

以 MARCM 标记单细胞在果蝇神经系统的应用

Labeling Single Cells by Mosaic Analysis with a Repressible Maker (MARCM) in *Drosophila* Nervous System

张颢馨, 周雅惠*

细胞与个体生物学研究所/中央研究院, 台北市, 台湾

*通讯作者邮箱: yhchou@gate.sinica.edu.tw

引用格式: 张颢馨, 周雅惠. (2019). 以 MARCM 标记单细胞在果蝇神经系统的应用. *Bio-101* e1010289.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010289.

How to cite: Chang, H. H. and Chou, Y. H. (2019). Labeling single cells by Mosaic analysis with a repressible maker (MARCM) in *Drosophila* nervous system. *Bio-101* e1010289. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010289. (in Chinese)

摘要: 在以果蝇为实验材料的研究中, 常利用 Mosaic analysis with a repressible maker (MARCM) 标记单个或一群细胞, 以观察神经细胞的形态 (morphology) 或操控基因的表达。MARCM 的作用原理是当母细胞 (parental cell) 的同源染色体经由 *FRT* 发生染色体重组 (homologous chromosome recombination), 经细胞分裂后即有机会产生一个不带有 GAL80 的子细胞, 而使得 GAL4 得以作用。因为这项技术可标记特定细胞谱系中的单个或一小群细胞, 因此适合用于研究细胞谱系、神经回路以及探讨特定基因在神经细胞或其他组织中的功能。

关键词: 果蝇 (*Drosophila*), MARCM, 单细胞克隆 (single-cell clone), 多细胞克隆 (neuroblast clone), 神经节母细胞 (ganglion mother cell)

材料与试剂

1. 500 μ l 微量离心管 (Eppendorf tubes) (Axygen, catalog number: MCT-060-C)
2. 载玻片 (SuperFrostTM Microscope Slides, Ground 45°, 76 × 26 mm) (Thermo ScientificTM, catalog number: 10281711)
3. 盖玻片 (cover glasses thickness No.1, 22 × 22 mm) (Marienfeld Superior, catalog number: 0101050)

4. 移液枪头 (移液枪配套使用) [Axygen, catalog number: 14-222-436 (1,200 μ l), 14-222-437 (200 μ l), 14-222-438 (10 μ l)]
5. 培养皿 (Alpha Plus, 55 \times 15 mm, catalog number: PP3-55)
6. 果蝇
7. 果蝇管 (信德仪器有限公司, catalog number: PT10-30100)
8. Embryo Collection Cage-Small (Genesee Scientific, Flystuff, catalog number: 59-100)
9. 透明指甲油 (露华浓经典指甲油, Revlon, catalog number: Vernis 771)
10. 葡萄果汁 (味全公司, 每日 C 100% 葡萄综合果汁)
11. 琼脂 (agar) (GeneTeks, catalog number: WGT-PA001)
12. 二次过滤水 (ddH₂O)
13. 95% 酒精 (景明化工股份有限公司)
14. 冰醋酸 (glacial acetic acid) (Sigma-Aldrich, catalog number: JT-9508)
15. 丙酸 (propionic acid) (Sigma-Aldrich, catalog number: SI-P1386-1L)
16. CO₂ (板桥气体有限公司)
17. 活性干酵母发酵粉 (Red Star, active dry yeast)
18. 聚甲醛 (20% paraformaldehyde) (Electron Microscopy Sciences, catalog number: 15713-S)
19. 10×磷酸盐缓冲生理盐水 (10× Phosphate buffered saline (PBS)) (UniRegion Bio-Tech, catalog number: UR-PBS001-1L)
20. 山羊血清 (Normal Goat Serum) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, catalog number: 005-000-121)
21. Triton X-100 (Sigma-Aldrich, catalog number: X100)
22. SlowFadeTM Gold Antifade Mountant (Invitrogen, catalog number: S36936)
23. 1× PBS (磷酸盐缓冲生理盐水) (见溶液配方)
24. 4% 聚甲醛/磷酸盐缓冲生理盐水 (见溶液配方)
25. PBST (3% Triton X-100/PBS; 1,000 ml) (见溶液配方)
26. 5% 山羊血清 (Normal Goat Serum) (见溶液配方)
27. 第一抗体溶液 (见溶液配方)
28. 第二抗体溶液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 镊子 (Dumont #5 Forceps) (Dumont Switzerland, catalog number: 11252-20)
2. 1,000 ml 烧杯 (Pyrex, catalog number: 1000-1L)
3. 微量移液枪 (Pipetman) [Gilson, P1000 (F123602), P200 (F123601), P20 (F123600), P2 (F144801)]
4. 解剖显微镜 (Nikon, model: N-SMZ745)
5. 共轭焦显微镜 (Zeiss, model: LSM780)
6. 培养箱 (Firstek, model: RI-560)
7. 恒温水槽 (Firstek, model: B-102)
8. 3D 旋转震荡器 (Digisystem, model: SR-100)
9. 4 °C 冷藏柜 (JunYang, model: JR-2-1100)
10. 微波炉 (Panasonic, model: NN-ST340)

实验步骤

用来进行 MARCM 的果蝇必须具备以下几个元素：(1) **GAL4** 及 **UAS-reporter** (如 **UAS-GFP**)，以用于标记要研究的细胞；(2) **tubp-GAL80**，以抑制 **GAL4** 在所有细胞的作用；(3) **flippase recombinase (FLP)** 及 **FLP recombination target (FRT)**，在处于 G2-M 细胞周期细胞中，经由 **FLP** 作用在同源染色体的两个同向 **FRT** 位置而造成染色体互换，进而使 **GAL80** 只存于一个子细胞中，而另一个子细胞则因不带有 **GAL80**，而使得 **GAL4** 可启动 **UAS** 下游基因的表达 (图 1A)。一般最常用的 **FLP** 是利用热激 (heatshock) 以诱导 **hs-FLP** 之启动子 (promoter) 活化并表达 **FLP**。

本实验方法中，以果蝇第一型神经细胞谱系 (Type 1 cell lineage) 为例来说明 MARCM 克隆的类型。在发育过程中，每一细胞谱系会从单一一个神经母细胞 (neuroblast) 开始进行第一次细胞分裂，而产生 1 个神经节母细胞 (ganglion mother cell) 和 1 个新的神经母细胞。此神经节母细胞会再进行一次分裂而产生 2 个神经细胞 (neurons) 或产生 1 个神经细胞及 1 个神经胶质细胞 (glia)，而新的神经母细胞会再进行下一次分裂，而产生另 1 个神经节母细胞和新的神经母细胞 (图 1B)。

在细胞谱系持续进行细胞分裂时，**FLP** 作用在不同的细胞会标记不同的株落。若 **FLP** 表达在神经节母细胞而造成同源染色体互换，此结果会使 **GAL80** 只表达于 1 个子

细胞中，所以另一个子细胞中的 GAL4 就没有 GAL80 的抑制，因此将只有单一神经细胞被标记（单细胞克隆；single-cell clone）。若 FLP 表达在神经母细胞而造成同源染色体互换，而 GAL80 则只表达于新的神经母细胞中，此时神经节母细胞的 GAL4 将没有 GAL80 抑制，因此可标记双细胞克隆（two-cell clone）。同理，若是在神经母细胞分裂时表达 FLP，而 GAL80 则只表达于神经节母细胞中，此时新的神经母细胞中的 GAL4 将没有 GAL80 抑制，因此可标记多细胞克隆（neuroblast clone）（图 1B-C）（Theodosiou 和 Xu, 1998; Lee 和 Luo, 1999; Wu 和 Luo, 2007）。

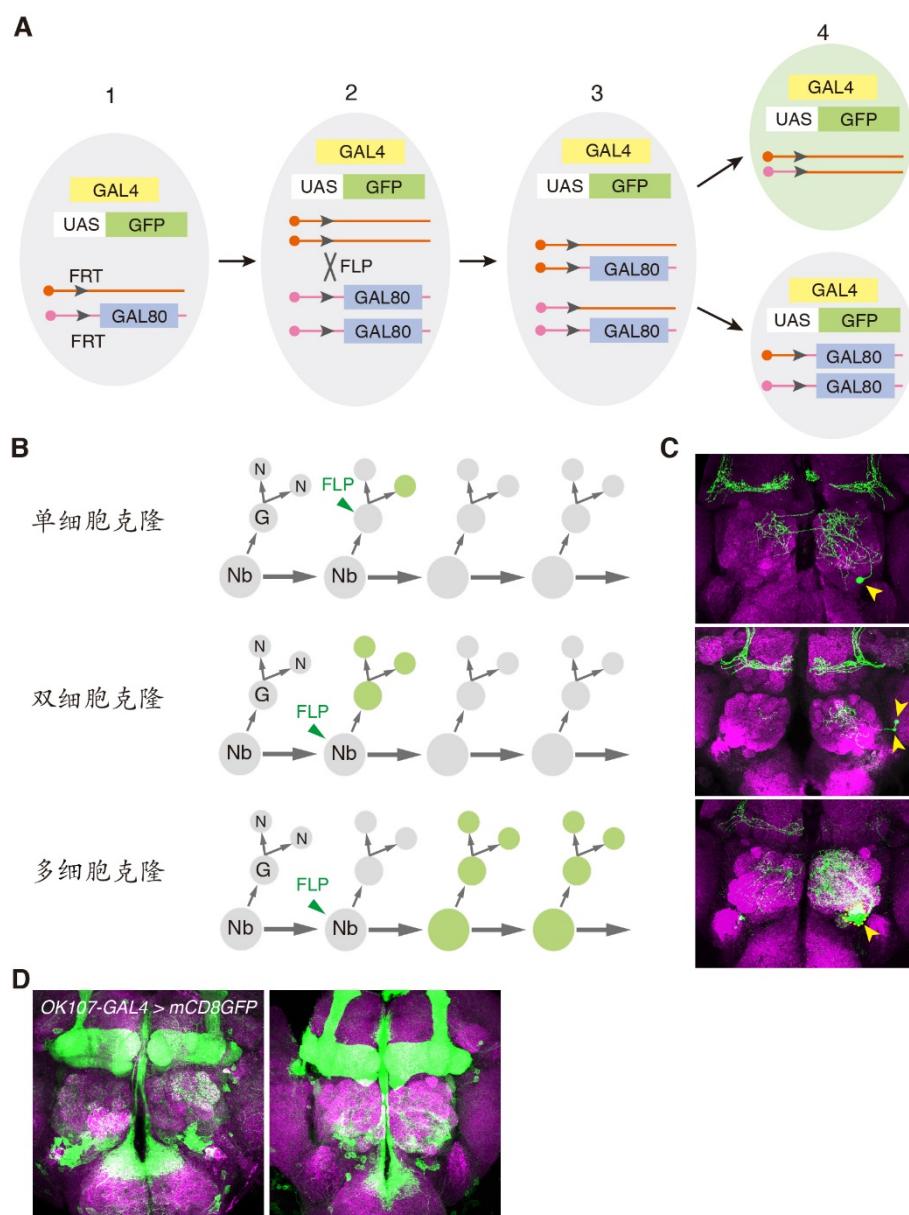


图 1. MARCM 原理. A. MARCM 原理及示意图。GAL4 作为转录因子，其会作用在

结合位点 *UAS* 上，而启动其下游基因 (如 *GFP*) 的表达。*GAL80* 是抑制因子，其会抑制 *GAL4* 的活性而使其无法作用在 *UAS*。在 MARCM 的方法中，母细胞带有 *GAL4*, *UAS-GFP*, *FRT* 及 *FRT tubp-GAL80* (A1) (Lee 和 Luo, 1999)。经过 S 细胞周期，染色体会复制形成 2n (A2)。若在 G2-M 细胞周期时，诱导这个细胞表达 FLP，随之 FLP 会作用在两个 *FRT* 序列上，使其发生基因重组 (A3) (Theodosiou 和 Xu, 1998; Wu 和 Luo, 2006)。细胞分裂后，其中一个子细胞可能不带有 *GAL80*，因此其便可表达 *GFP* (A4)。B. MARCM clone 示意图。在果蝇的第一型细胞谱系 (Type 1 lineage)，神经母细胞 (Nb) 会分裂成神经节母细胞 (G) 和新的神经母细胞，而神经节母细胞会再分裂而产生 2 个神经细胞 (N)。若在神经节母细胞分裂前发生染色体互换，则其中一个子细胞可能不带有 *GAL80*，故可检测到单细胞克隆 (single-cell clone，上图)；若在神经母细胞分裂前发生染色体重组，则会有两种可能：一是产生的神经节母细胞不带有 *GAL80*，从而产生双细胞克隆 (two-cell clone，中图)，二是产生的神经节母细胞不带有 *GAL80*，从而造成多细胞克隆 (neuroblast clone，下图)。C. 共轭显微镜影像的果蝇大脑范例图。(上图) 单细胞克隆、(中图) 双细胞克隆、(下图) 多细胞克隆。D. 非 MARCM clone 范例图。(左图) 原始 *GAL4* (*OK107-GAL4*) 之表达；(右图) 标记细胞之数量与原 *GAL4* 相似 (详见结果与分析)。

一、葡萄汁琼脂盘制作

1. (以制备 350 ml 葡萄汁琼脂混合液为例) 将 168 ml 葡萄汁、160 ml 二次过滤水和 13.44 g 琼脂倒入 1,000 ml 烧杯 (或烧瓶) 中，并置于微波炉中加热至溶解。
注：必须分段加热，以防止液体瞬间沸腾而溢出烧杯。
2. 将混合液置于室温至稍微冷却后 (约 75 °C)，加入 3.5 ml 95% 酒精、3.35 ml 冰醋酸和 1.75 ml 丙酸，并用手轻微摇晃烧杯使其混合均匀。
3. 将混合液倒入培养皿中，每一培养皿加入约 28 ml 的混合液 (约可制备 12 个葡萄汁琼脂盘)。
4. 将葡萄汁琼脂盘置于室温冷却至凝固后即可以使用。未使用的葡萄汁琼脂盘可用经二次过滤水沾湿的吸水纸将其包住，置于保鲜盒密封，并储存于 4 °C 冷藏柜，保存期限约 1 个月。

二、标记特定出生时间的神经细胞

1. 准备带有产生 MARCM 所需基因的果蝇：

例如：将未交配过的雌果蝇 (*UAS-mCD8GFP, hsFLP/FM6; FRTG13/CyO*) 与雄果蝇 (*FRTG13, tubp-GAL80/CyO; Elav-GAL4/TM6B, Tb*) 交配，便可得 *UAS-mCD8GFP, hsFLP/+; FRTG13/FRTG13, tubp-GAL80; Elav-GAL4/+* 子代以用于 MARCM 实验。

- 在果蝇管中洒入活性干酵母发酵粉后，放入约 50 只尚未交配的雌果蝇和 10 只雄果蝇，使其在 25 °C 培养箱交配约 2~3 天。果蝇的虫龄以 0~7 天为佳。
- 第 3 天，将活性干酵母发酵粉洒在葡萄汁琼脂盘上并将果蝇移至组装好的 Cage 和 琼脂盘 (图 2B, 2C)，接着将整组置于 25 °C 培养箱，使果蝇在葡萄汁琼脂盘上产卵。
- 放入培养箱 16 小时，以产出足够数量的卵 (其中多数仍为尚未孵化的卵)。之后将果蝇亲代用 CO₂ 麻醉，并移至一组新的 cage 或果蝇培养管。在解剖显微镜下检查琼脂盘上是否有幼虫孵出，并用镊子将盘上已经孵出的幼虫 (图 2C) 移除。再将此旧的琼脂盘与 cage 组好并置于 25 °C 培养箱。
- (以设计收集 12 小时间出生的神经细胞为例) 距前次去除幼虫 12 小时后，将葡萄汁琼脂盘上已经孵出的幼虫用镊子挑至果蝇培养管中，此时幼虫的年纪范围为孵化后 0~12 小时 (0~12 h after larval hatching, ALH) (图 2A, 2C)。将此带有幼虫的果蝇培养管置于 25 °C 培养箱。
- (以透过 MARCM 标记在孵化后 36~48 小时出生之神经细胞为例) 在 25 °C 培养箱继续培养 36 小时，管中幼虫的虫龄为 36~48 h ALH。此时将幼虫置于 37 °C 恒温水槽 1 小时 (图 2A, 2C)。这个方法原则上会使幼虫所有细胞因热感应而表达 Flipase。因为 MARCM 造成的染色体互换只会发生在处于 G2-M 细胞周期的细胞，故在此实验中被标记的神经细胞的出生时间为 36~48 h ALH。
- 若要标记孵化后 12~24 小时的幼虫之神经细胞，则在挑出 0~12 h ALH 的幼虫 (实验步骤 5) 后，在 25 °C 培养箱继续培养 12 小时，再将培养管至于 37 °C 恒温水槽 1 小时以促使细胞表达 Flipase。可以此类推欲标记出生时间的神经细胞 (图 2A, 2C)。
- 待温水浴后，将果蝇培养管放回 25 °C 培养箱，静待幼虫生长至成蝇。

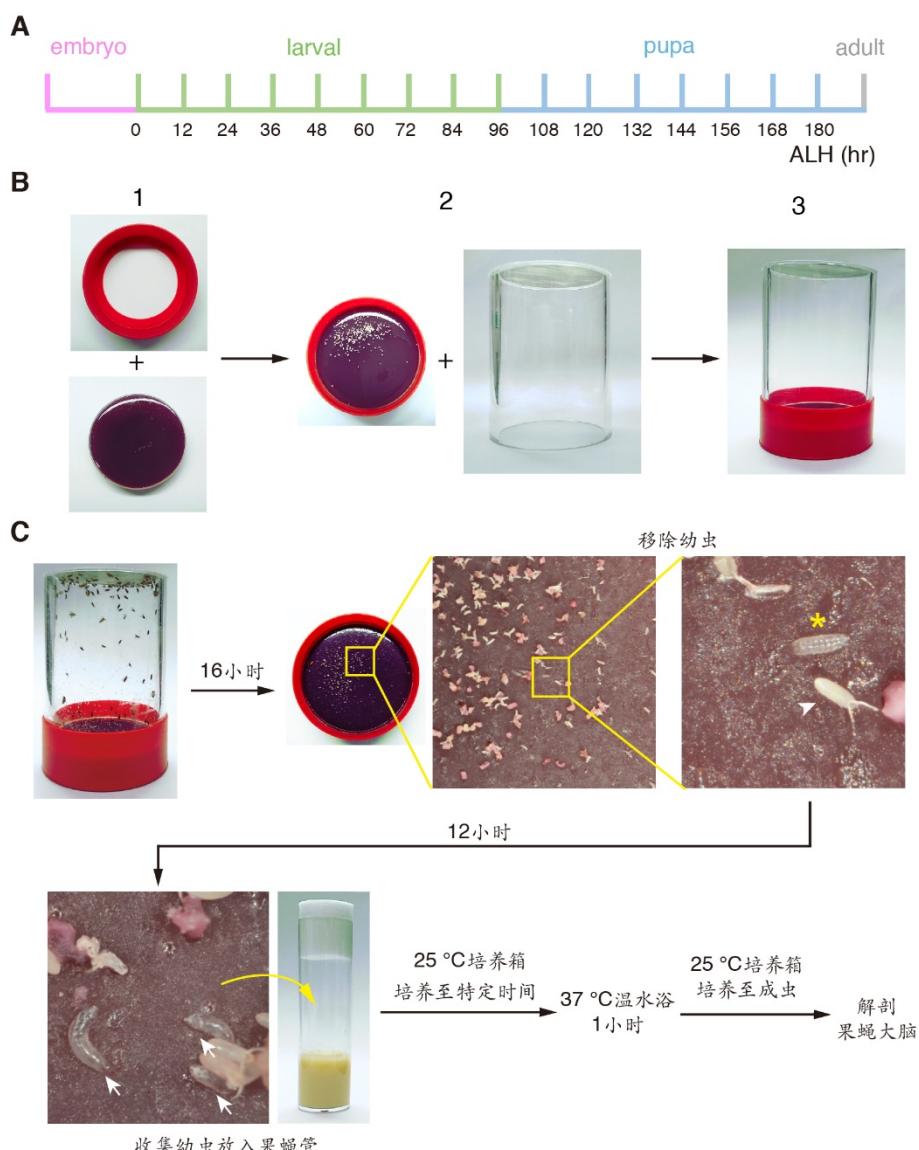


图 2. 以 MARCM 标记特定时间出生的果蝇神经细胞的实验设计. A. 果蝇发育时间范例。本范例的时间间隔 (time window) 是 12 小时，从幼虫孵出后至成蝇羽化前共分成 16 个时间间隔，收集不同时间间隔的果蝇幼虫或蛹并诱导细胞表达 FLP，便可能标记到在该时间间隔出生的神经细胞。B. Embryo Collection Cage 的组装。(左图) 组装前零件的俯视图；(中图) 组装前 Cage 的侧面图及洒上活性干酵母粉的葡萄汁琼脂盘的俯视图，建议如图示的酵母粉密度并只洒在约 1/3 的面积；(右图) 组装后的侧面图。C. 标记特定时间出生的果蝇神经细胞实验流程图。星号 (*)：要去除之幼虫。白色箭头：还未孵化的卵。白色箭号：要收集至果蝇管之幼虫，此时收到的幼虫年龄为孵化后 0~12 小时。

三、果蝇大脑的免疫染色

1. 实验前新鲜配制 4% 聚甲醛/磷酸盐缓冲生理盐水 (4% paraformaldehyde/PBS)，在 500 μ l 微量离心管中加入 500 μ l 4% 聚甲醛/磷酸盐缓冲生理盐水，再将其置于碎冰上。
2. 收集羽化后 2~5 天的成蝇，在新鲜配制的 4% 聚甲醛/磷酸盐缓冲生理盐水中进行解剖以获取成蝇的大脑，并将解剖出的成蝇脑立即放入冰上的微量离心管。此离心管在整个解剖过程中必须固定在碎冰上，以保持成蝇脑的新鲜程度。解剖完所有样本后，将离心管移至室温下，置于 3D 旋转震荡器水平均匀反应 20 分钟。
3. 用微量移液枪移除离心管中的聚甲醛，并在离心管中加入 500 μ l 含 0.3% Triton X-100 的磷酸盐缓冲生理盐水混合溶液 (0.3% Triton X-100/PBS; PBST)。而后将此微量离心管置于 3D 旋转震荡器并在室温下均匀反应 20 分钟，以移除残留在果蝇大脑的聚甲醛。反应后将微量离心管中的 PBST 移除，并加入新的 PBST 再次清洗。重复以 PBST 清洗样品共 3 次。
4. 移除微量离心管中的 PBST，并在离心管中加入 400 μ l 5% 山羊血清 (normal goat serum)，置于 3D 旋转震荡器并在室温下反应 30 分钟，以降低抗体非专一性的结合。
5. 移除 5% 山羊血清，并在微量离心管中加入 400 μ l 第一抗体 (primary antibody) 溶液。将离心管置于冷藏柜中的 3D 旋转震荡器中，使样品在 4 °C 均匀反应至少二个隔夜 (two overnights)。
6. 用微量移液枪移除离心管中的第一抗体溶液，再加入 500 μ l PBST，将离心管置于 3D 旋转震荡器并在室温下反应 20 分钟，以 PBST 清除残留以及未与抗原结合的抗体。反应后将离心管中的 PBST 移除，并加入新的 PBST 再次反应。前后共以 PBST 清洗样品 3 次。
7. 移除离心管中的 PBST，并在离心管中加入 400 μ l 第二抗体 (secondary antibody) 溶液。将离心管置于 4 °C 冷藏柜中的 3D 旋转震荡器中，使样品在 4 °C 均匀反应至少一个隔夜 (one overnight)。
8. 以微量吸管移除离心管中的第二抗体溶液，并在离心管中加入 500 μ l PBST，将离心管置于 3D 旋转震荡器并在室温下反应 20 分钟，以 PBST 清除残留以及未与抗

原结合的抗体。反应后将离心管中的 PBST 移除，并加入新的 PBST 再次反应。前后共以 PBST 清洗样品 3 次。

9. 移除离心管中的 PBST 后，在离心管中加入 SlowFadeTM Gold Antifade Mountant 以降低荧光褪色速度。将样品至于 4 °C 冷藏柜至少一个隔夜，以使 Antifade Mountant 与组织中的 PBST 得以充分置换。
10. 将盖玻片 (cover glasses thickness No.1, Marienfeld Superior) 压碎成 0.5 × 0.5 mm 的碎片，将一 200 μ l 微量吸管 (yellow tip) 的尖端剪掉，再以此微量吸管将果蝇的脑连同少量 Antifade Mountant 从离心管中吸出，置于以酒精清洁过的载玻片上，并在样本周围四个角落以碎盖玻片作为支撑，使盖玻片覆盖样本时不会挤压到果蝇的大脑。最后以指甲油密封盖玻片的外围。

结果与分析

1. MARCM clones 的判读

在幼虫被置于 37 °C 恒温水槽 1 小时的时间断内，并非所有的细胞皆处于 G2-M 细胞周期，因此相较于只以 GAL4 标记神经细胞的大脑，在带有 MARCM clones 的大脑中，表达 GAL4 的神经细胞数量应该会少非常多。最常见的二种异常情况为：

- 1) 所有大脑样品皆没有标记到任何细胞：此情形常因为果蝇未带有 *FLP*, *FRT*, *GAL4* 或 *UAS-reporter* 中任一项或数项。然而，也有可能是在 37 °C 恒温水槽 1 小时的培养时间太短，而不足以促使足够的 FLP 表达，或是置于 37 °C 恒温水槽的时间点未涵盖到欲观察的细胞进入 G2-M 的时间。
 - 2) 标记的神经细胞的数量与 GAL4 表达相似 (图 1D): 此情形常因果蝇未带有 *tubp-GAL80*。
- ### 2. 三种类型 MARCM clone 机率 (clone frequency) 的计算

- 1) 通过计算某一特定类型 clone 的发生机率，可推算果蝇神经发育过程中的不同时间点，神经母细胞或神经节母细胞的分裂速度，以及神经细胞的产生速度。例如幼虫孵化后 12~24 小时，假设其出现单细胞克隆的机率相较于其它时间点较低，且多细胞克隆出现的机率较高，则可推测 12~24 小时这段时间内神经节母细胞可能处于不分裂的状态，因而标记单细胞克隆的机率较低。以下说明计算三种 clone 发生机率的方法：以单细胞克隆的发生机率为例，以半脑 (单侧

的大脑) 为单位, **clone** 发生机率 = (带有单细胞克隆的半脑数)/(总样本半脑数)

◦

- 2) 当 **FLP** 表达在神经母细胞而造成染色体重组时, 其结果会使 **GAL80** 只表达于产生的神经节母细胞或新的神经母细胞, 理论上这样的机率是 50:50。因此, 双细胞克隆和多细胞克隆的 **clone** 发生机率理论上应该会一样或相近。

失败经验

使用的抗体的组合及浓度必须事先测试, 否则可能会因免疫荧光染色状况不佳, 而误判为没有 **MARCM** 克隆, 或是导致不能观察到 **GAL4** 表达较少的克隆的情形。

溶液配方

1. 1× PBS (磷酸盐缓冲生理盐水)

用二次过滤水稀释 10× PBS 至 1× PBS, 可放置于室温, 一般可储存数个月, 但视环境而异

2. 4%聚甲醛/磷酸盐缓冲生理盐水

以 1× PBS 稀释 20%聚甲醛至 4%聚甲醛溶液, 放置于碎冰上, 使用当天配制

3. PBST (3% Triton X-100/PBS, 1,000 ml)

3 ml Triton X-100

100 ml 10× PBS

897 ml 二次过滤水

须充分搅拌均匀, 一般可放置于室温数月, 但会因环境而异, 必须注意是否有霉菌生长, 一旦发现霉菌, 必须立即丢弃

4. 5%山羊血清 (Normal Goat Serum)

以 1× PBST 稀释 normal goat serum 至 5%, 放置于碎冰上, 需于使用当天配制

5. 第一抗体溶液

用 5%山羊血清 (溶液配方 4) 稀释第一抗体至特定浓度 (每种第一抗体适合的浓度不同), 放置于碎冰上, 使用当天配制

6. 第二抗体溶液

以 1:500 用 PBST 稀释, 放置于碎冰上, 使用当天配制

致谢

本研究方法首先于 Lee 和 Luo (1999) 描述。感谢蔡国鼎与刘南甫于本文撰写过程所提供的宝贵建议。本研究方法是由中央研究院前瞻计划 (AS-102-CDA-L02) 经费支持。本研究方法无任何利益冲突或竞争性利益。

参考文献

1. Lee, T. and Luo, L. (1999). [Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis](#). *Neuron* 22(3): 451-461.
2. Theodosiou, NA and Xu, T. (1998). [Use of FLP/FRT system to study *Drosophila* development](#). *Methods* 14(4): 355-365.
3. Wu, J. S. and Luo, L. (2006). [A protocol for mosaic analysis with a repressible cell marker \(MARCM\) in *Drosophila*](#). *Nat Protoc* 1(6): 2583-2589.