

昆明小鼠 ES 细胞的分离培养及鉴定

张廷龙¹, 董傲娟^{*}, 柏学进², 赵晶², 岳福杰³, 史文升³, 龚直超³

(1. 青岛农业大学动物胚胎工程中心, 山东青岛 266109; 2. 西北农林科技大学, 陕西杨凌 712100; 3. 荣成市出入境检验检疫局, 山东荣成 265300)

摘要 [目的] 摸索一种适合昆明小鼠 ES 细胞分离培养的方法, 以提高昆明小鼠 ES 细胞的建系率。[方法] 分别采用 5 种方法分离 ICM 和 ES 细胞集落, 摸索了以 BMSGs 作为饲养层时, 丝裂霉素处理的合适时间。[结果] 连续消化法要明显好于其他 4 种方法。MMC 处理 BMSGs 1、1.5、2 h 时效果较好, 3 个时间点无显著差异 ($P > 0.05$)。mMEF 作为饲养层与 BMSGs 作为饲养层时获得 5 代 ES 细胞相比差异不显著 ($P > 0.05$)。[结论] 连续消化法分离 ES 细胞效率较高, 饲养层采用 MMC 处理 1~2 h 的 BMSGs 饲养层或常规 mMEF 饲养层对昆明小鼠 ES 细胞无明显影响。

关键词 昆明小鼠; ES 细胞; BMSGs; ICM

中图分类号 S865.1+3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)13-05380-04

Isolation Culture and Identification of ES Cells in Kunming Mouse

ZHANG Tinglong et al (Animal Embryonic Engineering Center, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109)

Abstract [Objective] The purpose was to grope a method suitable for the isolation culture of ES cells in Kunming mouse so as to enhance their line-building rate. [Method] ICM and ES cell colonies were isolated by 5 methods separately and the suitable treating time of mitomycin C (MMC) with BMSGs as feeder layer was found out. [Result] The continuous digestion was better than the other 4 methods significantly. The effects of treating BMSGs by MMC for 1, 1.5 and 2.0 h were better and there was no significant difference among the three time points ($P > 0.05$). With mMEF and BMSGs as feeder layers, among the obtained 5th generation ES cells, there was no significant difference ($P > 0.05$). [Conclusion] The continuous digestion was higher efficient in isolating ES cells. Whether the feeder layer was BMSGs treated by MMC for 1~2 h or was the conventional mMEF, it had no significant influence on ES cells in Kunming mouse.

Key words Kunming mouse; ES cells; BMSGs; ICM

ES 细胞是从桑椹胚、囊胚 ICM 或胎儿原始生殖嵴中分离、经体外抑制分化培养获得的细胞系^[1]。它是一种高度未分化的、具有多发育潜能的细胞^[2], 可在体外培养、扩增、建系, 也可在适当条件下诱导分化为多种组织细胞^[3], 还可与受体胚胎嵌合, 形成嵌合体^[4]。自 Evans^[1] 和 Martin^[5] 分别从小鼠早期胚胎中分离培养并成功建立 ES 细胞系以来, 建立适合 ES 细胞分离培养的体系一直是研究的重点。目前, 用于小鼠 ES 细胞研究的品系主要是 129、BALB/C 和昆明小鼠品系, 但昆明小鼠 ES 细胞一直存在着不易传代、容易丢失等缺点。该试验旨在摸索一种适合昆明小鼠 ES 细胞分离培养的方法, 以提高昆明小鼠 ES 细胞的建系率。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验材料。试验采用 6~8 周龄的昆明小鼠(购自山东大学实验动物中心), 室温喂料, 常规饮水。

1.1.2 试剂。H DMEM 培养基(Gbco 公司)、L DMEM 培养基(Gbco 公司)、胎牛血清(FBS, Hydome 公司)、L- 巯基乙醇(Sigma 公司)、非必需氨基酸(Sigma 公司)、白血病抑制因子(LIF, Oncogene 公司)、孕马血清绒毛膜促性腺激素(PMSG, 杭州动物药品厂)、人绒毛膜促性腺激素(hCG, 丽珠集团)、Dulbecco's 磷酸盐缓冲液(Sigma 公司)、MMC(Kyova Hakkō Kogyo 公司)、胰蛋白酶(Sigma 公司)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA, 天津博迪化工有限公司)、两性霉素 B(Sigma 公司)、双抗(青霉素各 100 IU/ml, Sigma 公司)、碱性磷酸酶(AKP) 染色试剂盒(南京建成生物工程研究所)、二甲基亚砷(Sigma 公司)、全反式维甲酸(L-RA, Sigma 公司)、L- 谷氨酰胺(Sigma 公司)、

秋水仙胺(Sigma 公司)。

1.1.3 培养液。

1.1.3.1 MEF 培养液。L DMEM + 10% FBS + 100 IU/ml 青霉素 + 100 IU/ml 链霉素。

1.1.3.2 ES 细胞培养液。H DMEM + 15% FBS + 1% 非必需氨基酸 + 0.1 mmol/L - 巯基乙醇 + 0.1 mmol/L LIF + 1% L- 谷氨酰胺 + 5.6 ng/L 两性霉素 B + 1 000 IU/ml LIF + 100 IU/ml 青霉素 + 100 IU/ml 链霉素。

1.1.3.3 BMSGs 培养液。L DMEM + 12% FBS + 1% 谷氨酰胺 + 100 IU/ml 青霉素 + 100 IU/ml 链霉素。

1.1.3.4 ES 细胞诱导液。85% H DMEM + 15% FBS + 1.2×10^{-6} mol/L L-RA + 100 IU/ml 青霉素 + 100 IU/ml 链霉素。

1.2 方 法

1.2.1 超排处理。选健康的性成熟昆明母鼠于 16:00~16:30 腹腔注射 PMSG 7.5 IU 只, 48 h 后再腹腔注射 hCG 7.5 IU 只, 并与有生育能力的昆明公鼠按 1:1 合笼。次日 9:00 前观踣母鼠阴道栓(乳白色或蛋黄色胶冻状物), 见栓即定为妊娠 0.5 d。

1.2.2 MEF 饲养层的制备。将妊娠 13.5 d 母鼠处死, 在无菌条件下分离子宫。用含有双抗的生理盐水冲洗子宫, 直至无血迹。在超净工作台中, 无菌取出胎儿, 去头、尾、内脏和四肢。将剩余的躯干部置于青霉素瓶中, 加入 4 ml 含双抗的 PBS, 反复清洗几次, 直至无血迹。将洗净的躯干部剪碎($< 1 \text{ mm}^3$), 置于 0.25% 胰酶-0.04% EDTA 37℃ 消化 30 min, 过双重 200 目滤网。将滤液转移至 15 ml 离心管中, 80 g 离心 5~10 min, 弃上清液。重复此过程 3~4 次, 以洗去小血块以及其他杂质, 直至沉淀呈乳白色为止。然后加入 4 ml 左右培养液, 重新制成细胞悬液, 以 1×10^6 个/cm² 的密度接种在 35 cm² 培养皿。置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的 CO₂ 培养箱内培养, 0.5~1 h 半量换液, 有助于纯化 MEF。24 h 全量换液。

基金项目 青岛市科技将才项目(2005620313)。

作者简介 张廷龙(1983-), 男, 山东莒县人, 硕士研究生, 研究方向: 胚胎工程与胚胎干细胞体外分离培养及鉴定。* 通讯作者。

收稿日期 2008-03-03

培养4~5 d 至细胞长满后即为原代成纤维细胞(Primary Mouse Embryonic Fibroblast, PMEF)。将生长良好的PMEF用胰酶消化传代,5代内均可用于制备饲养层(如图1)。制备MEF饲养层前1 d 更换新鲜培养液。制备MEF饲养层时加入含10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MMC的培养液,处理1.5~2 h后,用PBS⁻充分洗涤,过夜后即可使用。

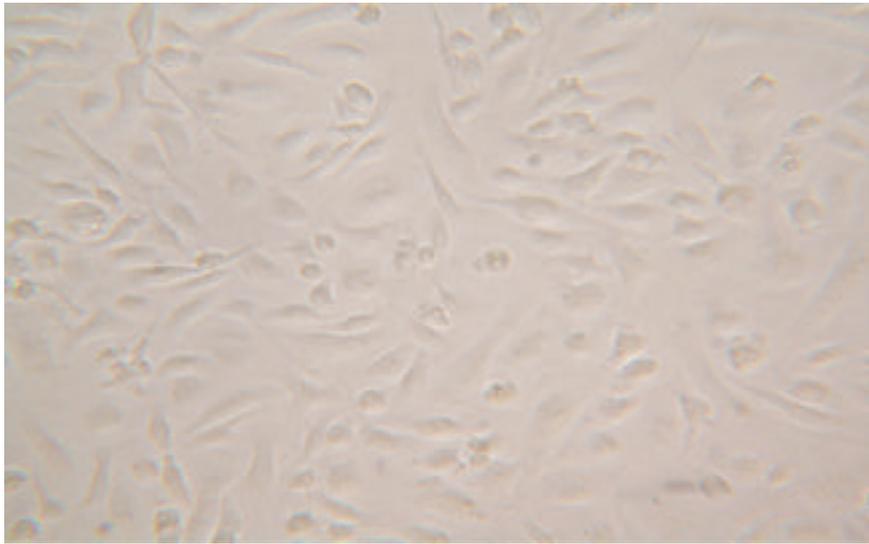


图1 纯化的MEF(100 \times)

Fig.1 Purified MEF

1.2.3 BMSGs 饲养层的制备。牛骨髓间充质干细胞(Bovine Marrow Mesenchymal Stem Cells, BMSGs)是由青岛农业大学动物胚胎中心提供。将纯化融合好的BMSGs(如图2)消化接种,再次融合后用MMC处理1~2 h,过夜后即可作为饲养层使用。接种ES细胞前4 h 换为ES细胞培养液。

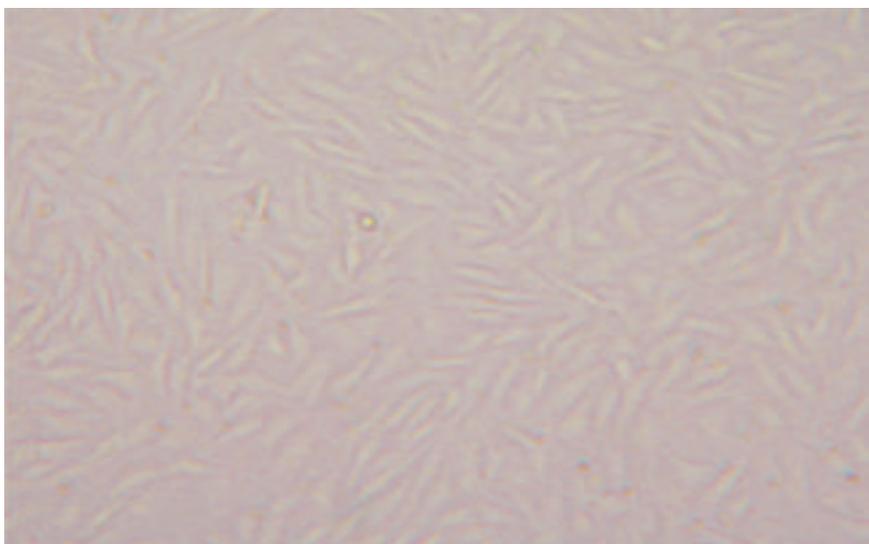


图2 纯化的bBMSGs(100 \times)

Fig.2 Purified bBMSGs

1.2.4 ES 细胞的分离培养。

1.2.4.1 胚胎的获得及孵化。取妊娠3.5 d 的母鼠断颈处死,无菌取出子宫,然后用含双抗的PBS⁻液从子宫角冲出胚胎。在体视镜下选择优质的囊胚或桑椹胚。将挑出的胚胎置于饲养层上,放入37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂培养箱中进行培养,每天观察1次并换液。

1.2.4.2 ES 细胞的分离培养。在直径为3.5cm的培养皿内做几个消化液小滴,同时在另一个培养皿中做几个ES细胞培养液小滴。在Mitic体视镜下,用口吸管连接自制的玻璃微针小心挑起ICM,并吸至消化液小滴内,作用1~2 min后,轻轻吹吸ICM,使之分散成细胞小团块。重复以上步骤直至ICM完全消化。将消化好的细胞小团块接种于新的饲养层上。前3代消化成较大细胞团块(50~100细胞),以后传代消化成小团块细胞后,接种在饲养层上。

1.2.5 ES 细胞的鉴定。

1.2.5.1 形态观察。在倒置显微镜下观察ICM和ES细胞集落的形态,观察其特征。

1.2.5.2 碱性磷酸酶(AKP)染色。按照AKP试剂盒说明书,清洗细胞后加入固定液对细胞进行固定5~10 min,向培养皿中加入底物液,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用15 min。用苏木精复染10 min后,水洗,凉干。

1.2.5.3 染色体核型分析。ES细胞培养到第3代时,分析ES细胞核型。取ES细胞集落,胰蛋白酶消化,微细管分散,接种在无饲养层细胞的35 mm的培养皿中。2~3 d后,在培养皿中加秋水仙胺,终浓度为0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 处理3~4 h;胰蛋白酶消化后,收集在试管中,80 g离心5 min,去上清;然后在每个试管中加5 ml 0.075 mol/L KCl,在37 $^{\circ}\text{C}$ 低渗处理30 min;加2~3滴冷的甲醛-冰醋酸液(3:1)预固定;80 g离心10 min后,去上清;在每个试管中加入冷的甲醛-冰醋酸固定液2 ml,固定15 min后,80 g离心10 min,去上清。重复固定,共进行3次。去掉上清液后,加几滴冷的固定液,混匀,然后滴在4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的玻片上,空气干燥;显微镜下计数每个分裂相的染色体数量,并计算细胞整二倍体染色体的百分率。

1.2.5.4 体外分化能力。将第3代ES细胞消化成单细胞,添加诱导液后进行培养,2 d换1次液;1个星期以后改为不含L RA的ES细胞培养液,同样2 d换1次液。将第3代ES细胞集落接种在衰老的饲养层上进行培养。

1.3 数据处理 所得数据采用t检验进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 昆明小鼠胚胎ICM的生长行为 从小鼠子宫内取出的3.5 d的囊胚(如图3a),经过12~24 h囊胚腔扩大,发育成扩张囊胚(如图3b),ICM集中于扩张囊一侧。24~48 h,大部分胚胎脱去透明带(如图3c),ICM一侧开始附着于饲养层上,附着面积逐渐扩大直至整个胚胎都贴壁。4~5 d,ICM充分增殖成为圆柱状、岛屿状结构。

2.2 形态学观察及AKP染色 分离得到的ES细胞集落,细胞体积小,细胞核大,胞质少,核质比高,细胞界限不明显,符合ES细胞的形态学特征(如图4a、4b)。所得的第5代ES细胞集落AKP染色后再用苏木精复染,ES细胞集落呈粉红色,MEF饲养层不着色或浅着色(如图4c)。

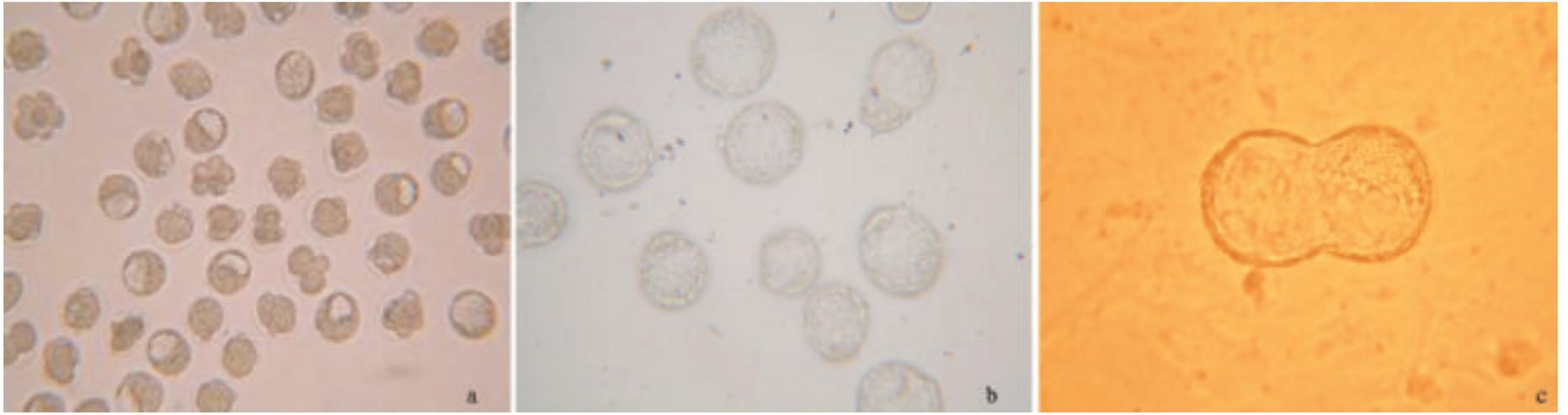
2.3 ES 细胞的核型分析 对所得第5代ES细胞集落进行核型分析,核型分析结果显示:具有正常的昆明小鼠20对染色体核型,正常二倍体核型率为89%,所得ES细胞性染色体为XY型(图5、6)。

2.4 消化方法对昆明ES细胞分离培养的影响 由表1可知,采用连续消化法和机械分离+酶消化法时,形成的ES细胞克隆率、传至5代的效率要明显高于其他3种方法。对于连续消化法和机械分离+酶消化法之间,细胞克隆率差异极显著($P < 0.01$),传至5代的克隆率差异也极显著($P < 0.01$)。利用连续消化法相对机械分离+酶消化法ICM形成ES细胞克隆的比率大为提高(52.4%,70.8%),同时也提高了ES细胞传至5代的克隆率(4.8%,10.4%)。

2.5 MMC处理BMSGs对ICM形成率的影响 将第3代纯化的BMSGs分6个组,用10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MMC处理的时间分别为

0、0.5、1、1.5、2、2.5 h。处理完后用 PBS⁻ 清洗干净,用前4 h 加 ES 细胞培养液,然后对胚胎进行孵化培养,结果如表2 所示:在孵化率、贴壁率方面6 组没有明显差异($P > 0.05$),而在 ICM 形成率方面0、0.5 h 之间差异不显著($P > 0.05$);1、

1.5、2 h 间差异不显著($P > 0.05$);1、1.5、2 h 要明显好于0、0.5、2.5 h 组,差异极显著($P < 0.01$);2.5 h 组效果要好于0、0.5 h 组,差异显著($P < 0.05$)。试验证明用 MMC 对 BMSCs 处理时间为1~2 h 时有利于 ICM 形成。

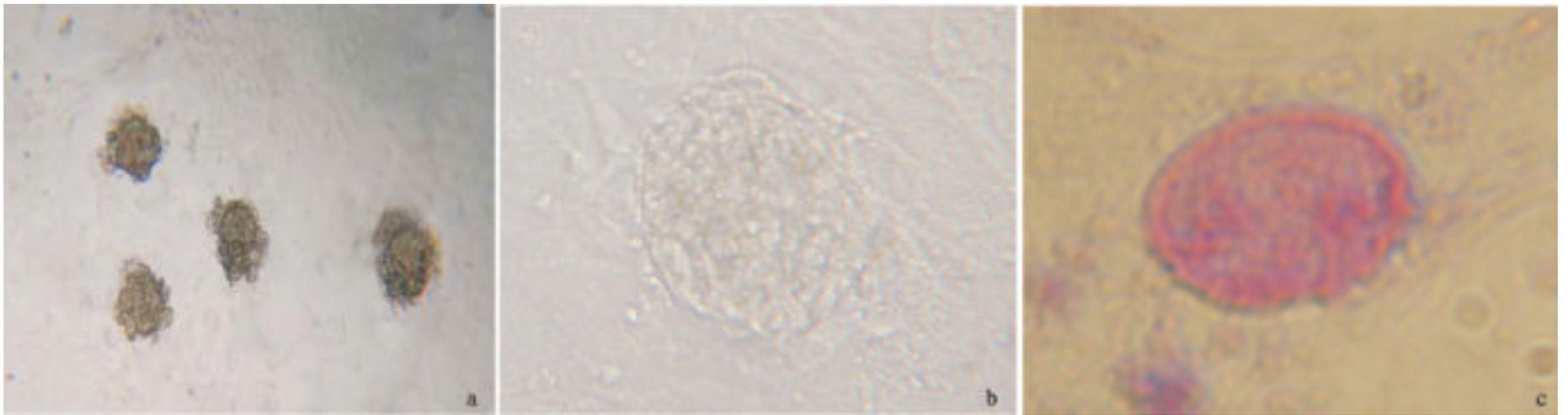


注:a、b、c 分别为胚胎(100 ×)、扩张囊胚(40 ×)、正在脱出的囊胚(100 ×)。

Note :a,b,c denote embryos (100 ×), expanded blastula (40 ×) and hatching blastula (100 ×), respectively.

图3 昆明小鼠胚胎 ICM 的生长发育

Fig.3 The growth and development of embryos ICM of Kunming mouse



注:a、b、c 分别为第2 代 ES 细胞形成的多个集落(100 ×)、MEF 上的第5 代 ES 细胞集落(200 ×)、ES 细胞集落的 AKP 染色(200 ×)。

Note :a,b,c denote the second passage colonies (100 ×), the fifth passage ESC on MEF (200 ×) and AKP staining of ESC, respectively.

图4 ES 细胞形态学特征

Fig.4 Morphological characteristics of ESC

纤维样细胞(如图7c)等。

表1 不同消化方法对昆明 ES 细胞分离培养的影响

Table 1 Effects of different digestion methods on the KM mES cell colony

消化方法 Digestion method	离散的 ICM Straggling ICM	ES 细胞克隆数 (率) Rate of ES done %	传至5 代的克隆 (率) Rate of the fifth passage %
连续消化法 Continuous digestion	48	70.8	10.4
一次消化法 One time digestion	30	26.7	0
连同饲养层一起消化 Digestion with feeder layer	22	13.6	0
机械消化法 Mechine digestion	26	38.5	0
机械分离+ 酶消化法 Mechine isdation + digestion with trysin	42	52.4	4.8

注:采用的酶浓度为0.02%胰酶-0.008%EDTA。

Note :Enzyme concentration was 0.02% pan creatin - 0.008% EDTA .

3 讨论

在试验中发现昆明小鼠胚胎多、生长快,但分离克隆 ES 细胞的效率低,形成的 ES 细胞集落很不稳定、极易分化,单个细胞传代后不易形成集落,5 代以后 ES 细胞的集落数迅速



图5 ES 细胞染色体

Fig.5 Chromosome of ESC

2.6 不同饲养层对昆明小鼠 ES 细胞培养的影响 MEF 组:收集48 枚昆明小鼠胚胎,其中囊胚39 枚,桑椹胚9 枚;BMSCs 组:收集29 枚昆明小鼠胚胎,其中囊胚23 枚,桑椹胚6 枚。分别对这2 组进行 ES 细胞分离培养,结果显示2 种不同饲养层对昆明小鼠 ES 细胞的培养差异不显著($P > 0.05$) (表3)。

2.7 ES 细胞体外分化 在含有 L RA 的诱导液培养的 ES 细胞中,少量 ES 细胞分化成神经胶元(如图7a)。在衰老饲养层中培养的集落容易分化成网状上皮样细胞(如图7b)、成

减少。1991年,Engler等研究发现小鼠胚胎细胞在胚胎发育的3.5~6.5 d在原始外胚层细胞中存在品系特异的甲基化^[6-7]。这种各品系小鼠原始胚胎外胚层细胞特异的甲基化状态可能影响ES细胞的分离培养^[8]。



图6 ES 细胞核型
Fig.6 Karyotype of ESC

表3 不同饲养层对昆明小鼠ES 细胞培养的影响

Table 3 Effects of different feeder layer on culturing ESC

分组	胚胎数	孵化率	贴壁率	ICM形成率	最高传代数	克隆率
Group	No. of embryo	Hatchability	Rate of adherence	Rate of ICM	The highest passage	Clone rate
mMEF 组 Group of mMEF	48	91.7 a	89.6 a	81.3 a	5	10.4 a
bBMSG 组 Group of bBMSGs	29	89.7 a	89.7 a	79.3 a	5	10.3 a

注:相同字母之间差异不显著($P > 0.05$)。

Note: The same letters mean not significantly different ($P > 0.05$).



注:a,b,c 分别为神经胶质样细胞(400 ×)、网状上皮样细胞(200 ×)、成纤维样细胞(200 ×)。

Note:a,b,c denote neuroglia-like cells (400 ×),reticular-epithelioid-like cells (200 ×) and fibroblast-like cells (200 ×),respectively.

图7 ES 细胞体外分化

Fig.7 Differentiation of ESC in vitro

影响,其中连续消化法和机械分离+酶消化方法比较好。而2种方法比较,连续消化法又明显好于机械分离+酶消化法,差异极显著($P < 0.01$)。其原因可能是由于采用连续消化法时,ES细胞在酶中间隔性停留,每次消化时间相对较短,细胞受损害较小。由试验结果可知,在同一消化液浓度下,连续消化法有明显优点。机械分离+酶消化方法可以将大集落通过机械方法切割成较小的集落。切割后通过酶的消化,将集落周围的已发生隐蔽性定型或已发生分化的细胞吹打掉,减小隐蔽性定型或已经发生分化的细胞对未发生分化的细胞的诱导作用,保持ES细胞集落的未分化特性。但其对ES细胞造成一定的物理伤害,这可能是其效果比连续消化法差的一个原因。

BMSGs本身也是一种多能性干细胞,能够无限增殖,也能分泌干细胞因子。在ES细胞的分离培养过程中,饲养层起到促进ES细胞生长抑制其分化的作用,但也不可避免异

表2 MMC 处理bBMSGs 对ICM形成率的影响

Table 2 Effects of handling bBMSGs with MMC on ICM forming rate

处理时间	处理胚胎数	孵化率	贴壁率	ICM形成率
Handling time h	No. of embryo	Hatchability %	Rate of adherence %	Rate of ICM %
0	19	89.5 a	89.5 a	21.1 aA
0.5	13	92.3 a	92.3 a	23.1 aA
1	24	91.7 a	91.7 a	83.3 bB
1.5	29	89.7 a	89.7 a	79.3 bB
2	22	90.9 a	90.9 a	81.8 bB
2.5	17	82.4 a	76.5 a	47.1 bA

注:不同大、小写字母表示差异在0.01,0.05水平显著。

Note: Different lowercase and capital letters mean significantly different at 0.01 and 0.05 level, respectively.

在ES细胞建系过程中,ES细胞的传代是关键。在消化方式上,比较了5种消化方式对ES细胞集落形成和传代的

%

在ES细胞建系过程中,ES细胞的传代是关键。在消化方式上,比较了5种消化方式对ES细胞集落形成和传代的

%

在ES细胞建系过程中,ES细胞的传代是关键。在消化方式上,比较了5种消化方式对ES细胞集落形成和传代的

%

在ES细胞建系过程中,ES细胞的传代是关键。在消化方式上,比较了5种消化方式对ES细胞集落形成和传代的

体基因或同种异体基因对ES细胞的污染^[9],基于这一点,在试验中要保证饲养层的新鲜以防止饲养层细胞死亡后释放异体基因。试验中发现,利用BMSGs作为饲养层时,必须要进行丝裂酶素处理,处理的合适时间为1~2 h,未经抑制处理的BMSGs作为饲养层对胚胎进行孵化培养时发现,贴壁胚胎ICM不经过增殖就发生分化,形成可分离的ICM率很低(21.1%)。Jarg等^[10]报道,PDGF、EGF和LIF同时添加可长期维持大鼠和小鼠MSGs增殖和未分化状态。未经抑制处理的BMSGs可能其本身也能够利用培养液中的LIF,但未经证实,这可能是贴壁ICM在未经处理的BMSGs饲养层中培养时不经过增殖或经过初步增殖就发生分化的原因。目前小鼠PMEF作为饲养层细胞进行ES细胞培养时,分泌的唾液酸(Sialic Acid)已确定能够污染hES细胞^[9],而BMSGs作为一种新型的饲养层,其对hES细胞是否有污染还需要进一步的研究确定,经处理后BMSGs,在ES细胞分离培养效率方面与

栽培袋所需的时间差异显著。液体种、麦粒原种在栽培袋培养基的平均满袋时间分别为28 d 和45 d, 相差17 d; 平均出菇时间分别为48 d 和57 d, 相差9 d。无论是菌种萌发速度, 还是菌丝长势, 液体种明显优于麦粒原种(表2)。

表1 灰树花液体种和固体种在原种培养基上的生长情况

Table 1 The growth status of liquid species and solid species associated with *Gifda frondosa* on original media

菌种类型 Type of strain	菌丝萌发 Germination of mycelium d	菌丝满袋 Full of mycelium d	菌丝长势 Growth potential of mycelium	未发满瓶 Not full of bag 瓶
液体菌种 Liquid	5	26	粗壮洁白均匀 Strong, whiteness and evenness	0
固体菌种 Solid	7	41	上下不一致, 较稀疏 Unequal between up and bottom, sparse	2

表2 灰树花液体种和固体种在栽培袋培养基上的生长情况

Table 2 The growth status of liquid species and solid species associated with *Gifda frondosa* on media medium of cultivating bag

菌种类型 Type of strain	菌丝萌发 Germination of mycelium d	菌丝满袋 Full of mycelium d	菌丝长势 Growth potential of mycelium	未发满袋 Not full of bag 袋	出菇时间 Time of mushroom emergence d
液体菌种 Liquid	5	28	粗壮, 均匀, 浓密 Strong, evenness and dense	0	48
固体菌种 Solid	7	45	两端浓密, 中间稀疏 Dense in two ends, and sparse in middle	5	57

表3 灰树花液体种和固体种的栽培结果对比

Table 3 The cultivation results of liquid species and solid species of *Gifda frondosa*

菌种类型 Type of strain	原基形成袋 The bags forming primordium 袋	原基形成率 Rate of primordium formation %	出菇袋 Bags of mushroom emergence 袋	出菇率 Rate of mushroom emergence %	子实体总产量 Total yield of fruiting body g	袋平均产量 Per bag yield g	生物学效率 Biological efficiency %
液体菌种 Liquid	180	100.0	178	98.9	17 996.5	101.1	56.8
固体菌种 Solid	175	97.2	150	83.3	13 098.8	87.3	49.9

短了制种时间, 培养原种比固体种可提前15 d 长满菌瓶, 培养栽培袋可提前17 d 长满菌袋, 可提前9 d 出菇, 整个培养周期可缩短25 ~35 d。同时也避免了用母种直接制作原种上弱下强的弊端和菌丝老化结皮的现象。

(2) 通过试验研究对比得出, 灰树花液体菌种可提高生物学效率。液体菌种在培养料中, 同一时间内菌丝体扭结多, 出菇早, 转潮快, 产量高, 生物学效率提高6.9%, 出菇整齐, 便于管理。而且液体菌种取料方便, 成本低, 节约能源,

2.2 栽培产量比较 试验结果表明, 液体种、麦粒原种的栽培产量有明显差异, 袋均产量分别是101.1 g 和87.3 g, 相差13.8 g; 生物学效率分别是56.8% 和49.9%, 液体菌种的生物学效率提高6.9%(表3)。

从表1 ~3 中可以看出, 液体种较固体种在繁殖原种和栽培上都具有很大的优势。分析其原因: 一是液体菌种由菌丝球组成, 接种摇匀后菌球能较均匀地分散在培养基内, 进行多点同步生长; 二是液体菌种在发酵过程中不断提供的新鲜氧气, 可使菌丝细胞呼吸旺盛, 细胞分裂快速, 缩短了发菌时间^[3]; 三是液体菌种萌发快, 吃料能力强, 菌丝粗壮, 可提高栽培产量和生物学效率。

3 结论与讨论

(1) 通过试验研究对比得出, 灰树花液体菌种缩短了制种周期。采用液体菌种接固体原种, 菌种萌发快, 吃料能力强, 菌丝粗壮, 浓密, 长势上下均匀一致, 发菌整齐, 极大地缩

只要严格遵守无菌操作的规程, 是值得在规模化、工厂化生产上应用的一种方法, 也是一项缩短生产周期, 提高经济效益的好方法。

参考文献

- [1] 何焕清, 唐小俊, 赖穗春, 等. 灰树花高产栽培技术[J]. 广东农业科学, 2006(1): 90 - 92.
- [2] 钱友安, 曾宪森, 徐雪玲. 灰树花栽培的五个技术关键[J]. 食用菌, 2003(3): 36.
- [3] 刘新海, 王淑芳, 卜庆梅, 等. 平菇液体种与固体种使用效果对比研究[J]. 江苏农业科学, 2004(4): 90.
- [4] 王新海, 王淑芳, 卜庆梅, 等. 平菇液体种与固体种使用效果对比研究[J]. 江苏农业科学, 2004(4): 90.
- [5] MARIING R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1981, 78: 7634 - 7638.
- [6] ENGLER H, REISEN WF. Effect of thyroid function on concentrations of lipoprotein[J]. Clin Chem, 1993, 39: 2466 - 2469.
- [7] WENG X, CHENS, KUANG P. A study on the behavioral characteristic of one trial passive avoidance model in chicks[J]. Psychological Trends (in Chinese), 1995, 3(3): 51 - 55.
- [8] 王国云, 孔北华, 李栋, 等. 昆明鼠胚胎干细胞的分离培养与鉴定[J]. 山东大学学报: 理学版, 2004, 39(3): 120 - 124.
- [9] MARIIN MJ, MLOTRI A, GAGE F, et al. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid[J]. Nat Med, 2005, 11(2): 228 - 232.
- [10] YUEHUAJIANG, BALKRISHNA N, JAHAGIRDAR R, et al. Pluripotency of nascent stem cells derived from adult marrow[J]. Nature, 2002, 418: 41 - 49.

(上接第5383页)

PMEF 无明显差异。因而, BMSCs 具有一定的取代 MEF 成为 hES 细胞饲养层的潜力, 但是 BMSCs 作饲养层在分离培养 ES 细胞中的推广和应用还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] EVANS MJ, KAUFMAN MH. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos[J]. Nature, 1981, 292: 154 - 156.
- [2] WOBUS A M, KAOMEI G, SHAN J, et al. Retinoid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes[J]. J Mol Cell Cardiol, 1997, 29(6): 1525 - 1539.
- [3] GOTTLIEB DI, HUETTNER J E. An in vitro pathway from embryonic stem cells to neurons and glia[J]. Cells Tissues Organs, 1999, 165: 165 - 172.
- [4] IANNACCONE P M, TABORN G U, GARTON R L, et al. Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras[J]. Dev Biol, 1994,