

鸡胚胎干细胞分离培养及鉴定

Isolation, Culture and Identification of Chicken Embryonic Stem Cells

张晨, 赵瑞丰, 郑蒙蒙, 戴建明, 孙红艳, 左其生, 张亚妮, 李碧春*

动物科学与技术学院/江苏省动物繁育与分子设计重点实验室, 扬州大学, 扬州, 江苏

*通讯作者邮箱: yubcli@yzu.edu.cn

引用格式: 张晨, 赵瑞丰, 郑蒙蒙, 戴建明, 孙红艳, 左其生, 张亚妮, 李碧春. (2022). 鸡胚胎干细胞分离培养及鉴定. *Bio-101* e1010954. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010954.

How to cite: Zhang, C., Zhao, R. F., Zheng, M. M., Dai, J. M., Sun, H. Y., Zuo, Q. S., Zhang, Y. N. and Li, B. C. (2022). Isolation, Culture and Identification of Chicken Embryonic Stem Cells. *Bio-101* e1010954. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010954. (in Chinese)

摘要: 【原理】胚胎干细胞 (Embryonic stem cells, ESCs) 是从早期囊胚内细胞团中发现、能在体外培养的一种高度未分化细胞, 它具有发育成各种细胞的潜能。ESCs 可用于研究细胞癌变机理和新药物的筛选。【目的】本实验旨在建立鸡 ESCs 分离、培养及鉴定体系, 为以 ESCs 的体外培养与遗传修饰为技术平台的家禽转基因研究提供技术支持。【方法】用药匙法从新鲜受精蛋中分离获取鸡 ESCs, 利用鸡 ESCs 因子培养基进行培养。获得的鸡 ESCs 通过形态学观察、碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, AKP) 染色和胚胎阶段特异性表面抗原 (Stage specific embryonic antigen 1, SSEA-1) 染色等方式进行鉴定。【结果】无饲养层培养体系体外培养鸡 ESCs 能稳定传代至第 6 代, 传代后的 ESCs 克隆呈 AKP 阳性和 SSEA-1 (FITC 标记的羊抗鼠的二抗) 阳性, 说明 ESCs 保持未分化的状态。【结论】本实验建立了鸡 ESCs 无饲养层培养体系, 并成功维持未分化状态, 保持其各方面生物学活性, 为鸡 ESCs 的基因修饰和表观遗传修饰奠定基础。

关键词: 鸡, 胚胎干细胞, 分离, 培养, 鉴定

材料与试剂

1. 离心管
2. 玻璃吸管

3. 新鲜受精蛋（扬州翔龙禽业发展有限公司）
4. Knockout DMEM (Gibco, catalog number: 10829018)
5. 胎牛血清（Gibco, catalog number: 10099141）
6. β -巯基乙醇（Sigma, catalog number: M3148）
7. 丙酮酸钠（Gibco, catalog number: 11360-070）
8. L-谷氨酰胺（sigma, catalog number: 59202C）
9. 非必需氨基酸（Sigma, catalog number: M7145）
10. mLIF（Millipore, catalog number: ESG1106）
11. bFGF（Sigma, catalog number: F0291）
12. hSCF（Sigma, catalog number: S7901）
13. 鸡血清（Gibco, catalog number: 16110-082）
14. 青链霉素（Solarbio, catalog number: P1400-100）
15. 碱性磷酸酶染色试剂盒（索莱宝，货号：G1480）
16. SSEA-1（Biolegend, San Diego, CA; dilution ratio 1:100）
17. 4%多聚甲醛（Solarbio, catalog number: P1110）
18. Triton X-100（索莱宝，货号：T8200）
19. Tween-20（索莱宝，货号：T8220）
20. 新洁尔灭
21. ESCs 因子培养基（见溶液配方）^[1,2]
22. 1% Triton（见溶液配方）
23. 封闭液（见溶液配方）
24. PBS-T（见溶液配方）

仪器设备

1. 镊子
2. 药匙
3. 培养皿
4. 325 目钢筛
5. 微量移液器

6. 台式低速自动平衡离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司，TDZ4-WS）
7. 荧光倒置显微镜（OLYMPUS，IX51）
8. 超净工作台

实验步骤

一、ESCs 的分离

1. 取新鲜受精蛋，依次用新洁尔灭，75%酒精将鸡蛋表面清洗干净，置于超净工作台
2. 利用钝端镊子对准鸡蛋的赤道面进行开口，弃去上端蛋壳。
3. 左手握着下端蛋壳，右手用钝端镊子紧贴蛋壳壁旋转一圈，将蛋清去除，游离蛋黄。
4. 利用药匙拨动蛋黄，找到胚盘，眼科剪刀沿着胚盘边缘卵黄膜剪成四边形或三角形，用钝端镊子夹起四边形或三角形卵黄膜（包含胚盘）的一角，小心取出放入含 PBS（37 °C 左右）的 60 mm 细胞培养皿中。
5. 轻轻晃动培养皿，注意观察胚盘情况，直至圆形胚盘从卵黄膜上脱离出来。
6. 利用玻璃吸管将胚盘置于 PBS 溶液中清洗 3 遍，收集胚盘至 15 ml 离心管。用玻璃吸管充分吹散胚盘呈单细胞悬液。
7. 用 325 目钢筛过滤细胞悬液，高速 1,000 x g 离心 6-8 min，收集沉淀，加入 ESCs 因子培养基，充分吹散重悬，计数，以 5×10^6 个细胞接种于 60 mm 培养皿，置于 37 °C，5% CO₂ 培养箱中培养 12 h，进行细胞差速贴壁培养。

二、ESCs 的培养

1. 弃去培养 12 h 的皿中上清，用微量移液器吸取 ESCs 因子培养基冲刷培养皿底部来收集细胞悬液，置于 15 ml 离心管中，吹散。
2. 台式低速自动平衡离心机高速 1,000 x g 离心 6-8 min。
3. 弃去上清，收集细胞沉淀，加 ESCs 因子培养基，微量移液器充分吹散重悬。
4. 台式低速自动平衡离心机低速 550 x g 离心 6-8 min 后弃去上清。
5. 加入 ESCs 因子培养基吹散重悬，以 5×10^6 个细胞重新接种于 60 mm 细胞培养皿，37 °C 5% CO₂ 培养箱培养。

三、ESCs 的鉴定

1. 利用倒置显微镜观察鸡 ESCs 的生长情况和形态特征。
2. 碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, AKP) 活性鉴定:
 - a. 取生长良好的 ESCs, 吸出 60mm 培养皿中的原培养液, 缓慢加入 PBS 溶液, 轻柔漂洗 3 遍。
 - b. 缓慢加入 AKP 固定液固定 3 分钟, 吸出后 PBS 轻柔漂洗 1 遍。
 - c. 缓慢加入 ALP 孵育液, 避光 15-20 分钟, 吸出后 PBS 轻柔漂洗 1 遍。
 - d. 缓慢加入核固红染色或者甲基绿染色液复染 3-5 分钟, 吸出液体。
 - e. PBS 清洗 1 遍, 置于倒置显微镜下观察。
3. SSEA-1 间接免疫荧光鉴定^[3]
 - a. 取生长良好的 ESCs, 吸出原培养液, 缓慢加入 PBS 溶液, 轻柔漂洗 1 遍。
 - b. 缓慢加入 4%多聚甲醛固定 30 分钟, 缓慢吸出上清, 用 PBS 进行清洗。
 - c. 缓慢加入 1% Triton-100 透膜处理 20 分钟, 缓慢吸出上清, 用 PBS 轻柔清洗 1 遍。
 - d. 缓慢加入封闭液 (10% FBS 的 PBS) 37 °C 避光封闭 2h。
 - e. 缓慢吸出上清, 缓慢加入 SSEA-1 抗体, 37 °C 孵育 2 小时或 4 °C 过夜
 - f. 缓慢吸出上清, 加入 PBS-T 清洗 3 次, 每次 5 min。
 - g. 滴加二抗, 37 °C 避光孵育 2h, 吸出上清, PBS-T 轻柔清洗 3 次, 每次 5min。
 - h. 5 ng/ μ l DAPI 染色 10 分钟后, 吸出上清, 加入 PBS。
 - i. 抗荧光淬灭封片剂封片, 显微镜下观察。

结果与分析

1. 鸡 ESCs 形态观察

分离后的 ESCs 进行在因子培养基中进行无饲养层培养并传代, ESCs 的细胞形态较小, 且培养后传代, 逐渐形成鸟巢状 (图 1)。

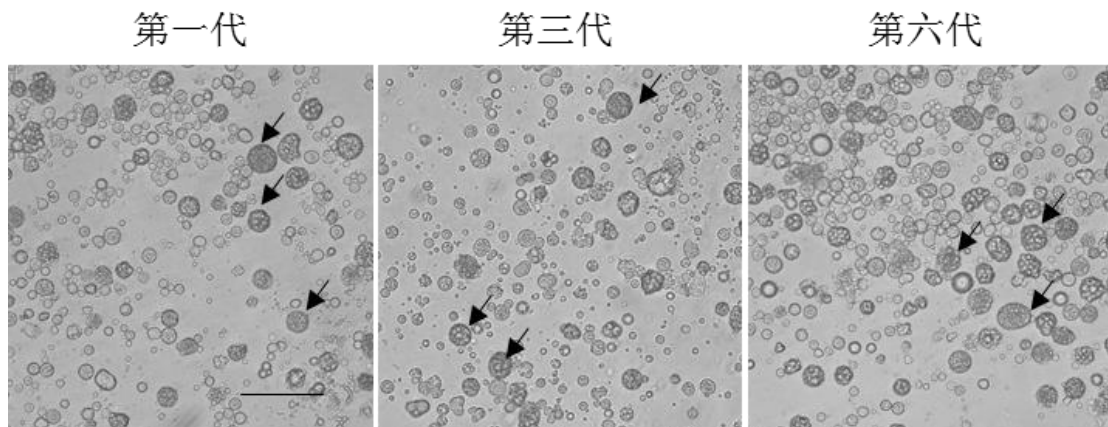


图 1. ESCs 传至第三代的细胞形态图，→所示为鸟巢状 ESCs 克隆，标尺：60 μm

2. 碱性磷酸酶（AKP）活性鉴定

通过碱性磷酸酶染色试验发现 ESCs 克隆能够被染色为橘黄色，表现出碱性磷酸酶活性（图 2）。

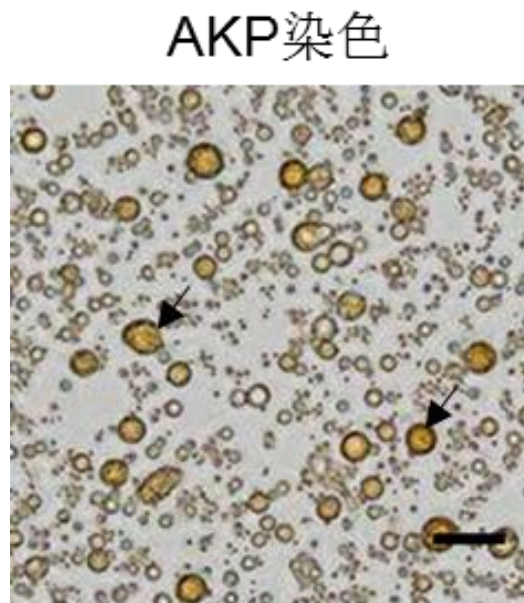


图 2. ESCs 的 AKP 染色鉴定，→所示为鸟巢状 ESCs 克隆被染成黄色，标尺：20 μm

3. SSEA-1 间接免疫荧光鉴定

经间接免疫荧光鉴定分析发现 ESCs 能够通过标记上 SSEA-1，表达绿色荧光（图 3）。

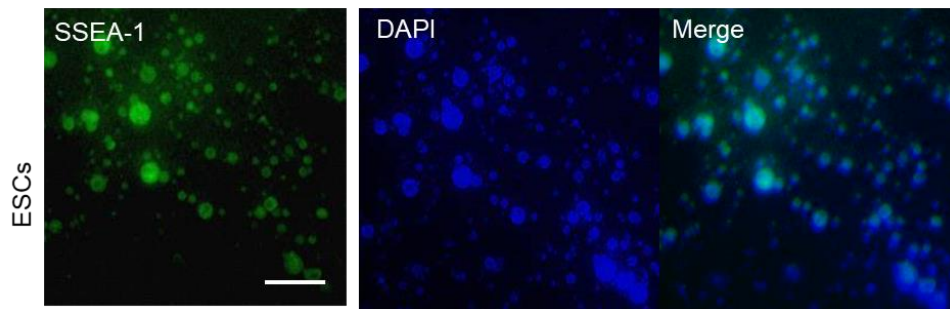


图 3. ESCs 细胞克隆的 SSEA-1 的鉴定，标尺：50 μ m

溶液配方

1. ESCs 因子培养基（郑蒙蒙等，2013）

Knockout DMEM

10% FBS

0.1 mmol/L β -巯基乙醇

1 mmol/L 丙酮酸钠

2 mmol/L 的 L-谷氨酰胺

1%非必需氨基酸

1,000 IU/mL LIF

10 ng/mL bFGF

5 ng/mL SCF

1%的双抗

2%鸡血清

2. 1% Triton

1% Triton 的 PBS

10 μ l Triton 加入 990 μ l PBS 中。

3. 封闭液

10% FBS 的 PBS

1 ml FBS 加入 9 ml 的 PBS

4. PBS-T

0.05% Tween-20 的 PBS

5 μ l Tween-20 加入 995 μ l PBS 中

致谢

本研究得到了国家自然科学基金资助项目（31872341；31572390）、重点科研项目（2017YFE0108000）和江苏省优势学科的资助。感谢张振韬、郑蒙蒙、赵瑞丰、黄晓梅等的研究工作。

参考文献

1. 赵瑞丰. 鸡CEF重编程成为PGC诱导体系的建立及其迁移归巢功能的研究.扬州:扬州大学.2018.
2. 郑蒙蒙,李伟,张亚妮,等.鸡胚胎干细胞无饲养层培养体系的建立及其转染体系的优化.中国畜牧杂志, 2013(17):22-26.
3. Zhang, Z., Elsayed, A. K., Shi, Q., Zhang, Y., Zuo, Q., Li, D., Lian, C., Tang, B., Xiao, T., Xu, Q., Chang, G., Chen, G., Zhang, L., Wang, K., Wang, Y., Jin, K., Wang, Y., Song, J., Cui, H. and Li, B. (2015). [Crucial genes and pathways in chicken germ stem cell differentiation](#). *J Biol Chem* 290(21): 13605-13621.