



生命科学实验指南系列

Culture of Human
Stem Cells

人干细胞培养

〔英〕R.I. 弗雷谢尼 〔英〕G.N. 斯泰赛

〔美〕J.M. 奥尔贝奇

著

章静波 陈实平 等 译



科学出版社
www.sciencep.com

生命科学实验指南系列

Culture of Human Stem Cells

人干细胞培养

〔英〕R. I. 弗雷谢尼

〔英〕G. N. 斯泰赛 著

〔美〕J. M. 奥尔贝奇

章静波 陈实平等 译

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书是 R. Ian Freshney 主编的特殊细胞培养(*Culture of Specialized Cells*)系列丛书之一,旨在介绍近年来涌现出来的诸多干细胞培养方法中最有效和最灵敏的方法与技术。其中包括干细胞系的质量控制程序、胚胎干细胞系的获取与培养、胚胎干细胞和胚胎癌细胞的神经分化技术、ES 细胞的心肌细胞分化、生殖细胞谱系的培养、胚胎癌干细胞的获取和培养、脐带和脐带血干细胞的培养、骨髓中的多能干细胞、骨髓基质来源的间充质干/祖细胞的培养原则和鉴定、疏松结缔组织干/祖细胞的分离、鉴定和培养、角膜干细胞的培养、乳腺干细胞的培养以及脂肪干细胞的培养。本书每章有简明的导言,介绍背景知识及进展,然后详尽描述培养方法,其中包括培养基和试剂的准备,有的章节还推荐不同的方案供试用者选择,因此本书具有一定的权威性、实用性与时效性。

本书可供干细胞知识与应用相关领域的科研人员、临床医生、高等院校师生、生物工程人员参考。

Culture of Human Stem Cells

Copyright © 2007 by John Wiley & Sons, Inc.

All rights reserved. This translation published under license.

图书在版编目(CIP)数据

人干细胞培养/(英)弗雷谢尼(Freshney, R. I.)等著;章静波,陈实平等译. —北京:科学出版社,2009

(生命科学实验指南系列)

ISBN 978-7-03-023168-0

I. 人… II. ①弗…②章…③陈… III. 人体-干细胞-细胞培养 IV. Q24

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 157310 号

责任编辑:李 悦/责任校对:张 琪

责任印制:钱玉芬/封面设计:耕者设计工作室

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2009 年 1 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2009 年 1 月第一次印刷 印张:19 1/4 插页:4

印数:1—3 000 字数:436 000

定价:68.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换<路通>)

参 译 人 员

(以章节排序)

章静波 (中国医学科学院基础医学研究所)
王艳辉 (中国医学科学院基础医学研究所)
陈实平 (中国医学科学院基础医学研究所)
董 敏 (中国医学科学院基础医学研究所)
孙 冰 (中国医学科学院基础医学研究所)
邓婷婷 (中国医学科学院基础医学研究所)
韩 钦 (中国医学科学院基础医学研究所)
杨 卓 (中国医学科学院基础医学研究所)
卢 姗 (中国医学科学院基础医学研究所)
王世华 (中国医学科学院基础医学研究所)
李志琴 (中国医学科学院基础医学研究所)
狄凯军 (中国医学科学院基础医学研究所)

审 校

章静波 陈实平 韩 钦

译者的话

自从1988年首次报道人胚胎干细胞系建立以来，有关干细胞的文章源源不断地涌现于相关的杂志，我国也不落后。只要翻翻各种生物学或医学杂志，均可在每期中找出1~2篇，甚至好几篇，这是好事。这表明我国科学工作人员窥察到干细胞研究的重要意义——无论在理论上或是已有的治疗价值（如输血）和潜在的治疗价值（如各种可以细胞替代治疗的疾病）。事实上，我国在干细胞研究与应用中已创造出不少成绩，例如，大型脐带血血库的建成挽救了不少患者的生命，以及以干细胞为基础的组织工程研究与应用等。

然而，正如某些事情的“初级阶段”那样，总会出现一些“不标准”、“不规范”，甚至误导与错误的结论。譬如，间充质干细胞的来源、定义、特性、分化方向与途径、应用等等均是“众说纷纭”。不仅在我国，在世界范围内也是如此。为此意图给出一个标准的、规范的干细胞培养方法，以便使干细胞研究一开始便沿着正确的轨道发展。以世界著名的细胞培养专家 R. Ian Freshney 等著《人干细胞培养》应运问世，不能不认为是干细胞研究的及时雨。

本书介绍了10余种干细胞的培养方法，包括胚胎的、新生儿的以及成体的干细胞。因此，具有代表性和全面性。每一章的开头有一个十分简明的背景介绍而所列出的方案步骤翔实，甚至试剂的配制也一一告之，由此突出了本书的实用性。此外，每一个方案后还附有试剂和供应商名录，尽量给使用者以方便，体现出以人为本的撰写格式。

相信本书的出版有利于推动我国干细胞研究的规范化，并相信我国科学工作者的研究成果更加会受到国际同行的肯定与赞赏。

本书于2007年由世界著名出版社 John Wiley & Sons 出版公司出版，这一点也反映出它的时效性与权威性。我们认为应以较快的速度，较准确地将它翻译出来，供国内同行参考。为此我们邀请了中国医学科学院基础医学研究所主要从事干细胞研究的专家翻译，他（她）们不仅具备丰富的干细胞理论知识，同时也是“最有实践经验的战士”^{*}。我们承担这项工作感到有一定的责任与压力，因为不能有“误译”并导致“误导”，然而面对压力我们感到仍然要勇于承担，因为我们觉得我国的干细胞研究必须要起步准确，翻译此书即可借他山之石促进我国干细胞研究更扎实、更快速地发展。因此也就义不容辞地“当仁不让”起来了。

章静波

2008年12月于北京

^{*}毛泽东说：“世界上最聪明、最能干的是最有实践经验的战士。”

前 言

在过去的几年中，由于对人干细胞的研究兴趣激增，开辟了一个探索从最早期的细胞到功能充分分化的细胞（诸如神经元、心肌细胞以及如骨和软骨这种坚硬组织的细胞）的分化调控领域。这不仅为研究调控机制提供了模型，而且也组织修复所需的工程生产合适的移植物创造了有意义的机会。胚胎干细胞、从脐带和牙胚（tooth germ）获得的干细胞、从骨髓和其他部位获得的成体干细胞均为异体移植物或自体移植物提供了潜在的源泉。有关干细胞的特性、干细胞识别标志的探讨，以及伴随正常干细胞和胚胎癌分化表型表达的标志表达调控改变已有不少论述。本书的目的在于直接介绍干细胞培养的方法学和其特性。虽然其中的不少技术仍处于发展阶段，但现仍有众多的已建立的技术需要介绍给涌入干细胞研究领域的研究者们。

本书遵循以前 *Culture of Specialized Cells* 系列丛书的传统方式撰写，在来自胚胎的、新生的、成体的组织中的众多干细胞中，只描述有限的代表性技术，其重点在于实践指导。研究者只要有一定的基础，在没有原始文献来源或其他出版物的情况下，仍应有可能按本书方案进行实验。因此本书提供的是一种适合入门性指导，它使得进入该领域的新手们，其中包括基础科学的和有临床背景的研究人员，熟悉当前被人们所应用的某些技术方法，以及增进他们在该领域的知识，或者有助于发展他们自己的研究项目。

本书从 Glyn Stacey 和 Jonathan Auerbach 撰写的第 1 章有关基本质量控制议题开始，接着介绍由 Jessica Cooke 和 Stephen Minger 撰写的由早期胚胎建立的人胚胎干（hES）细胞系，由 Jamie Jackson, Peter Tonge 和 Peter Andrews 撰写的人胚胎干细胞系（和胚胎癌）分化成神经细胞，由 Christine Mummery 撰写的心肌细胞分化，由 Lee Turnpenny 和 Neil Hanley 撰写的原始生殖细胞的原代培养及其特性，以及 Stefan Przyborski 撰写的胚胎干细胞的培养及其特性。这六章涵盖了这些细胞系的特性、分化以及它们的冰冻保存。从新生儿中已发现了一个新的、令人兴奋的干细胞来源，因此有两章举例来阐述，一章是由 Young-Jin Kim 所介绍的脐带，另一章是由 Wataru Sonoyama, Takayoshi Yamaza, Stan Gronthos 和 Songtao Shi 所介绍的牙胚。最后五章介绍的是成体间充质干细胞，其来源有 Carl Gregory 和 Darwin Prockop 介绍的骨髓基质；Charles Archer, Sarah Oldfield, Samantha Redman, Laura Haughton, Gary Dowthwaite, Ilyas Khan 和 Jim Ralphs 介绍软骨；由 Yiqin Du 和 James L. Funderburgh 介绍角膜；由 Mark Labarge, Ole Petersen 和 Mina Bissell 介绍乳腺干细胞，以及由 Kristine Safford 和 Henry Rice 介绍来自脂肪组织的干细胞。

有些技术会不止一次被提及，例如在第 2 章和第 4 章中都谈到小鼠胚胎饲养细胞。由于所提供的技术略有不同，因此它们的内容均予以保留。在第 2 章中还讨论了其他饲养细胞系统，在第 5 章提供另外一种饲养细胞的方案（STO 细胞），而在第 7 章中则提供了脐带血间充质干细胞（CB-MSCs）。冻存细胞的方案在第 2、6、8 和 9 章中也都提到。它们之中大多均谈到对绝大多数培养细胞目前标准冻存程序的变更，即以 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$

的缓慢冷却，在液氮中贮存，快速解冻使细胞复元。然而，人们发现 hES 细胞在快速冻融过程之后存活得较好，因此有关此内容在第 2 章中叙述。

本书的每章均以标准化格式撰写，并力图使用统一的术语和缩略语。例如，缩略语 PBSA，表示无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 Dulbecco 磷酸缓冲盐水，而 UPW 是指不限用什么方法制备的组织培养级的超纯水。设备和材料的来源一并列于每章之末，而不写在正文内，在本书之后则附有供应商网址及其综合产品名录。诸如胰蛋白酶消化和细胞计数等基本程序，除非与常规步骤有所不同，则常不予详尽地描述。此外，我们认为，某些先决条件会在仪器和设备配套时业已提供，因此诸如层流超净台或是生物安全橱、台式离心机、水浴锅、吸管、70%乙醇等均未在每一个方案中列出。有关基本设备、仪器和技术的介绍可阅读 Freshney (2005) 所著，John Wiley & Sons 出版公司出版的 *Culture of Animal Cells; a manual of basic technique**。我们认为本书读者在从事这些更为复杂一些的方案之前是业已具备相关基本操作知识的。

我们十分感激各位撰稿人不惜用大量宝贵的时间准备与撰写详尽的章节。我们认为所选题材具有良好的代表性，我们并不意图使它变为百科全书式的或是十分全面的书籍，这样必然部头十分宏大，成本也会增加。我们希望本书风格、版式以及内容对那些从不同学科进入该领域的人们以及那些已具有某些基本经验的人们均有一定的价值。读者或许也希望了解由 Stephen Sullivan 主编的《人胚胎干细胞：实用手册》，它将由 John Wiley & Sons 出版公司，2007 年推出。

R. IAN FRESHNEY

GLYN N. STACEY

JONATHAN M. AUERBACH

(章静波 译)

* 《动物细胞培养——基本技术指南》，2008，科学出版社。

目 录

译者的话

前言

第 1 章 干细胞系的质量控制程序	1
1.1 导言	1
1.2 细胞入库原则	3
1.3 细胞特性	4
1.4 无菌	11
1.5 支原体检测	12
1.6 其他微生物污染和潜在的生物危害	13
1.7 培养条件、试剂及培养基的质量控制	14
1.8 结论	14
参考文献	14
附录 1 使用 II 类生物安全橱时的某些注意事项	18
第 2 章 人胚胎干细胞系：衍生与培养	19
2.1 引言	20
2.2 细胞培养基成分	24
2.3 小鼠胚胎饲养细胞 (MEF) 的制备	25
2.4 人胚胎干细胞的诱导	31
2.5 人胚胎干细胞的增殖	33
2.6 hES 细胞的冻存	37
2.7 hES 细胞的特性鉴定	40
2.8 利用 hES 细胞进行分化研究	46
2.9 材料来源	48
参考文献	50
第 3 章 人 EC 和 ES 细胞神经分化技术	54
3.1 引言	55
3.2 其他方法	57
3.3 方法的原理和优势	58
3.4 培养基和试剂的准备	58
3.5 细胞培养	60
3.6 冻存	61
3.7 分化	62
3.8 分析	68
3.9 高通量筛选	75

3.10 材料来源	78
参考文献	79
第4章 人胚胎干细胞向心肌细胞的分化	83
4.1 引言	83
4.2 方法概述	84
4.3 培养基与试剂的准备	85
4.4 hESC 分化为心肌细胞的操作方案	87
4.5 材料来源	94
参考文献	95
第5章 人生殖细胞谱系的培养	97
5.1 引言	98
5.2 培养基及试剂配制细则	100
5.3 细胞培养方法学	101
5.4 培养物鉴定与特性分析	109
5.5 人生殖细胞培养物的分化	116
5.6 冻存	118
5.7 材料来源	118
参考文献	119
第6章 人胚胎瘤 (EC) 干细胞系的来源和培养	121
6.1 背景知识	121
6.2 试剂的准备	123
6.3 方案	125
6.4 特征	131
6.5 低温保存	140
6.6 材料来源	141
参考文献	142
第7章 脐带和脐血来源干细胞的培养	144
7.1 背景介绍	145
7.2 培养基和试剂的制备	147
7.3 具体方案	149
7.4 脐带来源细胞的生物学特征	161
7.5 材料来源	165
参考文献	166
第8章 牙髓多能干细胞	170
8.1 背景介绍	171
8.2 培养基与试剂的制备	172
8.3 培养的具体方案	174
8.4 分化潜能与鉴定	181
8.5 讨论	184

8.6 材料来源	184
参考文献	185
第9章 骨髓基质来源的间充质干/祖细胞 (MSCs) 的培养基本原则和鉴定	188
9.1 引言	189
9.2 培养基和试剂的准备	189
9.3 分离人骨髓细胞用于 MSCs 扩增	191
9.4 处理人骨髓细胞用于 MSCs 培养	191
9.5 MSCs 培养物的扩增和冻存	194
9.6 鉴定	197
9.7 附加方案: 大鼠 MSCs 的获得和扩增	204
9.8 MSCs 扩增技术注释	206
9.9 概要和评述	207
9.10 材料来源	207
参考文献	208
第10章 软结缔组织干/祖细胞的分离、鉴定和培养	212
10.1 研究背景	212
10.2 培养基和试剂准备	214
10.3 从正常人和骨关节炎患者的关节软骨中分离软骨祖细胞	215
10.4 从人胎儿软骨中分离软骨祖细胞	219
10.5 从人滑膜中分离祖细胞	221
10.6 材料来源	223
参考文献	224
第11章 人角膜干细胞的培养	225
11.1 概述	226
11.2 培养基和试剂的配制	230
11.3 人角膜缘干细胞 (LSC) 的培养	233
11.4 培养人角膜间质干细胞	238
11.5 人角膜内皮干细胞的培养	244
11.6 小结	247
11.7 材料和供应商清单	248
参考文献	250
第12章 乳腺干细胞的培养	255
12.1 培养干细胞的必要性	255
12.2 乳腺干细胞存在的证据	256
12.3 乳腺细胞培养基的组成	258
12.4 乳腺干细胞培养模式	260
12.5 结果矛盾还是数据不同	267
12.6 结论	269
12.7 材料来源	269

参考文献	270
第 13 章 脂肪来源干细胞的组织培养	274
13.1 背景知识	274
13.2 培养基和试剂的准备	275
13.3 取材和细胞分离	277
13.4 脂肪干细胞培养和扩增	278
13.5 ASCs 的特征及分化	280
13.6 材料来源	283
参考文献	283
缩略语	286
索引	290

第 1 章 干细胞系的质量控制程序

GLYN N. STACEY¹ and JONATHAN M. AUERBACH²

¹ Division of Cell Biology and Imaging and the UK Stem Cell Bank, National Institute for Biological Standards and Control, South Mimms, Herts., EN6 3QG, UK

gstacey@nibsc.ac.uk; ²GlobalStem, Inc., Rockville, MD 20850, USA,

JAuerbach@GlobalStem.com

1.1 导言

1.2 细胞入库原则

1.3 细胞特性

1.3.1 活性

1.3.2 细胞核学

1.3.3 鉴定测试

1.3.3.1 起源种属的确认

1.3.3.2 用于细胞特异性识别的 DNA 图谱

1.3.3.3 抗体标记

1.3.3.4 基因表达

1.3.3.5 多能性

1.4 无菌

1.5 支原体检测

1.6 其他微生物污染和潜在的生物危害

1.7 培养条件、试剂及培养基的质量控制

1.8 结论

参考文献

附录 1 使用 II 类生物安全橱时的某些注意事项

1.1 导言

人类细胞的体外培养为深入研究细胞生物学、疾病过程和可能的治疗方法提供了重要手段。人胚胎干细胞培养的问世开创了令人兴奋不已的多种新的可能性，其中包括可将它们应用于人类再生医学（regenerative medicine）。然而，体外细胞培养也带来了诸多的挑战：细胞和细胞培养的环境是许多微生物生长的良好条件，细胞本身也易于发生遗传学改变。此外，不幸的是，在实验室操作过程，常发生细胞培养物的交换，交叉污染（cross-contamination）或是忘记标记。所有这些挑战使得我们必须规定出细胞培养的三个关键性的基本特征，这样方可保障高质量的培养，这些特征是：

- 纯度——细胞没有受到微生物的污染
- 特性——名副其实的该种细胞
- 稳定性——在体外生长和传代过程中，其基因型和表型仍然稳定

连续传代会使得细胞培养有反复暴露于被环境微生物污染的危险。这类污染通常可因培养基 pH 的明显改变（可由培养液的颜色改变来判定），或是突然混浊起来，或是有霉菌集落浮现而被识别。在这些情况中，培养物通常是不可挽救的而要谨慎地处置以免污染其他培养物。然而，某些微生物污染能建立起潜在的永久性感染，此时在光学检

查下它们不是很明显。它们通常是支原体污染，也可能是其他有机体所导致 [Mowles et al., 1989; Buerhing et al., 1995]。

现已知支原体污染对于细胞有诸多永久性的和有害的作用，其中包括引起染色体异常 [McGarrity et al., 1984] 和细胞转化 [Zhang et al., 2004, 2006; 参见 Rottem and Naot 综述, 1998]。普通光学观察不能观察到支原体污染。此外，同一个人或是他人操作均可能引起快速传播，并且也很难可靠地消灭。因此，重要的是要对细胞培养的支原体污染进行常规筛查。

Gey 等于 1952 年所建立的第一个人 HeLa 细胞系 [Gey et al., 1952] 业已广泛地遍布各实验室，而各实验室也想建立新的细胞系。仅仅在很短的几年里，已有多个“新的”细胞系被建立起来了，但事实上这些细胞系是 HeLa 细胞的交叉污染所产生的 [Gartler et al., 1967]。通过胞核学和同工酶分析该问题便十分清楚了 [Nelson-Rees et al., 1981; O'Brien et al., 1977]，但这也仅仅得到部分解决，而且造成诸多的科学争议 [Gold, 1983]。自从交叉污染培养早期事例的识别，类似事例继续不断地被认识 (表 1.1)。尽管有责任心的细胞培养专家 [Stacey et al., 2000] 常常提醒该问题的部分原因可能起源于实验室中最初细胞系的交叉污染 [MacLeod et al., 1999; Drexler et al., 2003]。重要的是这种情况尚未在干细胞系中出现，不然会引起实验的混乱以及潜在临床应用问题，并且还会阻碍干细胞技术的进一步发展以及被人所认可。

表 1.1 文献揭示那些与原申请不符的细胞系

参考文献	细胞系
Gartler [1967]	乳腺癌细胞系交叉污染
Nelson Rees et al. [1977]	人乳腺癌细胞系和其他细胞系的广泛交叉污染
Harris et al. [1991]	推定人何杰金病细胞系与非人类细胞交叉污染
Masters et al. [1988]	膀胱癌细胞系的交叉污染
van Helden et al. [1988]	食管鳞状上皮癌细胞系之间的交叉污染
Chen et al. [1990]	TE671 来自 RD 细胞
Drexler et al. [1993]	一株白血病细胞系的交叉污染
Reid et al. [1995]	U937 细胞的交叉污染
MacLeod et al. [1997]	Dami 巨核细胞原是 HEL 红白血病细胞
Dirks et al. [1999]	ECV304 内皮细胞原是 T24 膀胱癌细胞
MacLeod et al. [1999]	由建系者送交 DSMZ 的白血病细胞系中 18% 有交叉污染

建立 hES 细胞系的一个关键问题在于不同中心在不同条件下所分离到的 hES 细胞的稳定性与可比性。迄今已有许多文献谈到了新的培养方法和分化方法，然而，每篇文章通常只涉及非常有限的细胞系。导致 hES 细胞研究者不禁要问，作者们所提供的资料是否可更广泛地适用于所有的 hES 细胞系。因此人们已在考虑技术标准化的问题 [Loring and Rao, 2006]，此外，在国际化基础上定出 hES 细胞的特征也在考虑之中 [Andrews et al., 2005]。概括说来，标准化的设想都是以用于研究胚胎癌早期发生模型所建立的抗体标志为基础的 [Andrews et al., 2002]。迄今有关干细胞的分子和抗体

标志已越来越多, 这可将应用于对干细胞系的质量控制 [Andrews et al., 2005; Loring and Rao, 2006; 以及参阅以下几章]。在下面的几节里, 我们将探讨用于测试干细胞系的纯度、鉴定、稳定性的各种技术和方法, 规范它们在干细胞研究中的应用。虽然这些技术方法都是针对 hES 细胞系的, 但它们也同样适用于所有的其他细胞系, 不论它们是否来自干细胞, 也不论它们是胚胎的、新生的或是成体的干细胞。

1.2 细胞入库原则

为了减少污染和遗传改变的机会, 细胞的传代次数愈少愈好。因此重要的一个举措是采用在工业中被应用多年的称为主库/运转库的原则。就是要建立一个主细胞库 (master cell bank), 它为某一细胞系的今后运作提供参照系。该细胞库的性质特点应十分明确, 并且要通过质量控制测试。然后将从主库分装的细胞用来产生更大的运转细胞库 (working cell bank)。该库的细胞可用于实验, 或者向其他工作者再分发 [Hay et al., 2000]。对运转细胞库还应再次进行质量监控, 虽然此时的监控面较窄, 主要集中于特性和没有受到污染。如果这种层叠式的主控/运转细胞库系统 (图 1.1) 能正确地履行, 那么它将在数十年内为研究工作提供特性一致的培养物, 而且还可以重复生产以及可靠地供应。

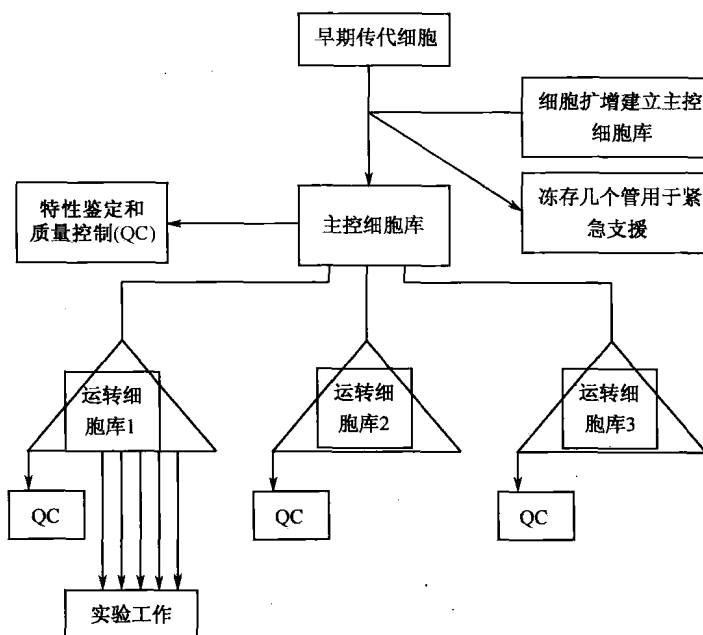


图 1.1 建立主控和运转细胞库的示意图

质量监控测试对所有细胞库应当成为一件常规的事情。其中包括活力测试（用经典的台盼蓝拒染试验）以及检查有无细菌、真菌、支原体污染 [Stacey and Stacey, 2000]。至少每隔 5 天即应对培养物进行这些检测, 最好受测的培养物在 2 次传代时不用抗生素, 这样可以确保污染物不因抗生素的抑制而检测不出来。可靠性的其他检测 (例如细胞核学、DNA 指纹图、同工酶分析、表面标志) 以及是否存在病毒的试验也可

以进行,但是检测项目的范围要取决于受试的细胞类型和细胞的用途。有关细胞库和质量控制的一般参考文献可参阅 Stacey 和 Doyle 的论文 [2000]。下面几节我们将讨论特殊的举措和方法。有效的冰冻保存方案对细胞存库显然是至关重要的(见第 2, 6, 8, 9 章)。其他细胞系以及小鼠胚胎干细胞系保存的标准方法比起玻璃化方法(vitrification method)用于 hES 细胞并不那样成功有效 [Reubinoff et al., 2001; Zhou et al., 2004; 参阅第 2 章]。用于 hES 细胞的大多数玻璃化方法都是从适用于牛卵细胞和胚胎细胞的方法改良过来的。最常被参考的用于 hES 细胞的改良方法源于 Reubinoff 等 [2001] 的文献。所报道的成功方法通常均利用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide)和乙二醇(ethylene glycol),但是各家报道的细节有所不同。Hunt 和 Timmons [2007] 有一篇综述讨论了当前所用的各种方法学。对于 hES 细胞的保存,玻璃化有许多短处,其中包括需要谨慎地维持在与液氮温度相近的贮存温度以避免去玻璃化(devitrification),在如此的贮存条件下所需的运输费用较高,每一冻存管的存库细胞数量很小,以及为了达到玻璃化的成功需要快速的冷却率(cooling rate)。

1.3 细胞特性

1.3.1 活性

细胞活性显然是十分重要的,但是这一特性在细胞培养中常常未予应有的注意。现在有许多方法可确定细胞的活力。每一方法可测定细胞生物学的不同特征(例如,膜完整性、膜的功能、细胞损伤或死亡所释放的产物、代谢功能、酶活性以及克隆形成的存活等),表 1.2 列出了测定“活力”的技术实例。要记住的是这些测试所揭示的细胞特征可以受到特殊培养条件的不同影响。

表 1.2 动物细胞培养的活力检测

方法	原理和评点
染色拒斥(例如台盼蓝、蔡黑)	进入细胞的染料被活细胞胞膜作用而排斥,因此不含有染料的细胞的细胞膜功能正常,可能是活细胞 优点:快速,通常易于进行 缺点:由于凋亡细胞仍具有活性的胞膜,因此会过高估计细胞的活力
中性红试验	活细胞将红颜料累积于溶酶体中,可用分光光度计进行分析,测定染料的掺入
3-(4,5-二甲基噻唑-2-yl)-2,5-二苯基四唑氮盐(MTT)试验	MTT 还原反应形成可进行测定的有颜色的产物,也表明有生物化学活性 优点:许多测试可以用 96 孔板快速地在自动阅读仪上测定 缺点:某些受抑制的细胞也显示有低 MTT 还原值,该值不一定与细胞活力有关。
荧光素双乙酸盐试验	荧光素双乙酸盐进入细胞并被细胞内酯酶降解,所释放出来的荧光素不能逸出完整的细胞膜,因此在 UV 光下观察可见细胞发出荧光。 优点:程序快速 缺点:需要有 UV 显微镜或是流式细胞仪

虽然基于检测凋亡细胞的活力测定方法也常使用 [例如可参阅 Sparrow and Tippet, 2005], 但台盼蓝拒染试验 [Patterson, 1979] 是最常用的方法之一。无论用什么方法, 重要的是它要与细胞培养应用有关, 并且应能提供可重复的结果。对于干细胞培养来说, 要明确的是, 活力测定并不能预示经培养处理或是冰冻保存之后的培养物中干细胞的比例, 但是细胞冻存的干株的活力仍能够并应当通过将冻存管中的细胞立即在培养液中复苏而及时地测定。

1.3.2 细胞核学

细胞染色体的观察 (核型分析) 为基因组的物理结构研究提供了一个有价值的方法。它曾被用作监测细胞培养遗传稳定性的有价值的工具 [例如, 可参阅 Rutzky et al., 1980], 另外也可用于判断是否出现转化的细胞 (transformed cell), 它们常常是非整倍体 (有染色体丢失或重复, 或是有诸如易位、缺失、倒位等异常染色体), 或是异倍体 (每个细胞的染色体数范围很广, 常常比正常数目多)。

目前最常用的观察染色体的方法是应用秋水仙碱 (colchicine) 或是类似化合物将细胞分裂阻滞在中期。此时, 每个染色体分开以及浓缩, 因此十分便于观察 (参阅第5章)。然后将细胞收获, 以低渗盐水 KCl 或是柠檬酸盐水使其膨胀, 用乙酸甲醇 (acetic methanol) 固定, 并滴在显微镜载片上, 以使产生特征性的染色体 “展示” (spread)。然后用 Giemsa 染色以观察这种浓缩的染色体。成对染色体的识别以及分辨染色体结构微细改变的性质的能力是在 Giemsa 染色之前用胰蛋白酶消化来实现的, 它可以显示每个染色体特征型的分带图型 [Wang and Federoff, 1972]。迄今也已建立了一些其他的染色体研究技术, 诸如 Q 和 R 显带及染色体涂染 (chromosome painting)。但所介绍的 Giemsa 显带是最为广泛采用的方法, 而且通常也用于鉴定各种干细胞培养系统。方案 16.5 给出了经典的方法并且综述了其他方法 [Freshney, 2005]。

最近, hES 细胞培养的研究显示它们有发生胞核学改变的倾向, 因此要维持干细胞是未分化状态以及保持其二倍体核型成为一个主要的挑战。迄今还没有一个培养系统能够完全防止 hESC 细胞系有累积核型异常的倾向性。人们感到由于 hESC 细胞系的培养系统并不理想, 存在着选择压力, 却因此有利于染色体复制并可能获得适应性机会 [Draper et al., 2004; Andrews et al., 2005]。对于 hES 细胞来说, 染色体改变似乎有一种常发生的形式, 它代表着这些细胞对体外培养条件的 “适应性” (adaptation), 最显著的改变涉及 12 号和 17 号染色体 [Draper et al., 2004]。图 1.2 例示了正常 hES 细胞系的核型。

重要的是, 需证实冻存的细胞保留有二倍体核型, 并且要定期检查所用的细胞以确保你发表文章时所用的数据皆由二倍体细胞所得, 除非你旨在研究转化的培养细胞, 则另当别论。许多细胞遗传学实验室以及某些承包测试公司可以提供核型分析测试服务, 为临床服务的常规诊断细胞遗传测试常分析 10~20 张中期相展片, 虽然这种检查可以确定培养中占主要地位的转化克隆的形态表现, 但也可能检测不出发生于早期培养不稳定阶段的低水平的转化子 (transformant, 即转化细胞), 因此为了检测 (或摒除) 低镶嵌性, 至少要计数 50 张中期染色体展片。

目前人们正在继续努力去发展以芯片为基础, 或是分子的检测方法进行 hES 培养

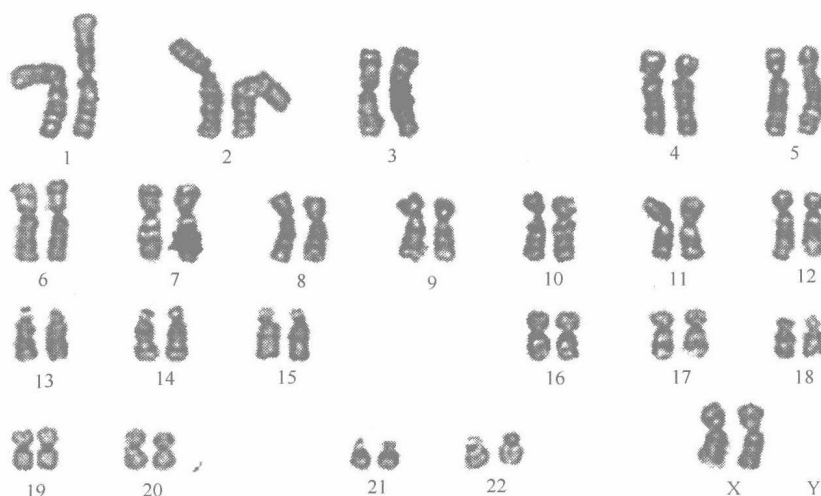


图 1.2 二倍体人 ES 细胞核型

细胞核型稳定性分析。其中之一的方法便是基于单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 基因分型。SNP 阵列对于确定遗传性疾病的标志以及揭示肿瘤中杂合性丢失 (LOH) 都十分有用。当前技术的进展已使我们能利用寡核苷酸 SNP 阵列高分辨地测定染色体拷贝数 [Zhao et al., 2004; Nannya et al., 2005]。这样便扩展了 SNP 的应用以检测非相互易位 (nonreciprocal translocation)、非整倍性, 以及染色体上的部分扩增或是缺失, 甚至小的染色体区的扩增或是缺失 [Maitra et al., 2005]。比起常规方法来 SNP 阵列方法有某些方面的优点, 其基础即在于可检测基因组改变的分辨率和大小。由于最小检测信号为 10SNP 序列, 因此当前 550 000 SNP 的阵列有效分分辨率大约为 28kb, 而 660 000 SNP 的阵列有效分分辨率为 25kb。因此, 随着密度阵列的增加, 该技术还可得到进一步的发展。但要记住的是, 该技术有一个局限性, 即目前仍缺乏分析异质的或是嵌合的细胞群体的分子学方法。

1.3.3 鉴定测试

1.3.3.1 起源种属的确认

同工酶分析的原理是基于测定不同同工酶活性的荷质比 (charge-to-mass ratio) 并利用琼脂糖凝胶分离各种多态酶 (polymorphic enzyme), 它们则可具备相同的某一种的酶活性。细胞溶解后, 所释放的酶可以稳定于缓冲液中, 然后将所制得的样品进行琼脂糖凝胶电泳, 凝胶以特异的酶底物处理, 反应的观察通过有紫色的甲臞 (formazan) 产物形成而得知, 自有了商业化试剂盒 (AuthentiKit, Innovative Chemistry) 之后, 该方法更加可靠, 只需一个工作日便可完成特殊酶的测试。通常所用的酶在于它们能够在物种间识别多态性, 同时仍保持物种间的单态性。单个酶测试可能不足以识别此来源的物种, 但用两种或三种酶底物则可明确识别来源的物种 [Stacey et al., 1997; O'Brien et al., 1967; Doyle and Stacey, 2000], 而且也可识别胚胎的亚型 (isoform)。图 1.3 为同工酶 (isoenzyme) 分析的一个实例。