



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102586176 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 18

(21) 申请号 201210007010. 9

(22) 申请日 2012. 01. 11

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号中
国科学院生物物理研究所

(72) 发明人 马跃 王奇慧 牟晓宁

(74) 专利代理机构 北京市中闻律师事务所
11388

代理人 杨改凤

(51) Int. Cl.

C12N 5/074 (2010. 01)

C12N 5/0735 (2010. 01)

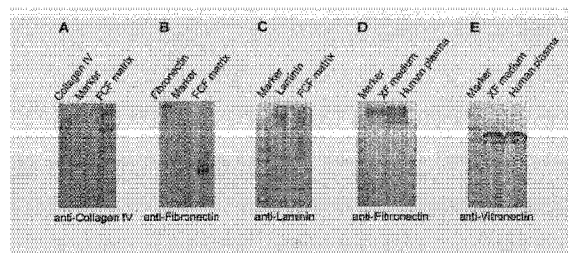
权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 4 页

(54) 发明名称

一种新型的无动物源、无饲养层的人多能干
细胞培养系统

(57) 摘要

本发明涉及一种新型的无动物源、无饲养层的人多能干细胞培养系统,应用胃蛋白酶消化以及尿素提取的方法从胎盘组织中提取了能够支持人胚胎干细胞长期培养的细胞外基质蛋白即人源化基质,同时以人血浆为原料,以 NaCl 沉淀的方法获得的组分配制成的人源化培养基,与人源化基质共同构成无动物源、无饲养层的培养系统。这一培养系统能够长期维持人胚胎干细胞的自我更新以及分化的潜能,同时无动物源的人诱导多能干干细胞细胞系也可在这一培养系统中建立,因此这一成本低廉,易于扩大培养的动物源、无饲养层培养系统为多能干细胞的临床应用打下基础。



1. 一种新型的无动物源、无饲养层的人多能干细胞培养系统,其特征在于:包括支持人多能干细胞长期培养的人源化基质和人源化培养基,所述的人源化基质富含人 IV 型胶原、纤维粘连蛋白和层粘连蛋白,所述的人源化培养基富含纤维粘连蛋白和玻璃连接蛋白。

2. 根据权利要求 1 所述的人多能干细胞培养系统,其特征在于:所述的人源化基质按如下步骤制备而成:

(1) 新鲜胎盘去掉羊膜与脐带后,剪成不超过 $0.3 \times 0.3 \times 0.3$ cm 大小的组织块,以冷水将组织块悬起,4℃ 搅拌,12h 后,用 $1\text{mm} \times 1\text{mm}$ 的筛网过滤,将截留的组织仍用冷水悬起,以冷水洗 2 天,每 12h 换水一次,第三次过滤后,将截留的组织用冷的 1M NaCl 缓冲液悬起,4℃ 搅拌;其中所述的 NaCl 缓冲液按如下方法配制:58.5g NaCl 与 25ml Tris 缓冲液,溶于 Milli-Q 水中,调节 pH 至 7.5,定容至 1L;所述的 Tris 缓冲液按如下方法配制:242.28g Tris 碱溶于 800ml Milli-Q 水中,调节 pH 至 7.5,加 Milli-Q 水定容至 1L;

(2) 以冷的 1M NaCl 缓冲液洗 4 天,每 12h 换液一次,第八次更换 NaCl 缓冲液时,用 $1\text{mm} \times 1\text{mm}$ 的筛网过滤,将截留的组织用冷的 0.5M 醋酸溶液悬起,4℃ 搅拌;

(3) 以冷的 0.5M 醋酸溶液洗 3 天,每 12h 换液一次,第六次换 0.5M 醋酸溶液时,用 $1\text{mm} \times 1\text{mm}$ 的筛网过滤,将截留的组织称重;以胃蛋白酶:组织为 1:400 的质量比加入胃蛋白酶,同时以 200g/L 将酶与组织块悬起于 0.5M 醋酸溶液中,4℃ 搅拌 24h;

(4) 7100g,4℃ 离心 1h,去掉上清,收集沉淀并称重,以质量体积比为 1:1 的条件加入 2M 尿素缓冲液,4℃ 搅拌 24h;其中所述的尿素缓冲液按如下方法配制:240.0g 尿素、12.1g Tris 碱、18.0g NaCl 溶于 1.8L Milli-Q 水中,浓 HCl 调节 pH 至 7.4,Milli-Q 水定容至 2L;

(5) 13000rpm,4℃ 离心 30min,上清液装入 25KD 的透析袋中,以 TBS 缓冲液 +0.5% 氯仿为周围溶液于 4℃ 透析 2h,然后彻底清洗烧杯与透析袋外表面后,以冷的 TBS 缓冲液为周围溶液,继续 4℃ 透析,每 2h 换 TBS 缓冲液一次,共换 3 次,最后一次透析时,4℃,过夜,透析好的液体,即为人源化基质;其中所述的 TBS 缓冲液按如下方法配制:12.1g Tris 碱,18.0g NaCl 溶于 1.8L Milli-Q 水中,浓 HCl 调节 pH 至 7.4,Milli-Q 水补齐至 2L。

3. 根据权利要求 1 所述的人多能干细胞培养系统,其特征在于:所述的人源化培养基含有人血浆的 NaCl 沉淀组分。

4. 根据权利要求 3 所述的人多能干细胞培养系统,其特征在于:所述的人血浆的 NaCl 沉淀组分按如下步骤制备而成:

(1) 将经过安全检测的四种血型的血浆,以等体积比例混合,分装成 36ml/BD 管,每管加入 6ml 的林格液,混合均匀后再加入 2M CaCl_2 至终浓度为 20mM,混匀,置于 37℃ 水浴锅孵育两小时,将已凝固的血浆,存于 -20℃ 过夜;

(2) 将处理过的血浆从 -20℃ 冰箱拿出置于 4℃ 冰箱,过夜解冻,高速冷冻离心机在 4℃,以 16000rpm 离心 30 分钟,收集上清,即是血浆来源的血清;

(3) 在 4℃ 冷柜中,向血清中缓慢、均匀地加入 NaCl,至终浓度为 28g/100ml,搅拌过夜;

(4) 高速冷冻离心机在 4℃,以 16000rpm 离心 30 分钟,收集上清,将收集的上清用滤纸过滤掉悬浮的小颗粒;

(5) 将过滤的上清,装入 25KD 的透析袋中,在冷的双蒸水中搅拌透析 2 小时以上;

(6) 重复步骤 (5) 两次;

(7) 将步骤 6 透析的透析袋放入冷的 DMEM/F12 培养基, 搅拌透析过夜;

(8) 取出透析袋内的溶液, 以外部 DMEM/F12 培养基为对照, 280nm 测定蛋白浓度, 0.22 μ m 过滤后, 保存于 4°C, 此即为血浆的 NaCl 沉淀组分。

5. 根据权利要求 4 所述的人多能干细胞培养系统, 其特征在于: 步骤 (1) 中所述的林格液按如下方法配制: 将 NaCl 0.9g, KCl 0.042g, CaCl₂ 0.0242g, 溶于 100ml 的双蒸水, 用 0.22 μ m 的滤膜过滤备用。

一种新型的无动物源、无饲养层的人多能干细胞培养系统

技术领域

[0001] 本发明细胞培养技术领域,特别涉及一种新型的无动物源、无饲养层的人多能干细胞培养系统,适用于人多能干细胞的长时间培养。

背景技术

[0002] 人多能干细胞典型特点是,在体外不断自我更新,同时保持向各个胚层细胞分化的潜能。由于人胚胎干细胞建立涉及伦理与法律等问题,其研究与应用受到一定的限制。而诱导多能干细胞很好地解决了人胚胎干细胞存在的伦理争议,同时由于其具有与人胚胎干细胞相似的特性,即自我更新与分化潜能,因而为再生医学尤其是个性化的治疗带来了希望。

[0003] 人多能干细胞不仅为基础研究提供了独特的模型,而且在细胞移植治疗方面具有巨大的应用价值。然而在培养人多能干细胞时,其与动物源制品(如动物血清或动物蛋白)的接触会提高这种细胞吸收非人源代谢产物或被非人源病原污染的风险。例如,在有动物源成分存在的培养体系中,细胞会吸收并表达唾液酸 Neu5Gc。由于人类循环系统中存在识别 Neu5Gc 的抗体,当含有 Neu5Gc 的细胞或组织移植入人体时,机体会识别这些非人源的抗原,从而对移植细胞或组织产生排斥反应,造成移植失败。同时饲养层的存在导致耗费大量的人力和物力,且饲养层细胞的批次性也会导致系统的不稳定性。因此,确定培养系统中的各种成分则有利于优化培养系统并具有较高的可重复性。

[0004] 近年,研究者们研究发展出如下不同的人多能干细胞的培养系统:

[0005] (一) 饲养层培养体系的发展

[0006] 人多能干细胞最初在以小鼠的胚胎干细胞的培养系统衍化而来的条件下建立并进行培养的,即含有鼠胚胎成纤维细胞的饲养层以及含有胎牛血清的培养基。为降低培养系统中非人源成分,研究者尝试不同组织来源的人源细胞作为饲养层培养人多能干细胞。Richard(Richards, M., Fong, C. Y., Chan, W. K., Wong, P. C. & Bongso, A., Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells, Nat Biotechnol, 2002, 20, 9, 933-6.) 等首次以胎儿/成人成纤维细胞作为饲养层,以人血清作为培养基,建立首个无动物源的培养系统。随后人骨髓来源间充质细胞,新生儿包皮细胞,人胚胎干细胞分化来源的成纤维样细胞,胎盘来源的间充质干细胞等被尝试用作人多能干细胞的饲养层。虽然各种人源细胞用于培养人多能干细胞,但是其支持人多能干细胞不分化的能力各不相同。这可能与细胞来源,培养条件的不同等因素有关。同时,制备饲养层的细胞也需要大量的人力、物力,其批次之间的差异性也无法解决。因此,发展无饲养层的培养系统具有更大的应用价值。

[0007] (二) 无饲养层培养体系的发展

[0008] Xu(Xu, C., et al., Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells, Nat Biotechnol, 2001, 19, 10, 971-4.) 等首次报道将人多能干细胞培养在由 Matrigel(BD 公司)作为细胞外基质以及鼠胚胎成纤维细胞来源的条件培养基构成的无饲

养层的培养系统内。两种培养系统内人胚胎干细胞的 mRNA 表达谱相似,说明在此无饲养层的培养系统内,细胞不会受到额外的刺激。Matrigel 是鼠 EHS 瘤细胞的提取物,因其来源提高人多能干细胞临床应用的风险以及其成分的不确定性,因此研究者们尝试以纯化的蛋白或人工合成物替代 Matrigel。在胚胎成纤维细胞来源的条件培养基作为培养基以及含牛血清白蛋白的无血清培养基中,层黏连蛋白(Laminin)、纤维连接蛋白(Fibronectin)和重组表达的玻璃粘连蛋白(Vitronectin)均被报道能够代替 Matrigel 长期维持人多能干细胞的增殖。2006 年, Ludwig(Ludwig, T.E., et al., Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions, Nat Biotechnol, 2006, 24, 2, 185-7.) 等报道在成分明确的培养基 TeSR 中使用四种大分子的混合物包括层黏连蛋白、纤维连接蛋白、玻璃粘连蛋白和胶原 IV(Colagen IV) 等成功培养人多能干细胞并在此培养系统中建立新的人多能干细胞细胞株。但由于此培养系统的高昂费用不便于推广应用。

[0009] (三) 培养基的发展

[0010] 在含有胎牛血清的培养体系中,很多干细胞死亡并大量分化。随后, Amit(Amit, M., et al., Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture, Dev Biol, 2000, 227, 2, 271-8.) 等尝试用 KO SR(Invitrogen) 代替胎牛血清降低了因血清批次间差异带来的不稳定性。随后 Xu(Xu, C., et al., Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells, Nat Biotechnol, 2001, 19, 10, 971-4.) 等应用鼠胚胎成纤维细胞来源的条件培养基,以 Matrigel 作为细胞外基质成分能长期维持人多能干细胞不分化的状态,也就是现在最广泛应用的培养方法。但是该培养直接接触鼠源、牛源的物质,对将来应用的临床应用上会有很大的障碍。

发明内容

[0011] 多能干细胞的培养需要有细胞外基质的支持,同时需要适合的培养基,然而现有的培养系统含有动物源制品,显然提高了多能干细胞吸收非人源代谢产物或被非人源病原污染的风险。鉴于现有技术的不足,本发明旨在克服这个难点,通过应用胃蛋白酶消化以及尿素提取的方法从胎盘组织中提取了能够支持人胚胎干细胞长期培养的细胞外基质蛋白即人源化基质,同时以人血浆为原料,以 NaCl 沉淀的方法获得的组分配制成的人源化培养基,与人源化基质共同构成无动物源、无饲养层的培养系统。

[0012] 为实现该目的,本发明提供了一种新型的无动物源、无饲养层的人多能干细胞培养系统,它包括支持人多能干细胞长期培养的人源化基质和人源化培养基,所述的人源化基质富含人 IV 型胶原、纤维粘连蛋白和层粘连蛋白,所述的人源化培养基富含纤维粘连蛋白和玻璃连接蛋白。

[0013] 优选地,所述的人多能干细胞培养系统中的人源化基质按如下步骤制备而成:

[0014] (1) 新鲜胎盘去掉羊膜与脐带后,剪成不超过 $0.3 \times 0.3 \times 0.3$ cm 大小的组织块,以冷水将组织块悬起, 4°C 搅拌, 12h 后,用 $1\text{mm} \times 1\text{mm}$ 的筛网过滤,将截留的组织仍用冷水悬起,以冷水洗 2 天,每 12h 换水一次,第三次过滤后,将截留的组织用冷的 1M NaCl 缓冲液悬起, 4°C 搅拌;其中所述的 NaCl 缓冲液按如下方法配制: 58.5g NaCl 与 25ml Tris 缓冲液,溶于 Milli-Q 水中,调节 pH 至 7.5,定容至 1L ;所述的 Tris 缓冲液按如下方法配制: 242.28g

Tris 碱溶于 800ml Milli-Q 水中,调节 pH 至 7.5,加 Milli-Q 水定容至 1L;

[0015] (2) 以冷的 1M NaCl 缓冲液洗 4 天,每 12h 换液一次,第八次更换 NaCl 缓冲液时,用 1mm×1mm 的筛网过滤,将截留的组织用冷的 0.5M 醋酸溶液悬起,4℃ 搅拌;

[0016] (3) 以冷的 0.5M 醋酸溶液洗 3 天,每 12h 换液一次,第六次换 0.5M 醋酸溶液时,用 1mm×1mm 的筛网过滤,将截留的组织称重;以胃蛋白酶:组织为 1:400 的质量比加入胃蛋白酶,同时以 200g/L 将酶与组织块悬起于 0.5M 醋酸溶液中,4℃ 搅拌 24h;

[0017] (4) 7100g,4℃ 离心 1h,去掉上清,收集沉淀并称重,以质量体积比为 1:1 的条件加入 2M 尿素缓冲液,4℃ 搅拌 24h;其中所述的尿素缓冲液按如下方法配制:240.0g 尿素、12.1g Tris 碱、18.0g NaCl 溶于 1.8L Milli-Q 水中,浓 HCl 调节 pH 至 7.4,Milli-Q 水定容至 2L;

[0018] (5) 13000rpm,4℃ 离心 30min,上清液装入 25KD 的透析袋中,以 TBS 缓冲液+0.5% 氯仿为周围溶液于 4℃ 透析 2h,然后彻底清洗烧杯与透析袋外表面后,以冷的 TBS 缓冲液为周围溶液,继续 4℃ 透析,每 2h 换 TBS 缓冲液一次,共换 3 次,最后一次透析时,4℃,过夜,透析好的液体,即为人源化基质;其中所述的 TBS 缓冲液按如下方法配制:12.1g Tris 碱,18.0g NaCl 溶于 1.8L Milli-Q 水中,浓 HCl 调节 pH 至 7.4,Milli-Q 水补齐至 2L。

[0019] 优选地,所述的人多能干细胞培养系统中的人源化培养基含有人血浆的 NaCl 沉淀组分。

[0020] 优选地,所述的人血浆的 NaCl 沉淀组分按如下步骤制备而成:

[0021] (1) 将经过安全检测的四种血型的血浆,以等体积比例混合,分装成 36ml/BD 管,每管加入 6ml 的林格液,混合均匀后再加入 2M CaCl₂ 至终浓度为 20mM,混匀,置于 37℃ 水浴锅孵育两小时,将已凝固的血浆,存于 -20℃ 过夜;

[0022] (2) 将处理过的血浆从 -20℃ 冰箱拿出置于 4℃ 冰箱,过夜解冻,高速冷冻离心机在 4℃,以 16000rpm 离心 30 分钟,收集上清,即是血浆来源的血清;

[0023] (3) 在 4℃ 冷柜中,向血清中缓慢、均匀地加入 NaCl,至终浓度为 28/100ml,搅拌过夜;

[0024] (4) 高速冷冻离心机在 4℃,以 16000rpm 离心 30 分钟,收集上清,将收集的上清用滤纸过滤掉悬浮的小颗粒;

[0025] (5) 将过滤的上清,装入 25KD 的透析袋中,在冷的双蒸水中搅拌透析 2 小时以上;

[0026] (6) 重复步骤 (5) 两次;

[0027] (7) 将步骤 6 透析的透析袋放入冷的 DMEM/F12 培养基,搅拌透析过夜;

[0028] (8) 取出透析袋内的溶液,以外部 DMEM/F12 培养基为对照,280nm 测定蛋白浓度,0.22 μm 过滤后,保存于 4℃,此即为血浆的 NaCl 沉淀组分。

[0029] 上述步骤 (1) 中所述的林格液按如下方法配制:将 NaCl 0.9g, KCl 0.042g, CaCl₂ 0.0242g,溶于 100ml 的双蒸水,用 0.22 μm 的滤膜过滤备用。

[0030] 与现有技术相比,本发明涉及的人多能干细胞培养系统具有如下优点和显著的进步:

[0031] (1) 制备成本低。本发明以胎盘为原材料制备人源化基质,胎盘是一种富含细胞外基质蛋白的人体组织,婴儿出生后即被废弃,因而具有来源广泛,成本低廉等特点。

[0032] (2) 无动物源、无饲养层。本发明应用胃蛋白酶消化以及尿素提取的方法从胎盘组

织中提取了能够支持人胚胎干细胞长期培养的细胞外基质蛋白即人源化基质,同时以人血浆为原料,以 NaCl 沉淀的方法获得的组分配制成的人源化培养基,与人源化基质共同构成无动物源、无饲养层的培养系统。这一培养系统能够长期维持人胚胎干细胞的自我更新以及分化的潜能,同时无动物源的人诱导多能干细胞细胞系也可在这一培养系统中建立,因此这一成本低廉,易于扩大培养的动物源、无饲养层培养系统为多能干细胞的临床应用打下基础。

[0033] (3) 促进干细胞贴壁。与 Matrigel 的成分相似,本发明的细胞外基质富含人 IV 型胶原 (Collagen IV)、纤维粘连蛋白 (Fibronectin) 和层粘连蛋白 (Laminin) (见图 2-A、B、C)。同时,本发明通过以人的血浆为原材料,比较阴离子交换柱层析、饱和硫酸铵沉淀和 NaCl 沉淀的方法,最后选定利用 NaCl 沉淀的方法从人血浆中提取制成了血浆抽提物,配制成人源化的培养基,该培养基富含纤维粘连蛋白 (Fibronectin) 和玻璃连接蛋白 (Vitronectin) (见图 2-D、E),对促进干细胞的贴壁有重要作用。

[0034] (4) 可长时间培养人胚胎干细胞。通过实验证明,本发明的人源化细胞外基质和人血浆抽提物,可长时间培养人胚胎干细胞,经过 39 代 (约 270 天) 的培养,胚胎干细胞仍然保持核型的稳定 (见图 3-B),并且具有和传统培养方法相似的形态学特征,干性相关基因的表达水平 (见图 3-A、C、D)。为了检测在该人源化系统中,干细胞是否能保持三胚层分化的全能性,发明人分别检测了其在体外、体内分化的能力 (图 4-A、B)。体外的 EBs 和体内畸胎瘤都检测到三胚层的代表标记。

[0035] (5) 支持诱导产生诱导多能干细胞。更进一步,通过进行人多能干细胞的诱导试验证明,本发明的人源化干细胞培养系统能够支持诱导人皮肤细胞去分化成为诱导多能干细胞,诱导产生的诱导多能干细胞能表达多能性相关的蛋白 (图 5-A) 以及相似的 RNA 表达水平 (图 5-B)。由于重编程的另一个主要特征是表观遗传的改变,发明人检测了 Oct4 与 Nanog 基因启动子的甲基化水平,结果显示诱导多能干细胞的甲基化水平与人真皮成纤维细胞相比大大降低,与干细胞的水平相近。这说明其形成确实经历了表观水平的变化 (图 5-C),且诱导的诱导多能干细胞具有体外、体内的朝三胚层分化的潜能 (图 6-A、B)。

附图说明

[0036] 通过下面结合附图对本发明的优选实施例进行的描述,本发明的技术方案及其技术效果将变得更加清楚,且更加易于理解。其中:

[0037] 图 1 示出了本发明的人源化基质制备流程图。

[0038] 图 2 示出了人源化基质 (FCF matrix) 及培养基 (XF medium) 大分子成分的电泳图。Western blot 显示人源化基质中富含 Collagen IV、Fibronectin 和 Laminin (A、B、C),而培养基中富含 Fibronectin 以及 Vitronectin 等细胞外基质蛋白 (D、E)。

[0039] 图 3 示出了培养在本发明培养系统中的 hESCs 具有正常核型以及表达多能性相关的蛋白。(A) 明场中培养在传统 MEF-CM/MG 系统 (左) 以及无动物源无饲养层 (XF/FCF) 系统的 H7 细胞的形态;(B) 在 XF/FCF 中培养 39 代后, H7 细胞的 G-带染色结果;(C) FACS 分析不同培养条件下,表达多能性相关的蛋白 Oct4, SSEA4, TRA-1-60 and TRA-1-81 的 H7 细胞的百分比;两者之间没有明显区别。(D) 定量 RT-PCR 分析不同培养系统中, H7 细胞 Oct4, Sox2 and Nanog 的表达量 (基因的表达水平以 GAPDH 的表达量归一),两者之间没有明显

区别。

[0040] 图 4 示出了培养在 XF/FCF 的 H7 体内体外均具有向三胚层细胞分化的潜能。(A) RT-PCR 分析由 MEF-CM/MG (左) 以及 XF/FCF (右) 培养的 H7 分化形成的 EBs 基因表达情况; (B) H7 在 XF/FCF 培养 14 代后在 NOD/SCID 小鼠体内形成畸胎瘤, 对畸胎瘤进行苏木精 - 伊红染色。箭头指示来源于三胚层的典型结构。标尺, 100 μ m。

[0041] 图 5 示出了形成的 hiPSCs 表达多能性相关蛋白同时具有与胚胎干细胞 hESCs 相似的甲基化水平。(A) iPS 细胞表达 Oct4, SSEA4, TRA-1-60 以及 TRA-1-81 等蛋白的免疫荧光染色, 标尺, 100 μ m; (B) 定量 RT-PCR 分析 H7 与 iPS 细胞内 Oct4, Sox2 以及 Nanog 的表达量, 基因的表达水平以 GAPDH 的表达量归一; (C) 重亚硫酸盐测序分析 H7, HDFs 以及 iPS 细胞内, Oct4 与 Nanog 启动子甲基化状态, 空圈代表未甲基化的 CpGs, 黑圈代表甲基化的 CpGs。

[0042] 图 6 示出了形成的 hiPSCs 体内体外均具有向三胚层细胞分化的潜能。(A) RT-PCR 分析由 iPS (右) 与 H7 (左) 分化形成的 EBs 基因表达情况; (B) C1-OSN 在 XF/FCF 培养 7 代后在 NOD/SCID 小鼠体内形成畸胎瘤, 对畸胎瘤进行苏木精 - 伊红染色。箭头指示来源于三胚层的典型结构。标尺, 100 μ m。

具体实施方式

[0043] 本发明提供的新型无动物源、无饲养层的干细胞培养系统主要包含二个主要的方面: 1) 干细胞赖以贴壁生长的细胞外基质 (FCF matrix); 2) 维持胚胎干细胞自我更新的细胞培养基 (XF medium)。

[0044] 1、人源化基质的提取

[0045] 我们通过对 Matrigel 提取方法的优化, 发展出了一种简单易行的从胎盘中提取细胞外基质的方法。

[0046] 首先, 我们从医院取得乙肝、艾滋病、梅毒等检测阴性的健康产妇的胎盘。根据人源化基质提取过程主要分为四部分 (图 1), 首先将胎盘组织剪碎, 其次去除血液蛋白与细胞蛋白, 再次提取细胞外基质蛋白的组分, 最后除菌以及透析到 TBS 溶液中。

[0047] 1.1 准备试剂

[0048] (1) 2M Tris 缓冲液, pH 7.5

[0049] 242.28g Tris 碱溶于 800ml Milli-Q 水中, 调节 pH 至 7.5, 加 Milli-Q 水补齐至 1L。

[0050] (2) 1M NaCl 缓冲液, pH 7.5

[0051] 58.5g NaCl 与 25ml 2M Tris 缓冲液, 溶于 Milli-Q 水中, 调节 pH 至 7.5 补齐至 1L。

[0052] (3) 2M 尿素缓冲液

[0053] 240.0g 尿素, 12.1g Tris 碱, 18.0g NaCl 溶于 1.8L Milli-Q 水中, 浓 HCl 调节 pH 至 7.4, Milli-Q 水补齐至 2L。

[0054] (4) TBS 缓冲液

[0055] 12.1g Tris 碱, 18.0g NaCl 溶于 1.8L Milli-Q 水中, 浓 HCl 调节 pH 至 7.4, Milli-Q 水补齐至 2L。

- [0056] (5) 75%乙醇溶液。
- [0057] 所有溶液储存于 4℃。
- [0058] 1、2 准备胎盘
- [0059] (1) 取回的新鲜胎盘储存于冰盒内。
- [0060] (2) 去掉羊膜与脐带后,将胎盘剪成大概 5×5cm 的组织块, -80℃保存。
- [0061] (3) 提取基质时,将胎盘组织块取出,室温解冻。
- [0062] (4) 以解剖剪剪成不超过 0.3×0.3×0.3cm 大小的组织块,称取重量。
- [0063] 1、3 实验步骤
- [0064] (1) 以 2L 左右的冷水将组织块悬起,4℃搅拌,12h 后,用 1mm×1mm 的筛网过滤。将截留的组织仍用 2L 冷水悬起。
- [0065] (2) 以冷水洗 2 天,每 12h 换水一次。
- [0066] (3) 第三次过滤时,将截留的组织用 2L 冷的 1M NaCl 缓冲液悬起,4℃搅拌。
- [0067] (4) 以冷的 1M NaCl 缓冲液洗 4 天,每 12h 换液一次。
- [0068] (5) 第八次更换 NaCl 缓冲液时,1mm×1mm 的筛网过滤,将截留的组织用冷的 0.5M 醋酸溶液悬起,4℃搅拌。
- [0069] (6) 以冷的 0.5M 醋酸溶液洗 3 天,每 12h 换液一次。
- [0070] (7) 第六次换 0.5M 醋酸溶液时,1mm×1mm 的筛网过滤,将截留的组织称重。以胃蛋白酶:组织为 1:400 的质量比加入胃蛋白酶(pepsin),同时以 200g/L 将酶与组织块悬起于 0.5M 醋酸溶液中。4℃搅拌 24h。
- [0071] (8) 7100g,4℃离心,1h。去掉上清,收集沉淀并称重。
- [0072] (9) 以质量体积比为 1:1 的条件加入 2M 尿素溶液。4℃搅拌 24h。
- [0073] (10) 13000rpm,4℃离心 30min。保留上清。
- [0074] (11) 上清装入 25KD 的透析袋中,以 TBS+0.5%氯仿为周围溶液透析,4℃,2h。
- [0075] (12) 彻底清洗烧杯与透析袋外表面后,以冷的 TBS 为周围溶液,继续透析,4℃。
- [0076] (13) 每 2h 换 TBS 一次,共换 3 次,最后一次透析时,4℃,过夜。
- [0077] (14) 将透析好的液体,即为 FCF matrix,在超净台内小心分装于 1.5ml EP 管内,尽量避免温度升高。保存于 -20℃。
- [0078] 与 Matrigel 的成分相似,本发明制备的人源化基质富含人 IV 型胶原 (Collagen IV)、纤维粘连蛋白 (Fibronectin) 和层粘连蛋白 (Laminin) (见图 2-A、B、C)。
- [0079] 2、人源化培养基的制备
- [0080] 2、1 准备试剂
- [0081] (1) Ringer solution:
- [0082] NaCl :0.9g, KCl :0.042g, CaCl₂ :0.0242g, 溶于 100ml 的 ddH₂O, 用 0.22um 的滤膜过滤备用。
- [0083] (2) 2M CaCl₂:
- [0084] CaCl₂ :11.1g, 溶于 50ml 的 ddH₂O, 用 0.22um 的滤膜过滤备用。
- [0085] 2、2 血浆处理
- [0086] (1) 将经过安全检测的四种血型的血浆,以等体积比例混合,分装成 36ml/BD 管。每管加入 6ml 的 Ringer solution,混合均匀。再加入 2M CaCl₂ 至终浓度为 20mM,混匀,置

于 37℃ 水浴锅孵育两小时。

[0087] (2) 将已凝固的血浆,存于 -20℃ 过夜。

[0088] 2、3 实验步骤

[0089] (1) 将处理过的血浆从 -20℃ 冰箱拿出置于 4℃ 冰箱,过夜解冻。

[0090] (2) 高速冷冻离心机在 4℃,以 16000rpm 离心 30 分钟,收集上清,即是血浆来源的血清。

[0091] (3) 在 4℃ 冷柜中,缓慢、均匀的加入 NaCl,至终浓度为 28g/100ml,搅拌过夜。

[0092] (4) 高速冷冻离心机在 4℃,以 16000rpm 离心 30 分钟,收集上清,将收集的上清用滤纸过滤掉悬浮的小颗粒。

[0093] (5) 将过滤的上清,装入 25KD 的透析袋中,在冷的 ddH₂O 中搅拌透析 2 小时以上。

[0094] (6) 重复步骤 (5) 两次。

[0095] (7) 将步骤 6 透析的透析袋放入冷的 DMEM/F12,搅拌透析过夜。

[0096] (8) 取出透析袋内的溶液,以外部 DMEM/F12 为对照,280nm 测定蛋白浓度,0.22 μm 过滤后,保存于 4℃,此即为血浆的 NaCl 沉淀组分。

[0097] 2、3 人源化培养基配制

[0098] (1) 微量元素的配制

[0099] Milli-Q 水以浓 HCl 调节 pH 值至 0.9-1.0。称取下列药品：

药品	终浓度 1 X mg/l	母液 1000 X mg/ml
AgNO ₃	0.0009	0.0009
AlCl ₃ · 6H ₂ O	0.006	0.006
(CH ₃ COO) ₂ Ba	0.01	0.01
CdSO ₄ · 2.67H ₂ O	0.058	0.058
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.01	0.01
Cr ₂ (SO ₄) ₃ · xH ₂ O	0.003	0.003
Germanium dioxide GeO ₂	0.003	0.003
Na ₂ SeO ₃	0.007	0.007
H ₂ SeO ₃	0.02	0.02
KBr	0.0006	0.0006
KI	0.0009	0.0009
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.002	0.002
NaF	0.02	0.02
Na ₂ SiO ₃	0.43	0.43
NaVO ₃	0.006	0.006
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.06	0.06
NiSO ₄ · 6H ₂ O	0.001	0.001
RbCl	0.007	0.007
SnCl ₂	0.0003	0.0003
ZrOCl ₂ · xH ₂ O	0.02	0.02

[0100]

[0101] (2) 氨基酸母液的配制

[0102] Milli-Q 水以浓 HCl 调节 pH 值至 0.9-1.0。称取下列药品：

[0103]

		用量 (mg)	终浓度 (mg/l)
1	glycine	150	150

2	L-histidine	940	940
3	L-Isoleucine	3400	3400
4	L-Methionine	90	90
5	L-Phenylalanine	1800	1800
6	L-Proline	4000	4000
7	L-Hydroxyproline	100	100
8	L-Serine	800	800
9	L-Threonine	2200	2200
10	L-Tryptophan	440	440
11	L-Tyrosine	77	77
12	L-Valine	2400	2400

[0104] (3) Selenite 溶液的配制

[0105] 称取 2.8mg selenite 粉末溶于 40ml Milli-Q 水内, 浓度为 $70 \mu\text{g/ml}$

[0106] (4) Insulin 溶液的配制

[0107] 25mM Hepes 溶液, 调节 pH 至 8.2。称取 388.8mg insulin 粉末, 加入 67.76ml 的 25mM Hepes 溶液, 再加入 20ul 左右 NaOH(10M), 调节 pH 至 8.2, 此时溶液变澄清。再用 5ml 25mM Hepes 溶液冲洗 pH 计探头等, 并于 insulin 溶液混合, $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 4°C 保存。

[0108] (5) Thiamine-Reduced glutathione-Ascorbic acid-Mg(TRA) $100\times$ 母液配制

[0109]

	药品	用量 (mg)	终浓度 (mg/l)
13	Thiamine	38.7	150
14	Reduced glutathione	3.8	940
15	Ascorbic acid-Mg	270.4	3400

[0110]

[0111] (6) 人源化培养基的配制

[0112]

试剂	用量
氨基酸母液	73ml
微量元素	100 μ l
Selenite 溶液	10 μ l
TRA 溶液	3ml
Holo-transferrin	5.5mg
Non-essential Amino Acids	5ml
L-glutamine	0.073mg
β -mercaptoethanol	0.5ml
bFGF	0.5ml (100ng/ μ l bFGF)
Streptomycin-penicillin	5ml
上述制备的血浆的 NaCl 沉淀 组分	16.6mg/ml

[0113] 最后以 DMEM/F12 培养基将体积补齐至 500ml, 0.22 μ m 过滤, 4 $^{\circ}$ C 保存。

[0114] 本发明通过以人的血浆为原材料, 比较阴离子交换柱层析、饱和硫酸铵沉淀和 NaCl 沉淀的方法, 最后选定利用 NaCl 沉淀的方法从人血浆中提取制成了血浆抽提物, 配制成人源化的培养基, 该培养基富含纤维粘连蛋白 (Fibronectin) 和玻璃连接蛋白 (Vitronectin) (见图 2-D、E), 对促进干细胞的贴壁有重要作用。

[0115] 通过实验证明, 本发明的人源化细胞外基质和人血浆抽提物, 可长时间培养人胚胎干细胞, 经过 39 代 (约 270 天) 的培养, 胚胎干细胞仍然保持核型的稳定 (见图 3-B), 并且具有和传统培养方法相似的形态学特征, 干性相关基因的表达水平 (见图 3-A、C、D)。为了检测在该人源化系统中, 干细胞是否能保持三胚层分化的全能性, 发明人分别检测了其在体外、体内分化的能力 (图 4-A、B)。体外的 EBs 和体内畸胎瘤都检测到三胚层的代表标记。

[0116] 更进一步, 通过进行人多能干细胞的诱导试验证明, 本发明的人源化干细胞培养系统能够支持诱导人皮肤细胞去分化成为诱导多能干细胞, 诱导产生的诱导多能干细胞能表达多能性相关的蛋白 (图 5-A) 以及相似的 RNA 表达水平 (图 5-B)。由于重编程的另一个主要特征是表观遗传的改变, 发明人检测了 Oct4 与 Nanog 基因启动子的甲基化水平, 结果显示诱导多能干细胞的甲基化水平与人真皮成纤维细胞相比大大降低, 与干细胞的水平相近。这说明其形成确实经历了表观水平的变化 (图 5-C), 且诱导的诱导多能干细胞具有体外、体内的朝三胚层分化的潜能 (图 6-A、B)。

[0117] 对于所属技术领域的技术人员而言, 随着技术的发展, 本发明构思可以不同方式实现。本发明的实施方式并不仅限于以上描述的实施例, 而且可在权利要求的范围内进行变化。

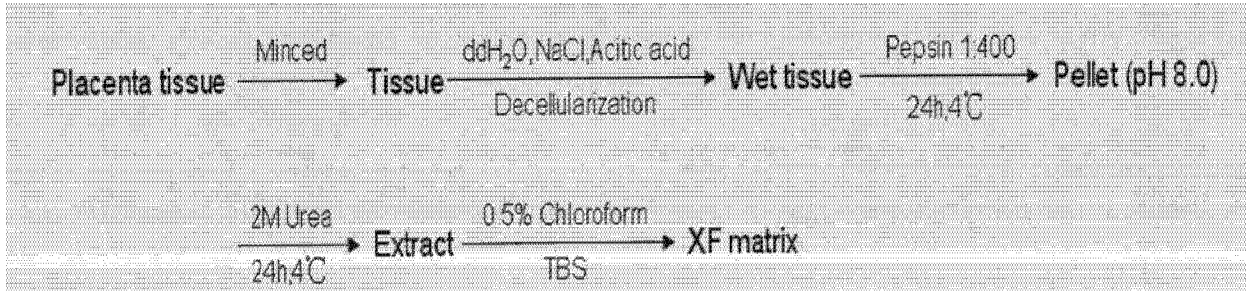


图 1

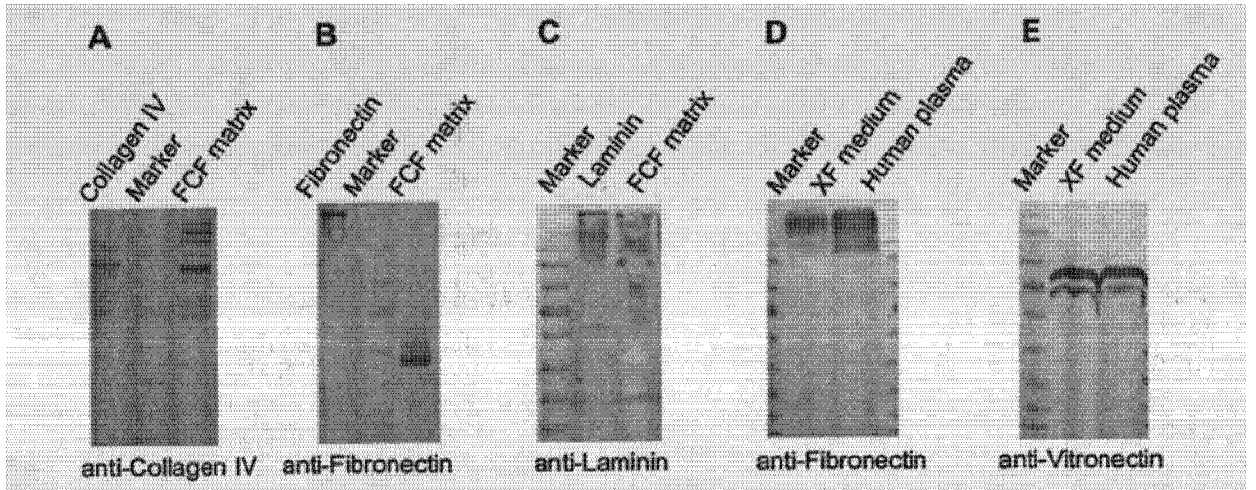


图 2

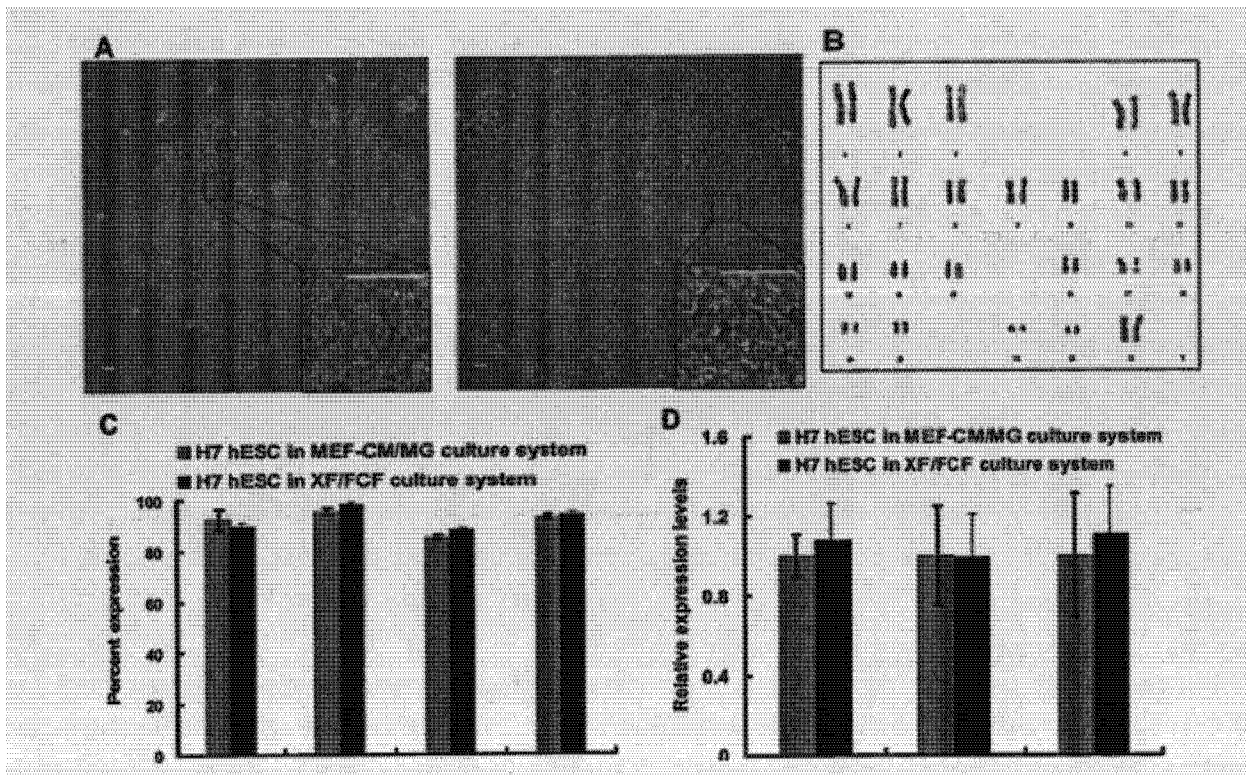


图 3

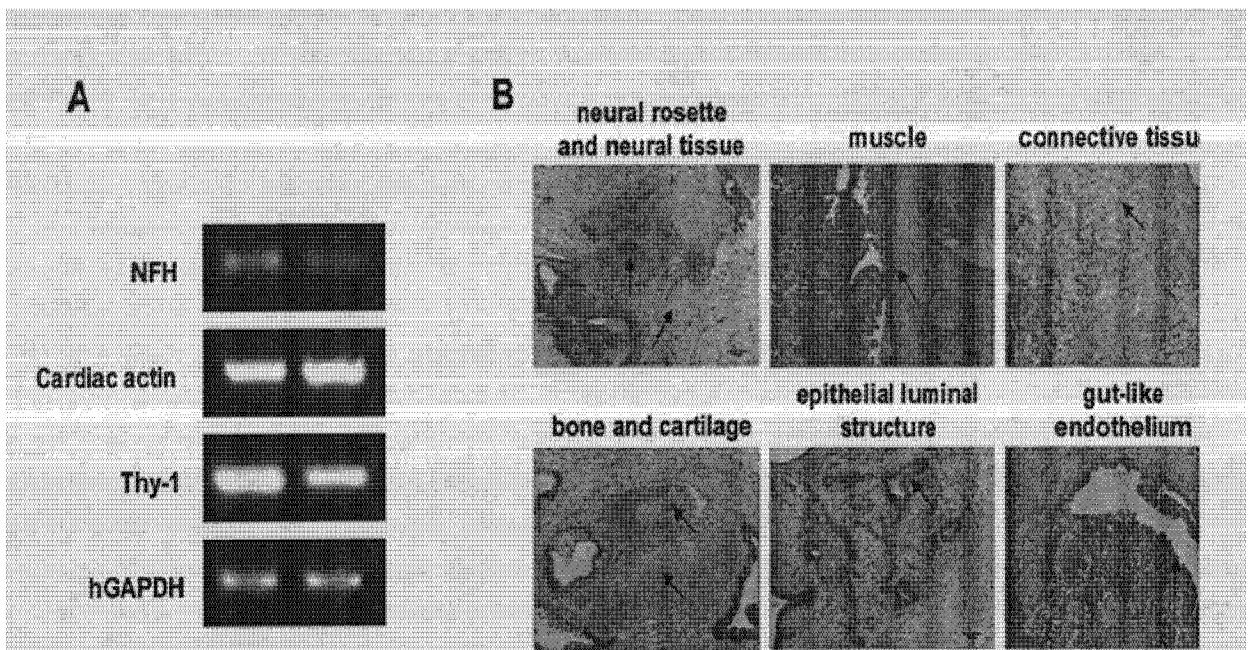


图 4

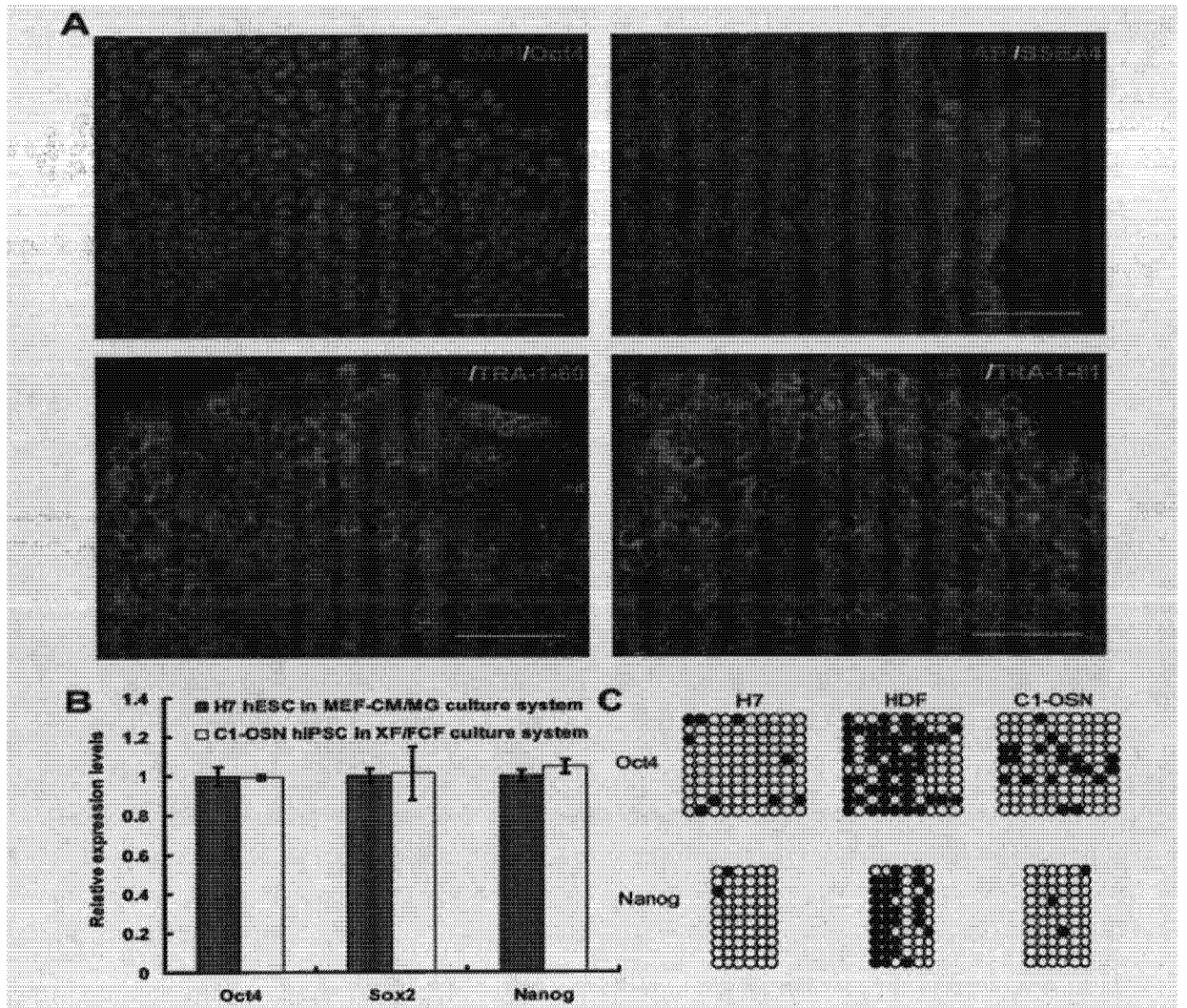


图 5

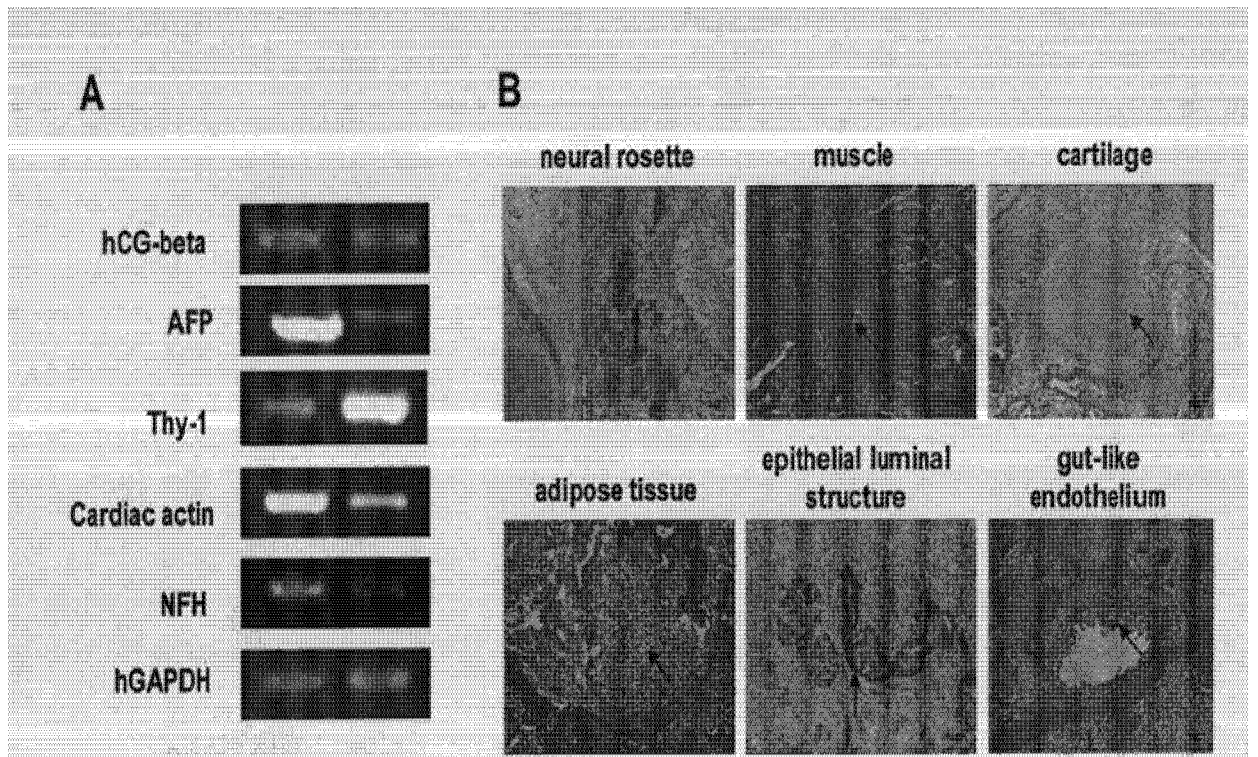


图 6