

建立绿色荧光蛋白标记的小鼠胚胎干细胞系及向心肌样细胞的分化

姜祖韵^{1*} 袁毅君^{1,2*} 陈良标³ 陆永良⁴ 姚行⁴ 戴利成⁴ 张铭^{1*}

¹(浙江大学生命科学院, 杭州 310012)

²(天水师范学院生命科学与化学学院, 天水 741000)

³(中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

⁴(浙江省湖州市中心医院, 湖州 31300)

摘要 带有 GFP 基因的 ES D3 细胞系是一个良好的可以用于研究体内和体外细胞分化和组织产生的模型。用磷酸钙共沉淀法将质粒 pEGFP-N2 导入小鼠胚胎干细胞 D3 细胞系中, 在荧光显微镜下以 488nm 激发光检查阳性克隆, 并进行初步扩增。经 G418 筛选后, 机械挑取 EGFP 强阳性表达的克隆, 并在丝裂霉素 C 处理的小鼠胚胎成纤维细胞的饲养层上, 在无选择性压力的条件下, 进一步扩大培养, 获得纯化的转染细胞系。20 代以后, 转染细胞仍然表达绿色荧光蛋白。PCR 检测表明 8 代和 18 代转染细胞均携带有 GFP 标志基因。对稳定表达 EGFP 的干细胞系进行碱性磷酸酶染色、拟胚体和畸胎瘤形成的检测, 证明这些细胞具有干细胞的特征。经拟胚体, 可进一步分化成具有搏动能力的心肌细胞, 分化百分率为 30% ~ 40%, 较未转染细胞 60% ~ 70% 的分化率低, 造成低分化率机制还不清楚。这些细胞在激光共聚焦显微镜下呈绿色荧光, 免疫组化染色显示具心肌细胞特异的 cTnT 分子标志。该 EGFP 标记的干细胞系带有可进行原位、实时检测的绿色荧光, 可应用于细胞移植和体内分化的研究。

关键词 小鼠胚胎干细胞, 绿色荧光蛋白, 转染, 分化, 心肌细胞

中图分类号 Q813 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0890-06

收稿日期: 2004-04-06, 修回日期: 2004-06-18。

基金项目: 浙江省重大项目 (No. J 20020579-30116) 湖州中心医院合作项目 (No. H20010984-32536), 陈良标教育部优秀青年教师奖。

* 通讯作者。 Tel: 86-571-88273423; Fax: 86-571-88273423; E-mail: zhangming_ls@zju.edu.cn

† 姜祖韵、袁毅君为共同第一作者。