



分子流行病学实验课

邓晓蓓

2018.5.23



数据计算公式

- 相对定量： $2^{-\Delta\Delta ct}$

$\Delta\Delta ct = \text{实验组 (目的ct-内参ct)} - \text{对照组 (目的ct-内参ct)}$

- 假设检测A基因，CT分别为

- 普通组/Test1：28
- 实验组1/Test2：29
- 实验组2/Test3：30

- 假设Test1为对照组（普通组）那么，相对含量为：

- 普通组/Test1：1
- 实验组1/Test2： $2^{-(29-28)} = 1/2 = 0.5$
- 实验组2/Test3： $2^{-(30-28)} = 1/4 = 0.25$



数据分析

	A基因		内参GAPDH	
Con	29.34996986		16.08675194	
	29.02635002		16.20421791	
处理组1	29.18549538		15.95644283	
	29.30354309		15.87710857	
处理组2	29.52390671		15.8971405	
	29.32778931		16.07045364	
处理组3	30.98530006		18.96869278	
	31.61320114		18.92928123	



Molecular and Cellular Pathobiology

Long Noncoding RNA *GCASPC*, a Target of miR-17-3p, Negatively Regulates Pyruvate Carboxylase–Dependent Cell Proliferation in Gallbladder Cancer

Ming-zhe Ma, Yan Zhang, Ming-zhe Weng, Shou-hua Wang, Ye Hu, Zhao-yuan Hou, Yi-yu Qin, Wei Gong, Yong-Jie Zhang, Xiang Kong, Jian-dong Wang, and Zhi-wei Quan

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3047 Published September 2016

[Article](#)[Info & Metrics](#)

Abstract

Long noncoding RNAs (lncRNA) are being implicated in the development of many cancers. Here, we report the discovery of a critical role for the lncRNA *GCASPC* in determining the progression of gallbladder cancer. Differentially expressed lncRNAs and mRNAs between gallbladder cancer specimens and paired adjacent nontumor tissues from five patients were identified and validated by an expression microarray analysis. Quantitative real-time PCR was used to measure *GCASPC* levels in tissues from 42 gallbladder cancer patients, and levels of *GCASPC* were confirmed further in a separate cohort of 89 gallbladder cancer patients. *GCASPC* was overexpressed or silenced in several gallbladder cancer cell lines where molecular and biological analyses were performed. *GCASPC* levels were significantly lower in gallbladder cancer than adjacent nontumor tissues and were associated with tumor size, American Joint Committee on Cancer tumor stage, and patient outcomes. *GCASPC* overexpression suppressed cell proliferation *in vitro* and *in vivo*, whereas *GCASPC* silencing had opposite effects. By RNA pull-down and mass spectrometry, we identified



September 2016
Volume 76, Issue 17

[Table of Contents](#)
[Table of Contents \(PDF\)](#)
[Index by author](#)



[Sign up for alerts](#)



Figure 1. GCASPC downregulation in GBC tissues

Figure 1

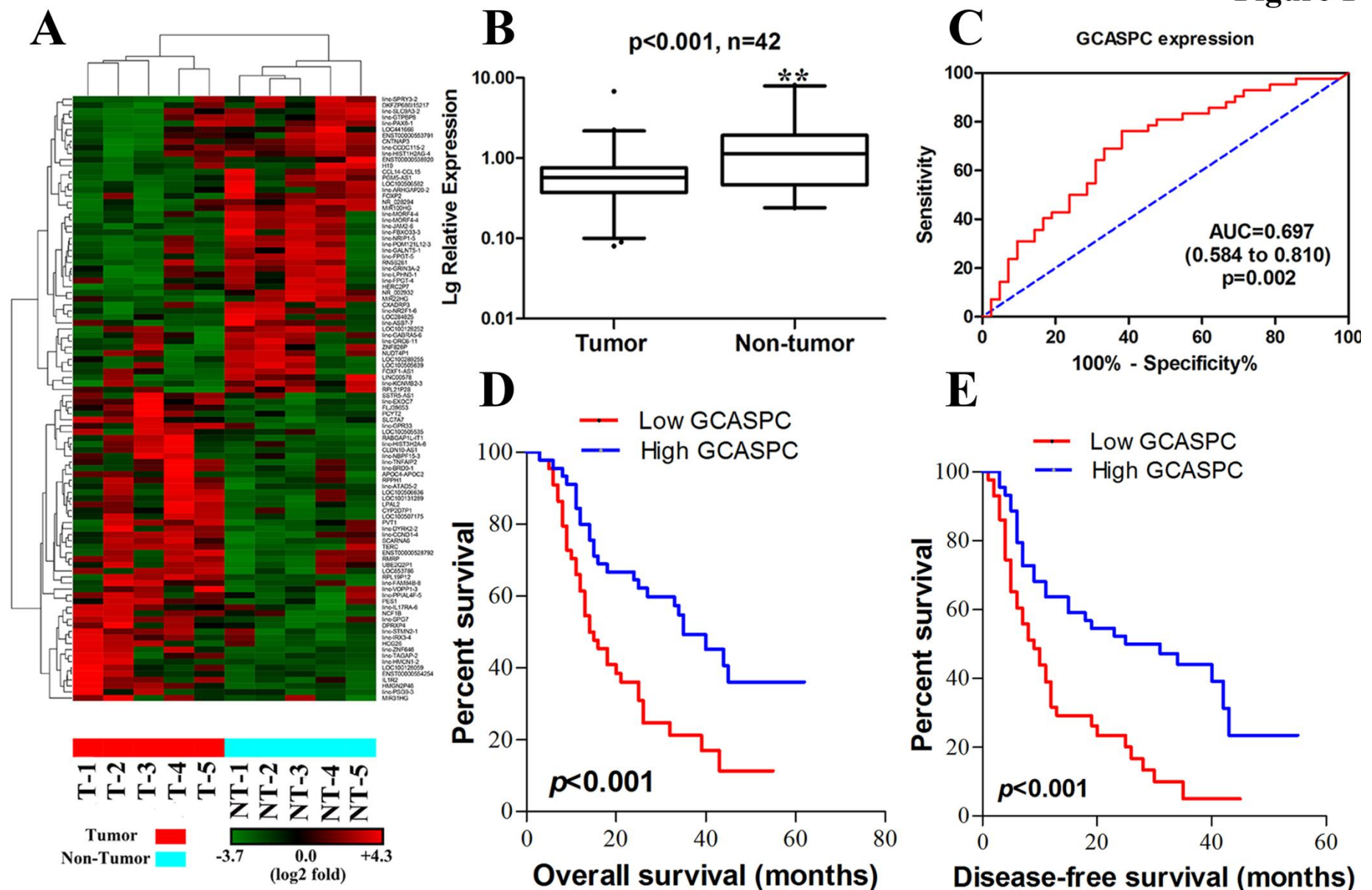




Figure 2. GCASPC inhibits GBC cell proliferation and tumor growth

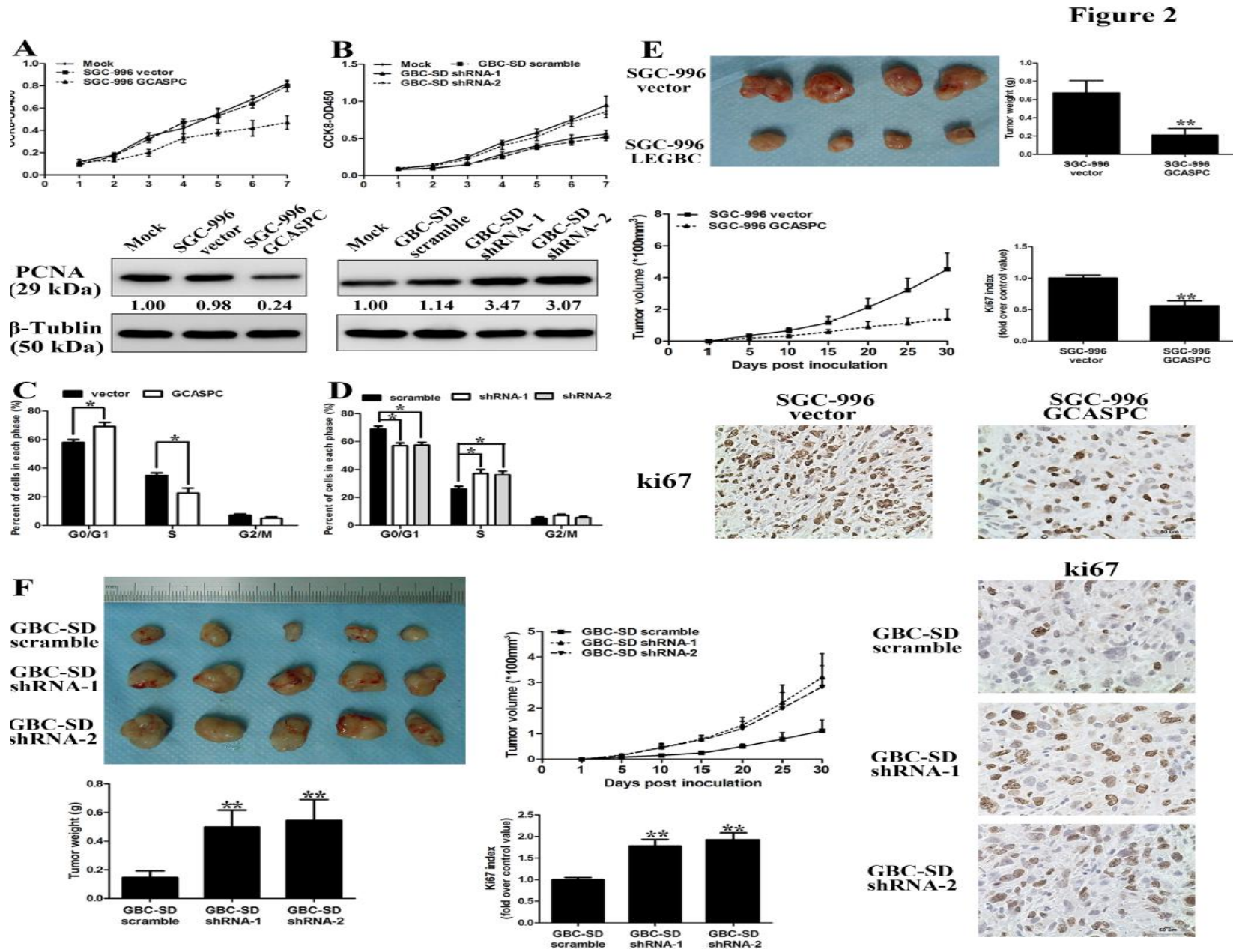




Figure 3. GCASPC binds to pyruvate carboxylase protein.

Figure 3

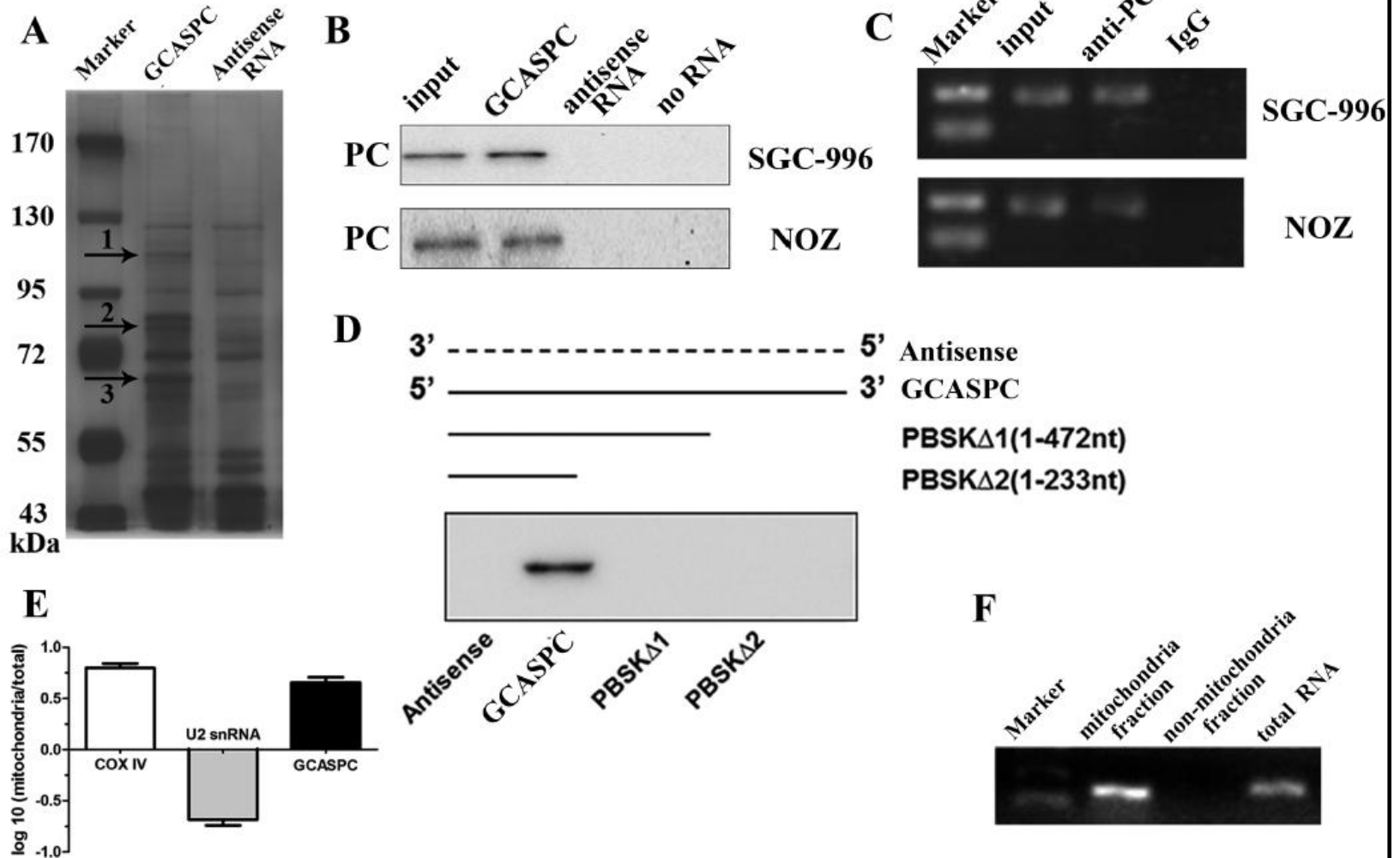




Figure 4. GCASPC decreases the protein level and activity of pyruvate carboxylase by inhibiting its protein stability.

Figure 4

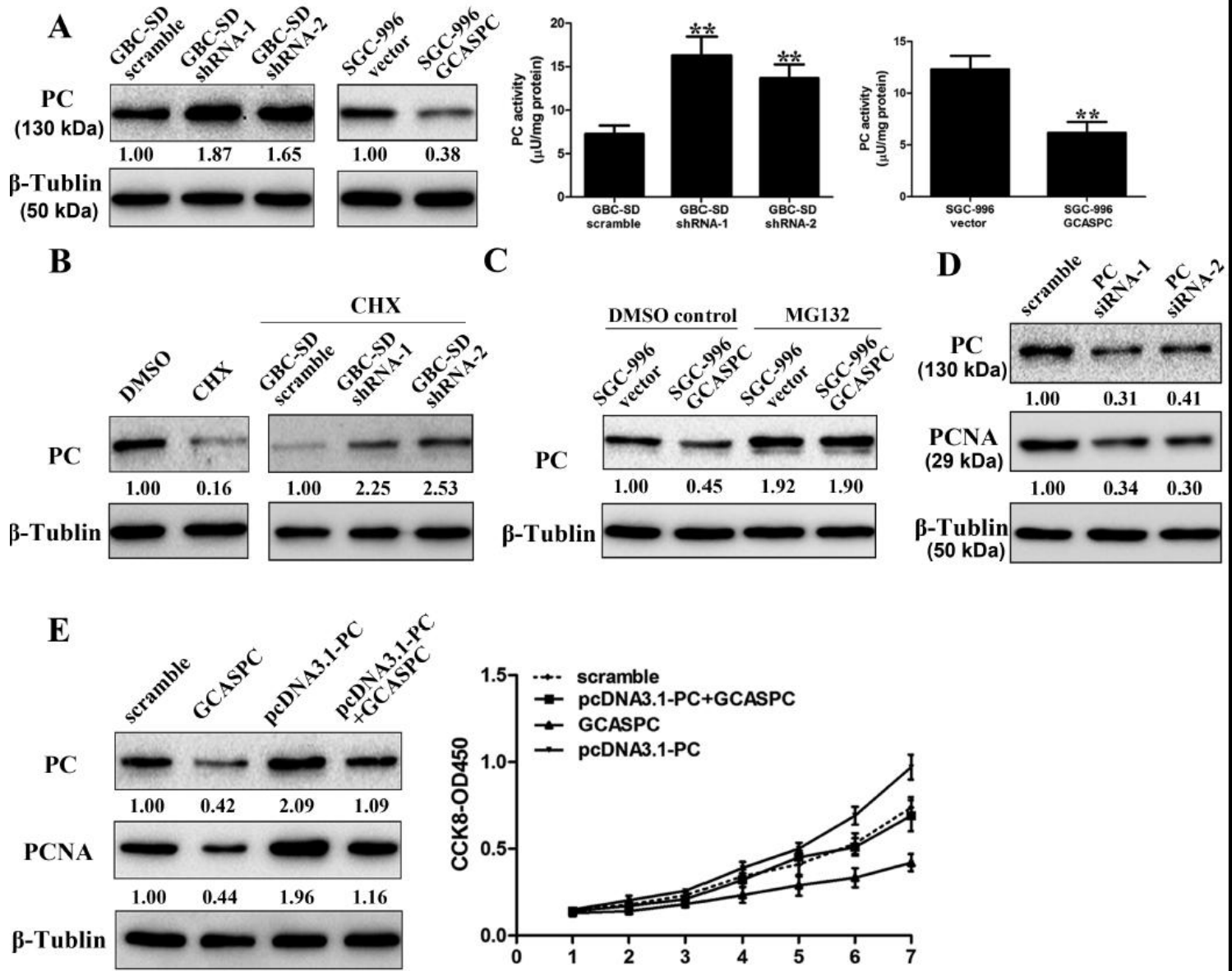
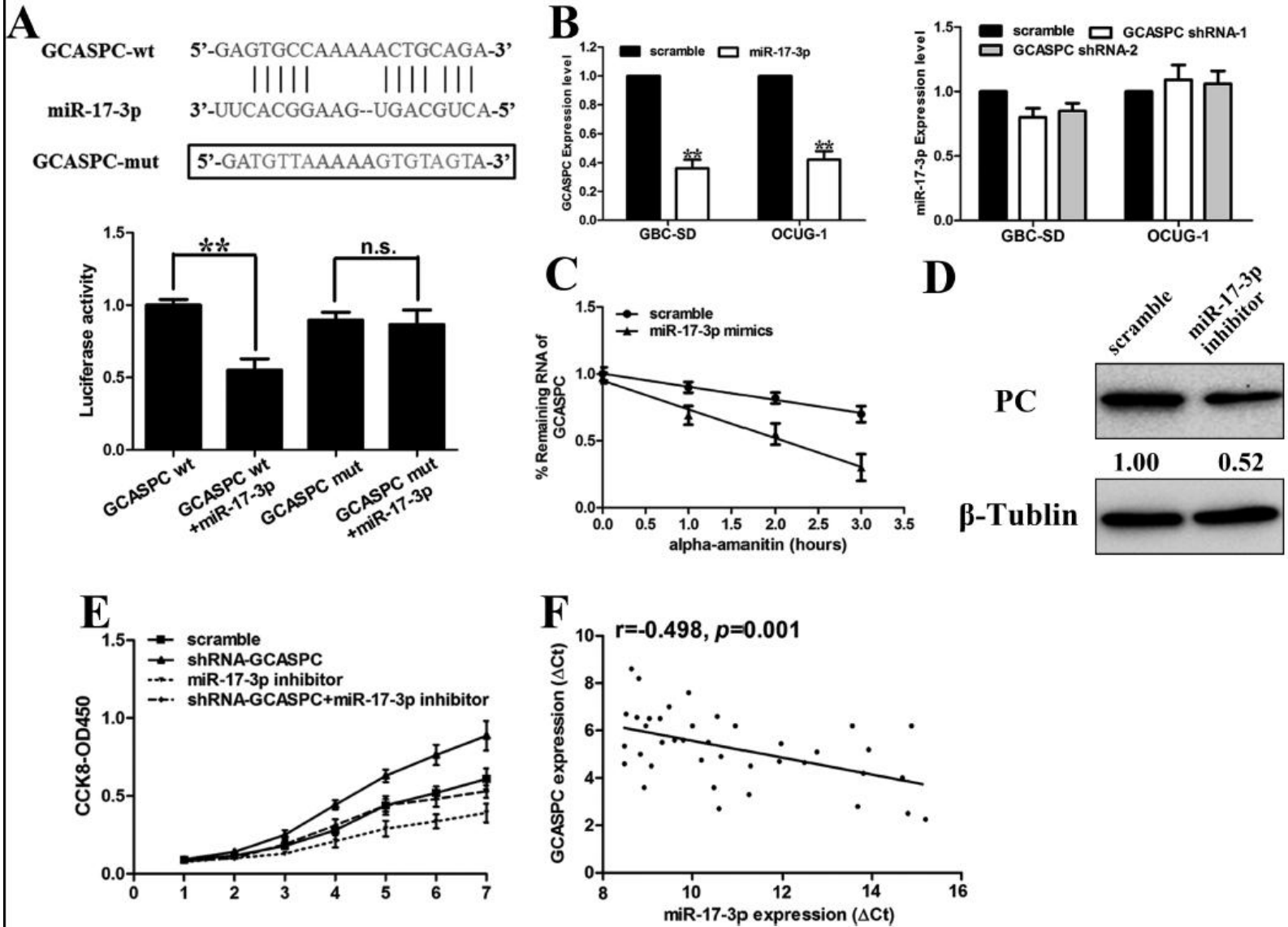




Figure 5. GCASPC is a target of miR-17-3p.

Figure 5





上海交通大学医学院
Shanghai Jiao Tong University School of Medicine

细胞的传代与培养



人体活检(或手术)材料

(1) 在准备以临床材料为实验材料时,要预先与临床外科医生和护士商量,并做好一切必要的准备工作。争取拿到的标本**新鲜、无菌、少坏死**等。

(2) 与临床联系好手术时间后,立即做好如下准备工作:准备好1-2个贮有**培养液和抗生素**的标本收集瓶,将**盖盖紧,保持无菌,瓶外贴上标签,写上工作人员名字、地点和电话号码**;将收集瓶送往医院,并与医生和护士讲清解取**手术标本的部位及注意事项**。

(3) 标本放入收集瓶后，送出手术间，立即送往组织培养实验室。工作人员最好是**等在手术间外**。但有时手术时间难以掌握。则请护士将收集材料的瓶子盖好后，放入**4°C冰箱**，尽快打电话通知工作人员。

(4) 取临床标本时，虽然尽可能做到无菌操作，但仍有污染可能性的存在。可选用**抗生素类控制污染**。如手术标本比较大（约200 mg以上），可将其浸于**70%酒精中约30-60秒**，这样会**减少表面污染**而不损坏内部组织的结构和存活。不要用纱布包裹标本，纱布纤维易粘附在组织上。



注意事项

- 整个取材过程中，都要注意保持**组织的湿润**，随时给组织块滴加一些培养液或平衡盐溶液。一般情况下，最好是使用冰冷的液体。
- 在剪碎或切割组织块时，尽量使用**锋利的刀剪**，防止以钝器对组织揉、捻、撕拉等而造成细胞损伤。
- 整个取材过程耗时越短越好。在万不得已的情况下，取材后也可将组织贮存在冷的(4°C)含平衡盐溶液(或其它缓冲盐溶液)的营养液中，最好不超过24 ~ 48 h(视不同组织类型而定)。



一、原代培养

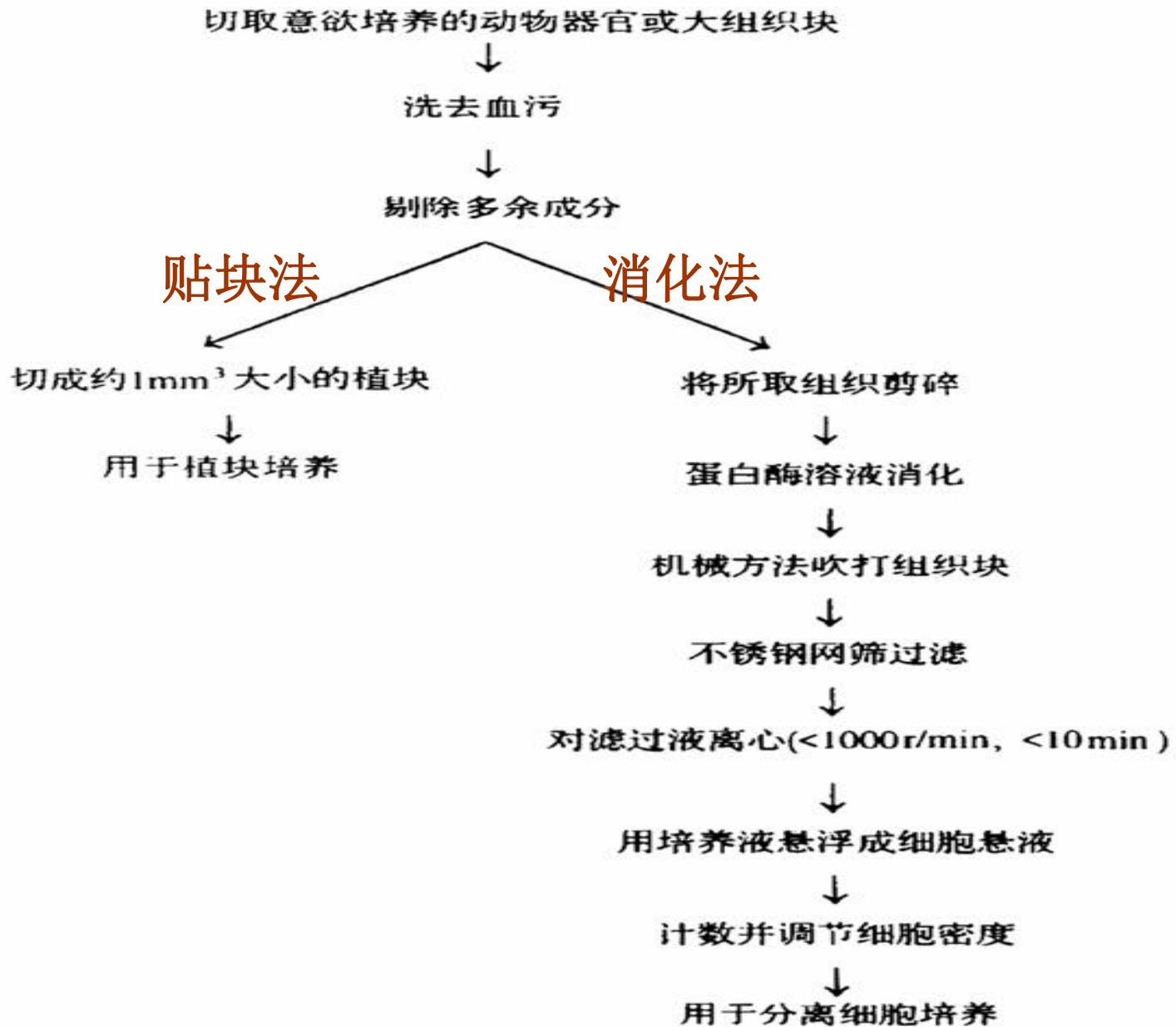
概念：取自体内新鲜组织并置于体外条件下生长的细胞在传代之前称为原代培养。

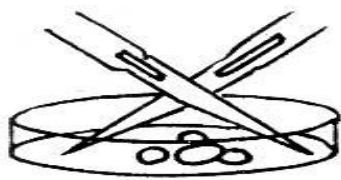


原代培养技术的重要意义

- 原代培养的最大优点是细胞刚刚离体，生物性状尚未发生很大变化，具有二倍体的遗传性，而且大多数细胞表现出原来组织的特性。
- 利用原代培养做各种实验，如药物测试、细胞分化及病毒学面的试验效果很好。
- 原代培养也是建立各种细胞系（株）必须经过的阶段。

原代培养方法分类





切成2~3mm²小块

加胰蛋白酶37℃
消化1~4小时

温消化

冷消化

加胰蛋白酶4℃
消化(6~24小时)

清洗静沉
去上清

静沉去上清

加新消化液
37℃消化
(20~30分钟)

必要可重
复时复

分次消化

滤过

加营养液
并吹打

加培养液
并吹打

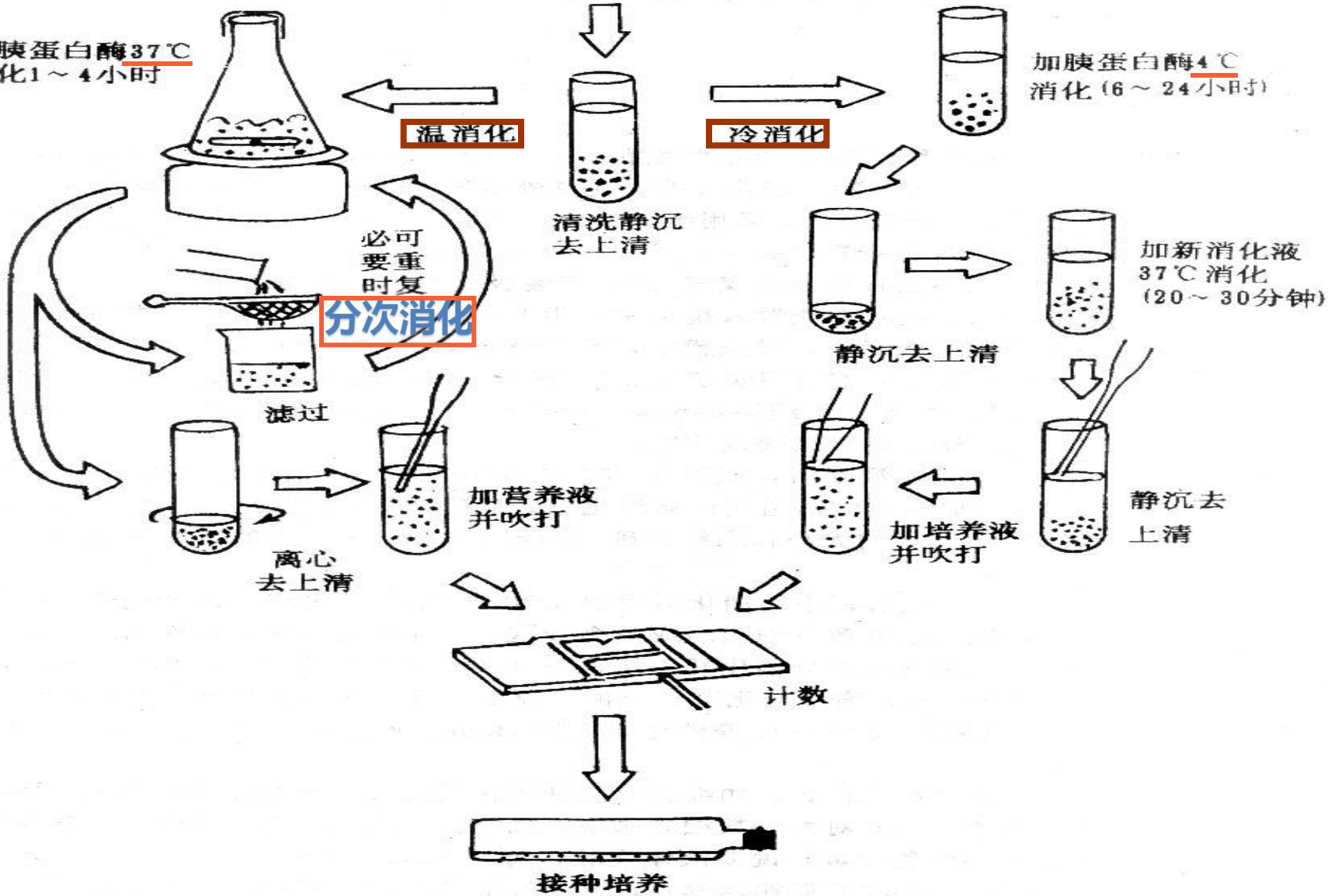
静沉去
上清

离心
去上清

计数

接种培养

消化法的分类



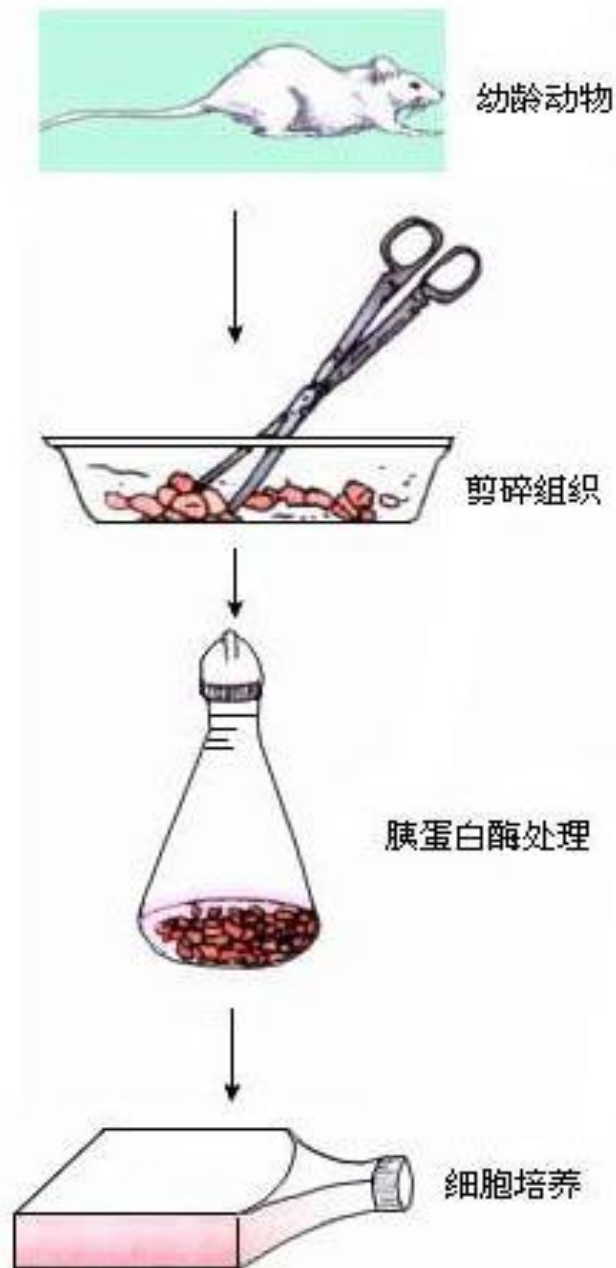


解离释放细胞的方法

● 最常用的是**机械解离细胞法**、**酶学解离细胞法**以及**螯合剂解离细胞法**。

● 酶学解离细胞法解离细胞是体外培养动物细胞时分散组织的基本方法，最常用的消化酶是**胰蛋白酶**和**胶原酶**两种。

动物细胞原代培养 养过程图





器材和液体的准备

■ 细胞培养用的玻璃器材；

培养瓶、吸管等在清洗干净以后，装在铝盒和铁筒中， 160°C ，2小时干烤灭菌后备用；

■ 手术器材、瓶塞等： 121°C ，20分钟蒸气灭菌

■ MEM培养液、消化液、PBS液等，用滤器过滤后备用。



方法与步骤（举例）

(1) 动物处死：将出生2~3d乳鼠，用拉颈椎方法处死。腹部向上钉在蜡盘中，用碘酒和酒精棉球擦拭腹部消毒。

(2) 剪取心脏：在无菌条件下将心脏（心尖）取出，置于无菌培养皿中，用Hanks液洗涤1-2次去除血污；放入另一培养皿中，纵向剪开心脏，仔细去除心腔内血污后剪成 1mm^3 大小的组织块，再并用Hanks液洗涤2~3次，直到液体澄清。



(3) 消化及分散组织块：将上述清洗过的组织放入无菌三角烧瓶内，加入5~6倍量的0.1%胰蛋白酶液（pH7.4~7.6），置37℃恒温磁力搅拌器上分次消化：每次消化8-10分钟。在超净台中吸出胰蛋白酶液于带盖离心管中，加入2滴血清终止消化。直到组织块基本消化完全。

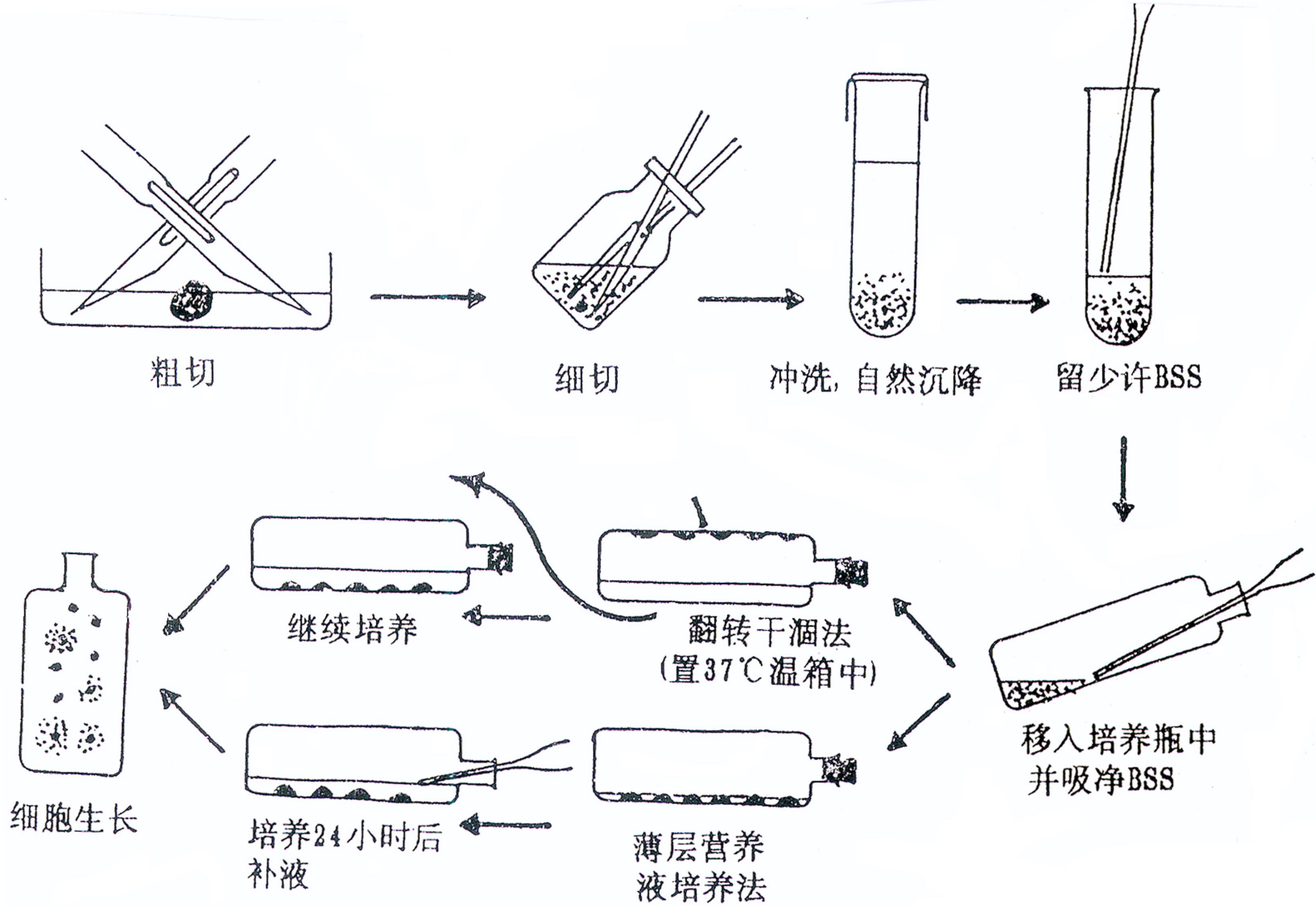
✓ 各管配平后离心，收集细胞，无血清培养液洗2-3次后，将细胞悬液用两层灭菌纱布过滤至另一烧杯中。



(4) 计数与稀释：从过滤的细胞悬液中取出1ml滴于血细胞计数板上，按白细胞法进行计数；计数后用培养液稀释，稀释后的浓度一般以每毫升含30 ~ 50万个细胞为宜。

(5) 分装与培养：将稀释好的细胞悬液分装于细胞培养瓶中，盖好瓶盖，在培养瓶上做好标记，置于37°C的CO₂培养箱中培养。

(6) 观察：逐日检查培养物是否污染，观察细胞生长情况。待细胞基本长成致密单层时，即可进行传代培养。



外植块培养步骤图解

原代细胞培养结果



- 细胞接种后一般几小时内就能贴壁，并开始生长；
- 如接种的细胞密度适宜，5天到一周即可形成单层。





传代细胞培养

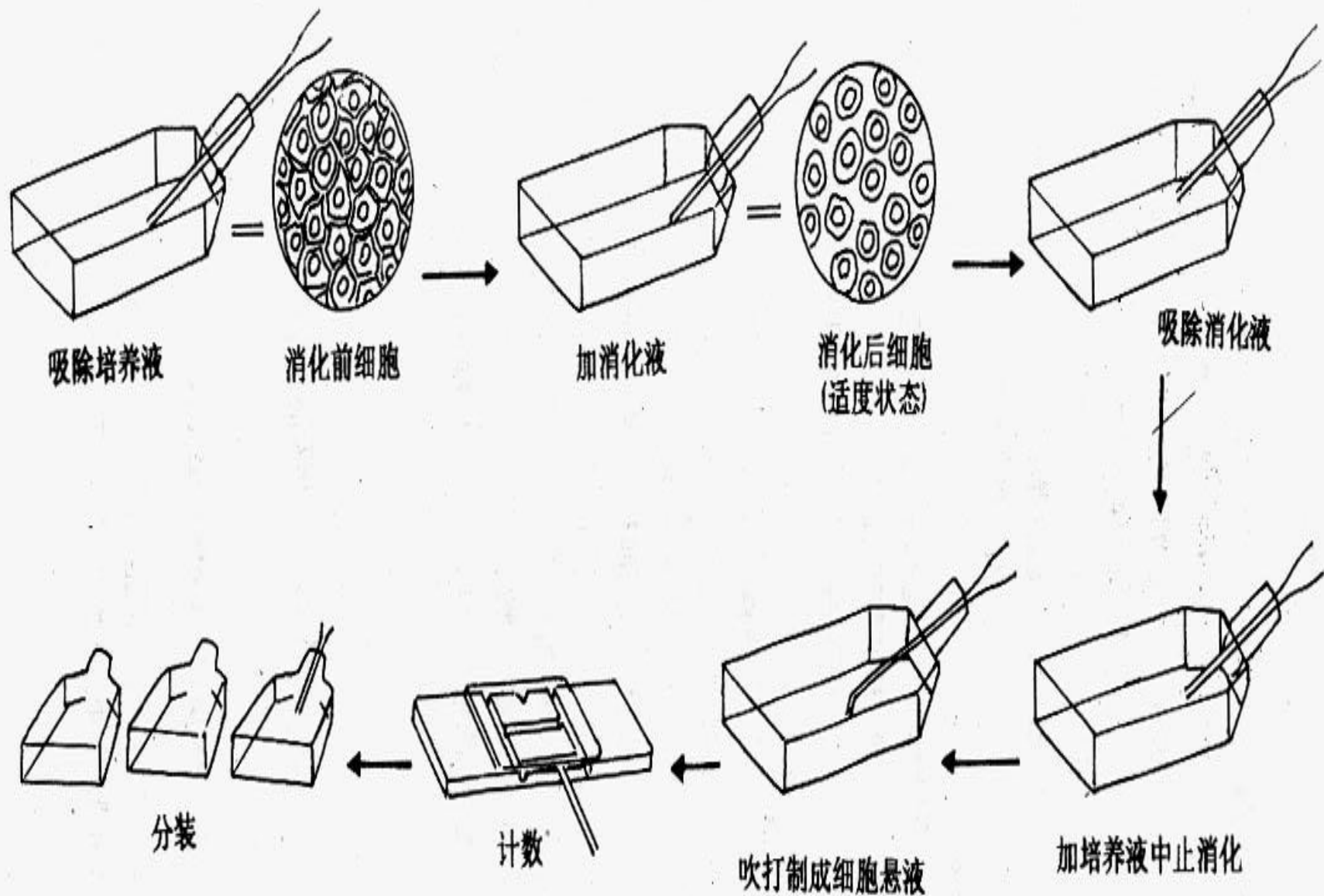
- 细胞“一代”指从细胞接种到分离再培养的一段期间，与细胞世代或倍增不同。在一代中，细胞倍增3~6次。
- 离体培养的细胞群体增殖达到一定密度时，细胞的生长和分裂速度就会减慢甚至停止，如不及时分离传代培养，细胞将逐渐衰老死亡。



传代细胞培养

- 传代培养是指细胞从一个培养瓶以1 : 2或其他比率转移，接种到另一培养瓶的培养。
- 贴壁培养细胞的传代通常是采用胰蛋白酶消化，把细胞分散成单细胞再传代，而悬浮型生长细胞则用直接传代法或离心法传代。

图 5-7 消化法传代培养步骤



方法与步骤（一）



（一）贴壁细胞传代培养

（1）选取生长良好的细胞，在超净工作台的酒精灯旁，倒去瓶中的旧培养液，加入2~3 ml的PBS液，轻轻振荡漂洗细胞，以除去悬浮在细胞表面的碎片（思考：还有什么作用？）

（2）加入适量0.1% - 0.25%胰蛋白酶消化液，室温消化，倒置显微镜下观察，待细胞单层收缩突起出现空隙时，倒去酶液。

方法与步骤（二）



(3) 用PBS液洗涤1次，加入适量培养液，反复吹打细胞，使其成细胞悬液。

(4) 以1:2或1:3进行分装，并在培养瓶上做好标记，注明代号、日期，轻轻摇匀，37℃ CO₂培养箱培养。

(5) 观察：细胞培养24 h后，即可观察培养液的颜色及细胞的生长情况。

悬液细胞的传代培养



- (1) 取生长良好的细胞，在超净工作台用无菌吸管把培养瓶中的细胞吹打均匀。
- (2) 转移到无菌的离心管中，盖紧胶盖，平衡后离心（1 000r/min）5min。（区别贴壁传代）
- (3) 在超净工作台中吸去上清液，加入适量新培养液，用吸管吹打细胞，制成悬液。
- (4) 以1：2或1：3进行分装，并在培养瓶上做好标记，注明代号、日期，轻轻摇匀，37℃ CO₂培养箱培养。
- (5) 观察：细胞培养24 h后，即可进行观察。



传代细胞培养结果

- 一般情况，传代后的细胞在2小时左右就能附着在培养瓶壁上，2~4天就可在瓶内形成单层，需要再次进行传代。



上海交通大学医学院
Shanghai Jiao Tong University School of Medicine

细胞的冻存、复苏



细胞冻存、复苏的发展历史简介

- 1776年，Spallanzani最早发表了“冷”处理对“细胞”生命活动影响的报道。
- 1900年前后，科学家基本上肯定了生物成分(如精子)能够在零下温度贮存的事实。
- 1949年，Polge等人发现了甘油对低温下贮存细胞的保护作用。
- Luyet(1951)与Lovelock(1953)等多位学者发现电解质浓度增大造成冷冻贮存细胞损伤的主要原因。
- 1959年，Lovelock等人发现了一种新的化学保护剂，这就是现在人们熟知的二甲基亚砷(DMSO)。
- 当前低温液氮冻存贮存细胞已是细胞培养室常规性通用技术，贮存时间几乎是无限的。



细胞的冻存与复苏

- **冷冻保存(cryopreservation)**：将体外培养物悬浮在加有**冷冻保护剂**的溶液中，以一定的**冷冻速率**降至零下某一温度(一般是低于 -70°C 的超低温条件)，并在此温度下对其长期保存的过程。
- **复苏(thawing)**：是以一定的**复温速率**将冻存的培养物恢复到**常温**的过程。



细胞的冻存原理-冰晶损伤

- 细胞冻存时，存在两种损伤：**冰晶损伤**、**溶质损伤**。
- **冰晶损伤**：由于温度下降，细胞内外的水分都会**结冰**，所形成的冰晶会造成**细胞膜和细胞器的破坏**并引起细胞死亡。这种因细胞内、外结冰而致的细胞损伤被称为细胞的冰晶损伤。
- 冰晶损伤是由**冷却速度过快**造成，冷却速度越快，冰晶损伤越大。



细胞的冻存原理-溶质损伤

- **溶质损伤**：因保存溶液**溶质浓度增高**而致的细胞损伤被称为溶质损伤；
- 细胞悬浮在溶液中，随着温度的下降，细胞外部的水分会先结冰，从而使得**未结冰的溶液中电解质的浓度升高**。如果将细胞暴露在这样高溶质的溶液中且时间过长，细胞膜上脂质会受到损坏，细胞便发生渗漏；
- 溶质损伤是由**冷却速度过慢**，使细胞在高浓度的溶液中暴露的时间过长而造成，冷却速度越慢，此损伤越严重。



细胞的冻存原理

- 溶液中加入**冷冻保护剂**时，则可保护细胞免受溶质损伤和冰晶损伤。
- **保护机理**：冷冻保护剂易同溶液中水分子结合，从而降低冰点，**减少冰晶**的形成；通过其摩尔浓度降低未结冰溶液中电解质的浓度，使细胞**免受溶质的损伤**，细胞得以在超低温条件下保存。



影响冷冻效果的因素（一）

1. 冷冻速率

- 不同的冷冻速度既然能对细胞产生不同的损伤；
- 当冷冻速度**过慢**时，细胞脱水严重，细胞体积严重收缩，超过一定程度时即失去活性；还会引起细胞外未结冰的溶液中溶质浓度增高，产生**溶质损伤**；
- 当冷冻速度**过快**时，细胞内水分来不及外渗，会形成较大**冰晶**，产生细胞内**冰晶损伤**。
- 不同细胞的最适冷冻速率不同。例如，小鼠骨髓干细胞、酵母的最适冷冻速率分别为 $1.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、 $7^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。

影响冷冻效果的因素（二）

2. 冷冻保存温度

- 液氮温度(-196°C)是目前最佳冷冻保存温度。
- 应用-70°C ~ -80°C条件(低温冷冻冰箱)冷冻保存细胞，短期内对细胞活性无明显影响，但随着冻存时间延长，细胞存活率明显下降。





影响冷冻和复苏效果的因素（三）

3. 复温速率

- 复温速率是指在细胞复苏时温度升高的速度。
- 一般来说复温速度**越快越好**。常规的做法是，在37°C水浴中，于1 ~ 2 min内完成复温。

在冷冻复苏中遵循：慢冻速溶原则！



影响冷冻效果的因素（四）

4. 冷冻保护剂

■ 指可以保护细胞免受冷冻损伤的物质。分为：

✓ 渗透性：**甘油、DMSO**

✓ 非渗透性：**聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、蔗糖**等

■ 甘油或二甲基亚砷这两种物质分子量小，溶解度大，易穿透细胞，且对细胞无明显毒性。



渗透性冻存剂的作用原理

■ 其保护机制是在**细胞冷冻悬液完全凝固**之前，渗透到细胞内，在细胞内外产生一定的**摩尔浓度**，降低细胞内外未结冰溶液中电解质的浓度，从而保护细胞**免受高浓度电解质的损伤**；同时，细胞内水分也不会过分外渗，避免了细胞过分脱水皱缩。

■ **渗透性冷冻保护剂**（甘油和DMSO）**并不能防止细胞内结冰**。在使用该类冷冻保护剂时，需要一定的时间进行**预冷**，让甘油或DMSO等充分渗到细胞内，在细胞内外达到平衡以起到充分的保护作用。目前，DMSO的应用比甘油更为广泛。



冻存剂的作用原理

■ **非渗透性冷冻保护剂**不能渗透到细胞内，一般是些大分子物质，主要包括**聚乙烯吡咯烷酮(PVP)**、**蔗糖**、**聚乙二醇**、**葡聚糖**、**白蛋白**及**羟乙基淀粉**等。

■ 其保护机制的假设很多，其中有一种可能是，聚乙烯吡咯烷酮等大分子物质可以**优先同溶液中水分子**相结合，降低溶液中自由水的含量，使冰点降低，减少冰晶的形成；同时，由于其分子量大，使**溶液中电解质浓度降低**，从而减轻**溶质损伤**。



注意事项

- 由于许多冷冻保护剂(如DMSO)在低温条件下能保护细胞，但在常温下却对细胞有害，故在细胞复温融解后要**及时洗除**冷冻保护剂。





冷冻保存方法

按照冷冻保护液在冻结后是否形成冰晶来划分，冻存方法可分为**非玻璃化**和**玻璃化冻存**：

■ 非玻璃化冻存是利用各种温级的冰箱**分阶段降温至** $-70 \sim -80^{\circ}\text{C}$ ，然后投入**液氮**进行保存；该方法冻结的细胞悬液或多或少都有**冰晶的形成**。

■ 玻璃化冷冻则是指利用**多种高浓度的冷冻保护剂**，联合形成的**玻璃化冷冻保护液**保护悬浮细胞，直接投入液氮进行冻存的方法。以该方法冻结的细胞悬液**没有冰晶**的形成。



冷冻保存方法--玻璃化冻存法

- 玻璃化冻存法对细胞活性的保存具有较好的效果，不需要复杂的仪器设备，具有液氮储存设备即可使用。
- 目前，该方法已在**胚胎冷冻**方面得到广泛应用，但**很少应用于一般细胞的冻存**。
- 这可能与需要配制**较复杂的冻存液**以及冷冻前和复苏后**较烦琐的操作**有关。



冻存方法--非玻璃化冻存法

1. 主要材料

- **仪器设备**：普通冰箱、 -30°C 低温冰箱和 $-70 \sim -80^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱、液氮冻存罐、离心机等。
- **冻存管**：容量为1 ml或1.5 ml。
- **冷冻保护液**：一般是以含**20%胎牛血清的细胞培养液与DMSO以9：1混合**而成。现配现用，或配制后放入普通冰箱冰盒内冷冻保存。
- **待冻存细胞**：肺腺癌上皮细胞A549

液氮罐



程序性降温仪



上海交通大学医学院

Shanghai Jiao Tong University School of Medicine



- 34立升，降温速率：0.1-50度/分，升温速率：0.1-10度/分；
- 温度偏差：小于2度，6个预设程序，10个用户设定程序；
- 每分钟1-3℃地冷冻速率可大大提高冻存细胞的复苏率。



冻存方法--冻存过程

1. 待冻存细胞悬液的准备

- 按常规方法消化处于对数生长期的细胞培养物，制备成单细胞悬液，计算细胞总数。
- 将细胞悬液以800 ~ 1000 r / min离心5 min，弃上清液。
- 向沉淀物中加入冷冻液。轻轻吹吸均匀，使细胞密度达 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个/ml。
- 按每管1 ~ 1.5 ml的量，分装于冻存小管内。拧紧管盖。
- 在冻存小管上做标记，包括细胞代号及冻存日期。



冻存方法--冻存过程

2. 分级冷冻（方法一）

- 先将冻存小管放入普通冰箱冷藏层($4 \sim 8^{\circ}\text{C}$)，约**40 min**。
- 接着置于普通冰箱冷冻层 ($-10 \sim -20^{\circ}\text{C}$)，**30 ~ 60 min**。
- 再于 -30°C 放置30 min左右（可省略）。
- 然后在 $-70 \sim -80^{\circ}\text{C}$ 下**过夜**。
- 最后将冻存小管投入**液氮**保存。
- **方法二**：将冻存小管先悬挂在**液氮罐口20 min**，再直接投入液氮中保存。



冻存方法---冻存过程

- **分级冷冻（方法三）**
- **4°C预冷**的冷冻保护液悬浮细胞，分装冻存小管后，将冻存小管放在**4°C下30 min**；
- 置于壁厚1 cm以上的**泡沫塑料**小盒内封好，立刻将小盒放置在**-70 ~ -80°C**冰箱中**24 h以上至1周**；再将冻存小管投入液氮中保存。
- **记录**：做好冻存记录。记录内容包括**冻存日期、细胞代号、冻存管数、冻存过程中降温的情况、冻存位置以及冻存经手人**。

细胞冻存盒



- 冻存盒放置于室温，然后放进去细胞，置于 -80°C ，利用异丙醇实现梯度降温。异丙醇易挥发，并且容易吸收空气中的水分，所以在冷冻细胞的过程中可以辅助实现缓慢降温，直接从室温放进 -80 可以达到近似于 1 度/分钟。



注意事项

- 在使用DMSO前，**不需要**对其进行**高压灭菌**，因其本身就有灭菌作用。
- 在常温下，DMSO对人体**有毒**，故在配制冷冻保护剂时最好**带手套**。
- 冻存管投入液氮时，动作要小心、轻巧，以避免液氮从液氮罐内溅出。
- 应注意控制冻存细胞的质量。
- 勿将冻存的细胞放置在**0 ~ -60°C**这一温度范围内过长时间，低温损伤主要发生在这一温度范围内。





非玻璃化冻存细胞的复苏

1. 主要材料

- **仪器设备**：恒温水浴箱、普通离心机。
- **培养用液**：完全培养液（20%血清+基础培养液）

2. 复苏过程

- 从液氮中取出冻存小管，立即投入**37~40°C**温水中**快速晃动**，直至冻存液完全融解。在**1~2 min**内完成复温；
- 将细胞冻存悬液移入离心管，加入约**5 ml培养液**，轻轻吹匀；细胞悬液经**800~1000 r/min离心5 min**。弃上清液；
- 给细胞沉淀物加入完全培养液，轻轻**吹吸均匀**；将细胞悬液移入培养瓶内，加足培养液进行培养。

注意事项



- 细胞冻存悬液一旦融解后，要**尽快离心**除去冷冻保护液，**防止冷冻保护剂**对细胞产生**毒性**；
- 许多冷冻保护剂（如DMSO）在低温下能保护细胞，但在**常温下**却对细胞**有害**，故在细胞复温后应**及时**洗涤冷冻保护剂；
- 实验人员在复苏细胞过程中，同样应具有**自我保护意识**，避免被液氮冻伤。



课后问题

- 1. 冷冻和复苏中，对温度的要求？
- 2. 在细胞冻存中DMSO的作用？