

利用流式细胞分析技术解析细胞周期

王雪冬

(中国科学院 分子细胞科学卓越创新中心 细胞分析技术平台, 上海, 200031)

摘要: 作者主要从事利用高活性高通量单细胞分选建库技术、高维流式细胞分析技术等研究领域。本案例中, 作者主要介绍了以 PI 染色法为主的流式细胞周期检测方案及用 Hoechst33342 染色法为主的流式减数分裂检测方案。

关键词: 细胞核荧光染料;细胞周期;减数分裂;流式检测

1 专业技术成果介绍

细胞是构建生命的最小功能单位, 它会通过增殖来修复损伤和自我更新, 以维持本身的生理功能和机体的正常生理活动。中国科学院分子细胞科学卓越中心作为一家从事以细胞生物学分子生物学等基础科研为主的科研院所, 在检测细胞生理状态方面具有优良的技术方法。其中细胞分析技术平台擅长以流式细胞分析技术对不同生理状态的细胞进行分析。

以检测常规细胞周期为例, 我们以 PI 染色法就行流式实验。碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 是一种常用的细胞核荧光染料, 能够嵌入碱基之间实现与 DNA 结合。PI 不能穿透细胞膜, 但是可以穿过破损的细胞膜而对核染色。利用这一特性, 通常与 Calcein-AM、Hoechst 33258 或 Hoechst 33342 等活细胞荧光探针一起使用, 同时对活细胞和死细胞染色和鉴定, 用于细胞凋亡相关的研究。也可以用作多重荧光染色的复染剂, 兼容于各种细胞标记技术, 包括直接或者间接的荧光抗体检测, mRNA 原位杂交, 细胞结构特异性的荧光探针检测法以及组织染色。其中最为常见的是 PI 的单独染色进行细胞周期的分析, 在长期的相关研究工作中, 这一检测法经过多次反复的实验验证, 优点是样品制备过程简单、周期短; 如样品不能及时上机检测可适当避光存放, 待条件允许时再进行检测分析。缺点是细胞需固定后方能进行样本检测分析, 而样品在固定和多次洗涤离心的时候, 细胞会产生皱缩、破碎, 这样最直接的就是影响检测时细胞的数量, 从而间接影响实验数据的可靠性。

以检测减数分裂为例, 我们以 Hoechst33342 染色法根据 DNA 的含量, 快速、高效、准确的找到减数分裂的不同时期。减数分裂是生物有性生殖的基础, 其过程高度复杂且受到严密调控。减数分裂细胞周期可分为 I 期 (MI, 减数第一次分裂) 和 II 期 (MII, 减数第二次分裂), 而 MI 和 MII 又可各自划分为前期、中期、后期和末期。其中, MI 前期

的生物学事件尤为复杂，同源染色体的配对、联会和重组交换均发生在该时期。根据染色体形态，MI 前期通常又被划分为细线期、偶线期、粗线期、双线期和终变期。Hoechst33342 是一种可以穿透细胞膜的荧光染料，细胞毒性低，可用于细胞凋亡、细胞周期、DNA 倍性的分析和分选。这一方法可以保持细胞的活性，能精准的将细胞的增殖过程各期的特点展现出来，为后续的活细胞实验奠定扎实的基础，为研究人类的生命进化和繁衍生息提供了可靠的研究后盾。Hoechst 33342 这种荧光染料的最大激发波长为 346nm，最大发射波长为 460nm；当 Hoechst 33342 和双链 DNA 结合后，最大激发波长为 350nm，最大发射波长为 461nm。所以在仪器方面我们需要配备一根 355nm 波长的激光器作为激发光源，由于这种染料激发后在 650nm 和 430nm 处都有荧光信号，所以还需要 LP650 和 BP450/50 的测量滤片，以及合适的光路设计、高灵敏度的检测能力和稳定的液流系统。合理的光路设计能够避免荧光信号的损失和误检，高性能的检测灵敏度可以捕捉到微弱的荧光信号，避免遗漏关键的实验信息。配以稳定的液流系统，可以将我们需要研究的细胞精准的分选下来，保证其细胞的活性和正常的生理功能。样品上机后，我们先以二维散点图 FSC-A/SSC-A 展示细胞大小，以 P1 门圈选主 细胞群体（图 1A）。随后以二维散点图 FSC-H/FSC-W 和 SSC-H/SSC-W 去除粘 连细胞（图 1B~C）。紧接着通过 PE-Texas Red-A 检测 PI 信号，去除 PI 阳性的死 细胞（图 1D）。最后，保留的 PI 阴性细胞通过二维散点图 Indo (Blue)-A/DAPIA 展示细胞大小及细胞的核型，用不同的门圈选不同阶段的生精细胞（图 1E）。细胞群体的层次关系及所占比例等参考图 F。图 1E 中的细胞群体的划分主要根据细胞的核型及细胞大小：细 线前期精母细胞（P5）为精母细胞的 S 期，故其核型应介于二倍体与四倍体之间；细 线期、偶线 期、粗线期、双线期均为四倍体，但是在细胞大小上能够区分开，其中细线期/ 偶线期细胞（P6）相对较小，当转变为粗线期细胞（P7）时，细胞尺寸逐渐变大， 双线 期细胞（P8）尺寸最大。减数第一次分裂完成后形成的次级精母细胞（P9）为 二倍体， 减数第二次分裂完成后形成的圆形精子（P10）为单倍体。

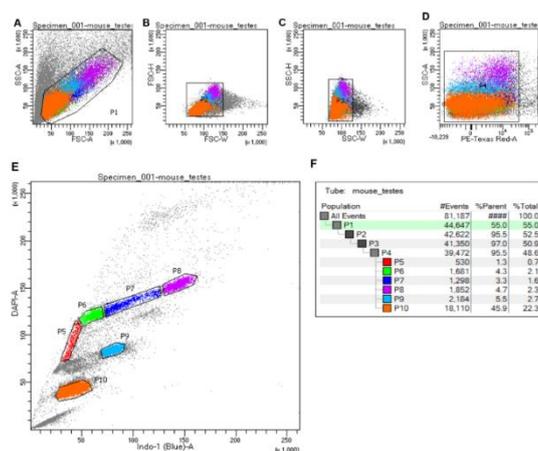


图 1 流式分选的设门策略

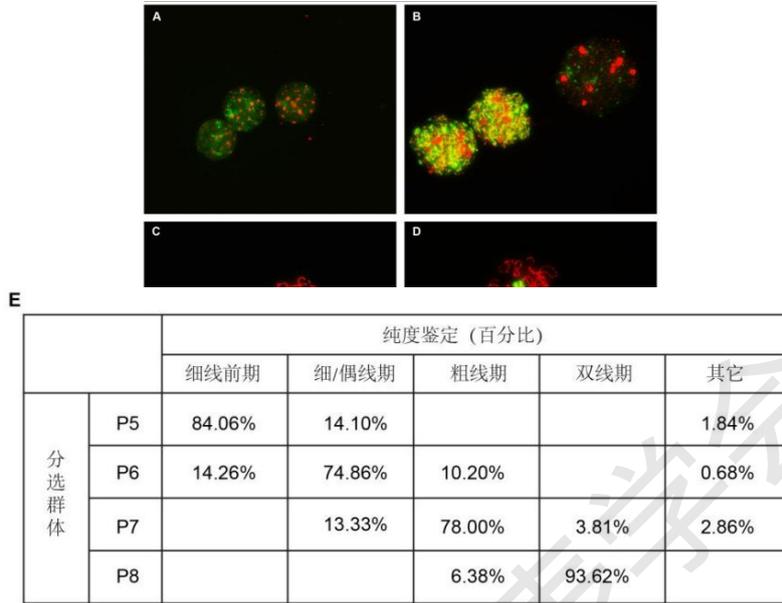


图 2 流式分选后各级精母细胞的验证. 将流式分选的不同群体细胞进行核铺展, 并结合免疫荧光进行验证. 其中 P5 群体富集了细线前期精母细胞 (A), P6 群体富集了 细/偶线期精母细胞 (B), P7 群体富集了粗线期精母细胞 (C), P8 群体富集了双线期精母细胞 (D), 标尺=100 μm . 通过统计得出纯度结果 (E).

在本实验中仪器的工作状态和样本的制备情况都会给实验带来误差或者失败, 所以在样品分析分选开始前, 需将流式细胞仪的工作状态调制最佳. 355 激光 CV 值调至 $CV < 5$, 要达到这个标准, 355 激光器需要 15min 的预热, 需用校准微球将激光器进行优化, 保证荧光信号采集的精准度. 液流系统不抖动、不分叉, 保持进样管路通畅无碍. 样品采集的环境温度维持在 22-24 度, 湿度控制在 40-45. 样品制备时需注意细胞的活性. 通过这一系列的操作, 提高了实验效率和准确度.

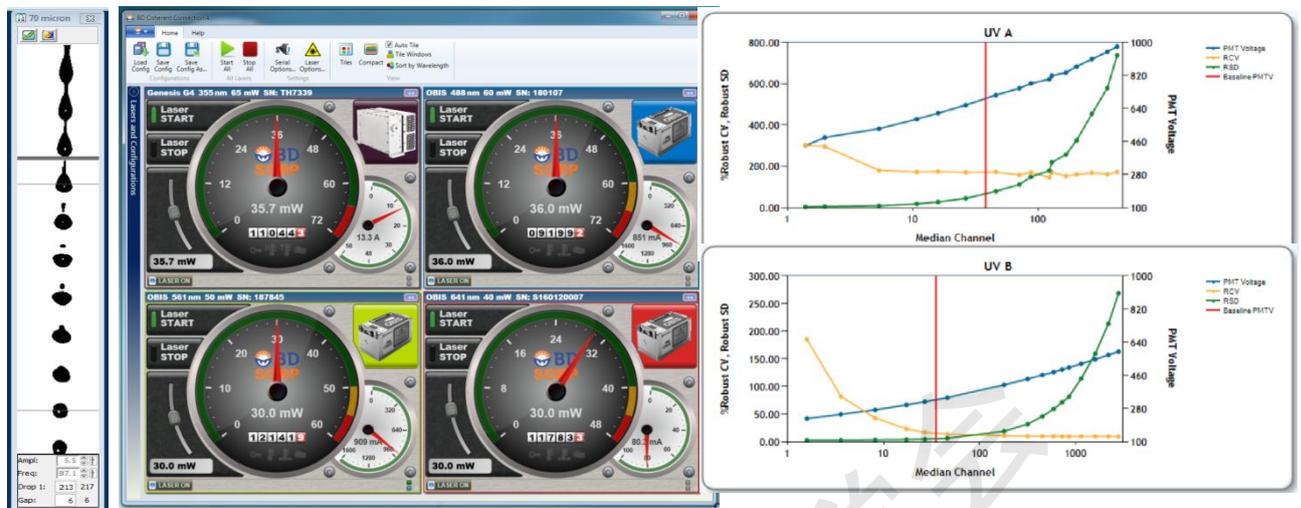


图 3 仪器正常工作时的状态

2 专业技术人员介绍

2.1 个人简介

王雪冬，高级工程师，现就任于中国科学院分子细胞科学卓越创新中心细胞分析技术平台。致力于细胞分析新技术新方法的开发及应用推广、大型仪器运维及技术服务的共享以及流式专业人才的培养，协助完成了院所功能开发项目并获专利一项，参与了《流式细胞术实验手册》的编写，并撰写了《流式细胞术检测早期细胞凋亡之 JC-1 法》，协同撰写了《常用细胞周期流式检测方法》、《细胞增殖的流式检测（BrdU 法）》、《流式细胞术检测细胞凋亡（Annexin V/PI 法）》，已发表在 Bio-Protocol 上。

2.2 专业技术研究方向

主要利用高活性高通量单细胞分选建库技术、高维流式细胞分析技术等，围绕细胞命运与功能改造、核酸新功能及调控、粘膜免疫及肿瘤免疫等方向搭建专业性的硬件设施条件，提升特异性的样品制备技术，开发针对性的细胞分析手段，提供全方位的技术支撑，形成有特色的有影响力的国际前沿科学研究平台体系，为相关疾病治疗提供重要理论基础、新的研究方向以及核心技术支撑等。

3 承担科技项目及代表论著

项目：

- (1) 上海市专业技术人员知识更新工程急需紧缺人才培养项目：《流式细胞分析分选仪

培训》(2019年)

(2)中国科学院功能开发项目:《针对流式细胞仪分选后细胞活性提升的功能开发》(项目编码: Y81LS21, 2018年)

代表著作:

[1] 王雪冬,丁宇波,葛灵,边玮(2019).流式细胞术检测早期细胞凋亡之 JC-1 法.Bio-101 e1010335.Doi:10.21769/BioProtoc.1010335

4 获奖及荣誉

2020年 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心所级中心爱岗敬业奖

2019年 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心所级中心能工巧匠奖

2018年 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心所级中心爱岗敬业奖

2011年 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心优秀员工