

三胚层分化实验操作步骤

一、细胞复苏

- 1、干冰中取出细胞，迅速将冻存管 1/2 下部没入水浴锅中，轻柔晃动 1-2 min 至管中仅剩一小块冰取出；
- 2、转移至装有 10 mL DPBS 的 15 mL 离心管中，300 rcf 离心 5 min；
- 3、吸弃上清，1 mL PR 重悬，备用。

二、种板培养

- 1、提前在 24 孔板中(内、中胚层一块板，外胚一块板)，每孔加入 0.5 mL Matrigel 铺板液，培养箱孵育至少 30 min；
- 2、取出吸弃上清，每孔加 0.5 mL PR 复苏液；
- 3、每孔加入 100 μ L 细胞悬液，晃匀，培养箱中培养 24h；
- 4、取出吸弃上清，加入 0.5 mL DPBS 清洗 1 次，吸弃上清，加入 0.5 mL StemFlex 完全培养基，放入培养箱再次培养 24h 后，开始分化。

三、三胚层分化

- 1、每天取出 24 孔板，每孔对应加入 0.5 mL 内、中、外三胚层分化液；
- 2、内、中胚层培养 5 天，固定待用；
- 3、外胚层培养 7 天。

四、荧光染色

- 1、细胞培养箱中取出 24 孔板，吸弃三胚层分化液，每孔加入 500 μ L DPBS 静置清洗 1 min；
- 2、吸弃 DPBS，每孔加入 500 μ L 4% PFA（多聚甲醛）室温固定 15 min；
- 3、吸弃 PFA，每孔加入 500 μ L DPBS 清洗，洗三次，每次 5 min；
- 4、吸弃 DPBS，每孔加入 500 μ L 0.2% Triton X-100（用 1% BSA 配制）室温破膜 15 min；
- 5、吸弃 Triton X-100，每孔加入 500 μ L DPBS 清洗，洗三次，每次 5 min；

- 6、一抗孵育：吸弃 DPBS，每孔加入预先配制好的 200 μ L 的三胚层一抗稀释（内胚：AFP，1: 200；中胚：Brachyury，1:200；外胚：Pax-6，1:200）；4 孵育过夜；
- 7、取出 24 孔板，吸弃一抗工作液，每孔加入 500 μ L DPBS 清洗，洗三次，每次 5 min；
- 8、二抗孵育（此步开始需要避光操作）：吸弃 DPBS，每孔加入 200 μ L 二抗工作液（Donkey anti-Mouse 和 Donkey anti-Rabbit，1: 1000），室温孵育 2 h。
- 9、吸弃二抗工作液，每孔加入 500 μ L DPBS 清洗，洗三次，每次 5 min；
- 10、吸弃 DPBS，每孔加入 200 μ L Hoechst（1:1000）染核，室温孵育 30 min；
- 11、吸弃 Hoechst 工作液，每孔加入 500 μ L DPBS 清洗，洗三次，每次 5 min
- 12、吸弃 DPBS，每孔加入 500 μ L DPBS 浸泡；
- 13、使用荧光显微镜进行拍照，保存图片。

注意：

- 1、抗体（一抗和二抗）需要用 1% BSA 配制；
- 2、二抗开始需避光；
- 3、中胚层的二抗是兔源二抗，内胚和外胚的则是鼠源二抗；
- 4、分装的抗体量较少，使用前需快速离心。