剂： bFGF, LIF, GSK3 β i, Meki。

细胞培养基组分

基础培养基 (Basal Medium Eagle, BME)

Eagle 发明，提供11种氨基酸、盐、维生素。

DMEM (Dulbecco' Modifid Eagle's Media)

氨基酸浓度和维生素浓度是BME的4倍

低糖DMEM (1 g/L)，高糖DMEM (4.5 g/L)

pH指示剂 酚红 (phenol red)

PH7.2 -粉色或者红色

酸性 -黄色或者橘红色

Knockout DMEM, DMEM F12



血清

分类

- 胎牛血清（Fetal Bovine Serum, FBS）
- 新生牛血清（NBS）:出生少于十四天
- 小牛血清：出生少于一年。
- 其它血清动物来源：马，羊，猪，兔

储存：分装后置于-80℃，避免反复冻融。4度以下融化。

不同品牌，不同货号，不同批号的血清存在很大差异。使用前需进行检测，并避免频繁更换血清！

血清局限性：批次差异大；含有动物来源的原料，影响临床使用；成分不明确，影响细胞功能或者生物学过程（胚胎干细胞的建立）。

血清替代物（Knockout Serum replacement, KSR）：完全合成，非动物源性，成分明确。



细胞培养添加剂

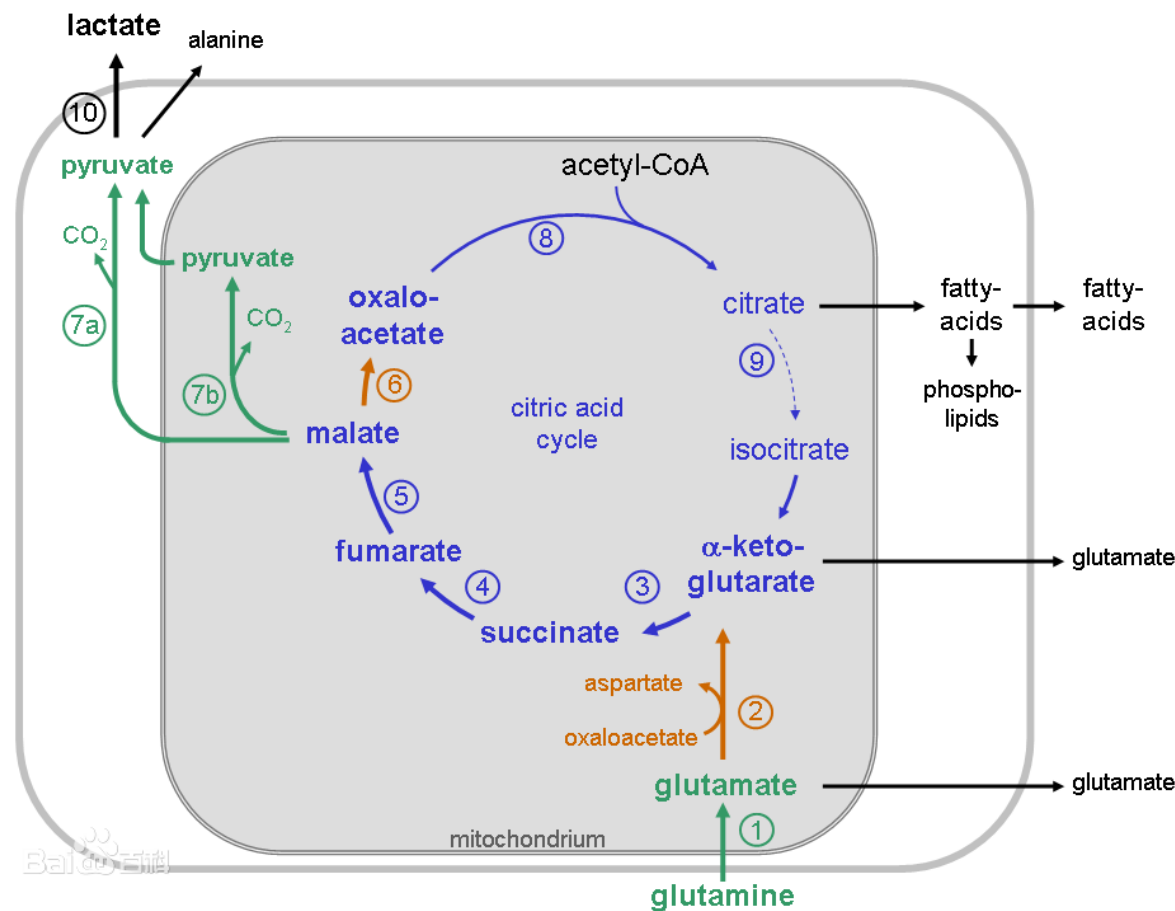
➤ 丙酮酸钠 Sodium Pyruvate

➤ 谷氨酰胺 L-glutamine: 谷氨酰胺异化参与三羧酸循环

快速分裂的细胞（肿瘤，胚胎干细胞）利用三羧酸循环中间产物进行生物大分子合成。

➤ 核酸

➤ 氨基酸



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。

青链霉素混合液（P/S, Penicillin-Streptomycin Solution）“双抗”

➤ 青霉素：阻断细菌细胞壁的合成。

链霉素：与细菌核糖体30s亚基结合抑制蛋白合成。

➤ 减少细胞培养的污染，多用于原代细胞培养。

➤ 储存：分装后负二十度储存。

➤ 使用：储液为 $100\times$ ，使用时添加到培养基里，稀释到 $1\times$ 。





二甲基亚砷（DMSO）

- 细胞冻存时的冷冻保护剂，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。
- 常温对细胞有毒害。
- 与水混合时大量放热，配置冻存液时应避免DMSO放热导致的血清中蛋白变性。
- 储存：常温避光。

“Petri dish”

“Cell culture dish”

培养器皿	面积 (cm ²)	培养液量 (ml)	细胞量
96 孔培养板	0.32	0.1	10 ⁵
24 孔培养板	2	1.0	5×10 ⁵
12 孔培养板	4.5	2.0	10 ⁶
6 孔培养板	9.6	2.5	2.5×10 ⁶
3.5 cm 培养皿	8	3.0	2×10 ⁶
6 cm 培养皿	21	5.0	5.2×10 ⁶
10 cm 培养皿	55	10.0	13.7×10 ⁶
25 cm ² 培养瓶	25	5.0	5×10 ⁶
75 cm ² 培养瓶	75	15~30	2×10 ⁷

干净 → 脏

成纤维细胞培养基和细胞冻存液的配置



每位同学取出1 mL胰酶、3 mL FM，剩下细胞培养试剂的分装后置于冰箱。



小鼠胚胎成纤维细胞的制备

成纤维细胞培养基配置

- 50 mL

培养基配置要点:

1. 先加体积大的成分。
2. 注意添加各成份的顺序。

DMEM	44 mL
FBS	5 mL
L-glutamine	500 μ L
penicillin and streptomycin	500 μ L

颠倒混匀后，用0.22 μ m孔径的滤器过滤，分装出3 mL本节课使用，剩下写上名字置于四度冰箱，下节课使用。

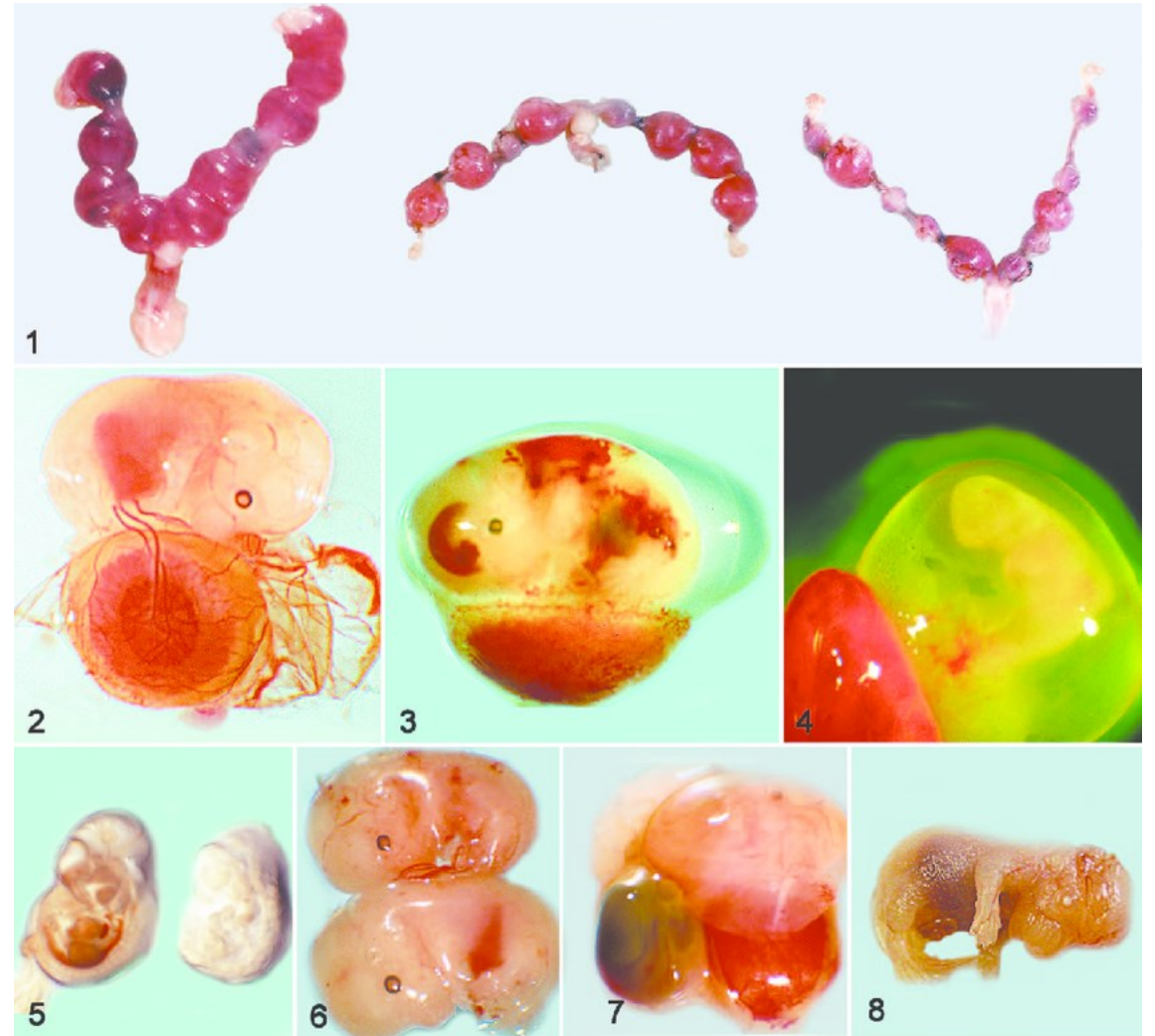
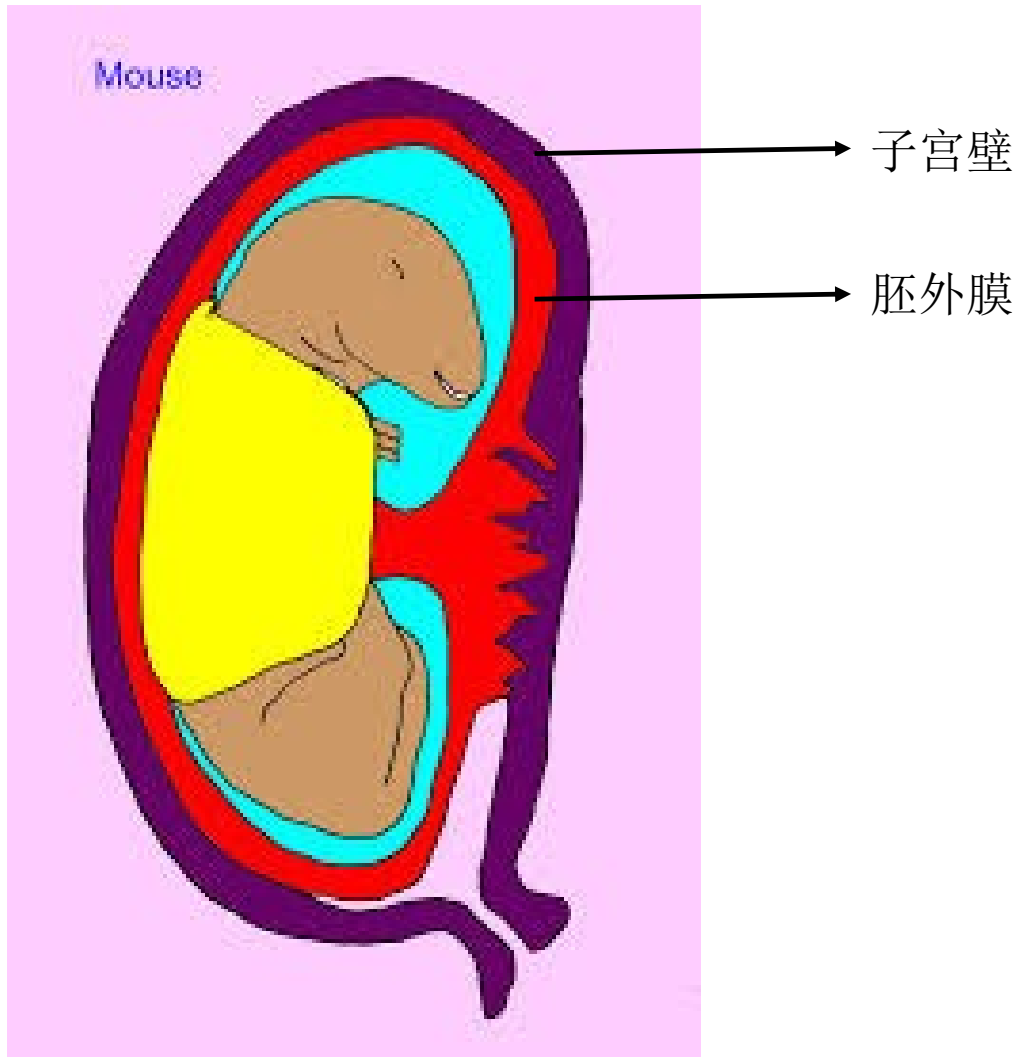
2×细胞冻存液

10 mL

DMEM	4 mL
FBS	4 mL
DMSO	2 mL

注意事项： DMSO与水溶液混合时会大量放热，配置时先将DMSO与预冷的DMEM混合，静置数分钟待液体温度下降后加入血清，混合均匀后用0.22 孔径的滤器过滤，分装500 uL / 1.5 mL tube管，共计10管。置于-20度冰箱。

小鼠胚胎成纤维细胞制作



小鼠胚胎成纤维细胞制作

交配后12.5 ~13.5天的母鼠

- 孕鼠颈部脱臼处死，剖开小鼠腹腔，取出胎儿后放置在PBS（10 cm 细胞培养皿）中。
- 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PBS培养皿中。
- 将胚胎从羊膜中小心剥离，置于新的无菌PBS培养皿中；
- 依次除去胎儿的头、四肢、尾巴、内脏，用剪刀将剩下的部分剪碎至肉糜状。
- 将剪碎的胎儿用移液枪转移至0.05%胰酶中，1 mL胰酶对应一个胎儿。在37°C水浴锅中消化5~10分钟。
- 在细胞超净台中，用成纤维细胞培养基中和胰酶。1~2个胚胎种一个3.5或者6cm的培养皿。

细胞混匀

- 培养皿底部“中间高四周低”，细胞倾向于聚集于边缘。

在培养箱内“十字形”混匀细胞。每次移动细胞后都需要进行混匀。

培养基：过多容易溢出培养基，过少细胞容易不匀。

注意事项

- 尽量减少体外操作时间。
- 按照剥离子宫壁→剥离胚外膜、胎盘→剥离头、尾、四肢、内脏顺序进行操作，每完成一步更换一次PBS（减少污染概率）。
- 小鼠胚胎分离应置于PBS中进行。

垃圾分类

- 废液：生物安全柜内的废液缸
- 枪头、移液管：细胞房内的垃圾桶内
- 帽子、手套、口罩：细胞房门口的垃圾桶内

完成实验后，请用酒精棉球擦拭台面，倒掉废液缸中的废液，丢掉废弃的枪头，清洗手术器械置于510的白瓷盘内。

实验结果观察

明天中午**12**点半到细胞培养间进行细胞观察：
细胞形态， 密度， 是否污染。

纸版实验报告下次课交。

思考题

1. 简述干细胞培养要点？
2. 阐述成纤维细胞培养基组成成分的作用？
3. 如果需要建立新的细胞培养基，如何研究，如何确认培养基适用于该种细胞的培养？