小鼠肠道干细胞流式分选

FACS Isolation of Mouse Intestinal Stem Cell

陈世阳，陈剑峰*

细胞生物学国家重点实验室，中国科学院分子细胞科学卓越创新中心，上海生物化学与细胞生物学研究所，中国科学院大学，上海

*通讯作者邮箱: jfchen@sibcb.ac.cn

引用格式: 陈世阳，陈剑峰. (2019). 小鼠肠道干细胞流式分选. *Bio-101* e1010306. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010306.

How to cite: Chen, S. Y. and Chen, J. F. (2019). FACS Isolation of Mouse Intestinal Stem Cell. *Bio-101* e1010306. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010306. (in Chinese)

摘要: 肠道黏膜上皮作为机体防御外界病原体的第一道防线，处于不断的自我更新和分化的状态，其自我更新的动力源于隐窝内的肠道干细胞。肠道干细胞具有持久的自我增殖和分化能力，从而维持肠道黏膜上皮快速的自我更新和损伤修复。通过流式细胞术富集分离出的肠道干细胞，不仅可以直接用于转录组、基因组测序等来研究干细胞的生物学特性，而且可以将分选得到的单个肠道干细胞进行体外的类器官培养 (Sato 和 Clevers, 2013; Hamilton 等, 2015)。通过单个细胞表面标志分子如 EphB2、CD24 和 CD166 等进行肠道干细胞的流式分选，很难去除祖细胞以及部分已分化的细胞。有研究报道通过 CD44⁺ CD24^{lo} CD166⁺ GRP78^{lo/-} c-Kit⁻ 等多个表面分子可以流式分选得到高效的肠道干细胞 (Wang 等, 2013)。对于小鼠肠道干细胞的分离，则可依赖于 *Lgr5-GFP* 的转基因小鼠来进行流式分选。本方案主要介绍利用 *Lgr5-GFP* 的荧光报告小鼠通过流式分选得到肠道干细胞的方法。

关键词: 肠道干细胞，肠道隐窝，流式分选

材料与试剂

1. 40 μ m 细胞筛 (Corning, catalog number: 431750)
2. 70 μ m 细胞筛 (Corning, catalog number: 431751)
3. 巴氏吸管 (3 ml, 上海晶安)

4. 10 cm dish (Griner, catalog number: 664160)
5. FACS 管 (BD Falcon)
6. 15 ml, 50 ml 离心管 (Gene Brick)
7. *Lgr5-EGFP-ires-CreERT2* (*Lgr5-GFP*) mice (Jackson Laboratory, USA)
8. FBS (NTC)
9. Rat anti-CD45 (1:200, BD Biosciences, catalog number: 557659)
10. Rat anti-CD31 (1:500, eBioscience, catalog number: 12-0311-82)
11. Rat anti-TER119 (1:500, eBioscience, catalog number: 12-5921-82)
12. Rat anti- EpCAM (1:300, eBioscience, catalog number: 17-5791-82)
13. Advanced DMEM/F12 (Life Technologies, catalog number: 12634028)
14. HEPES (Sigma-Aldrich)
15. GlutaMax (Gibco, catalog number: 35050061)
16. Penicillin-Streptomycin (Gibco, catalog number: 15140163)
17. N2 supplement (Gibco, catalog number: A1370701)
18. B27 supplement (Gibco, catalog number: 17504044)
19. N-Acetyl-L-cysteine (Sigma-Aldrich, catalog number: A9165)
20. D-PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ free, 预冷)
21. EDTA (Sigma-Aldrich)
22. Y-27632 (Sigma-Aldrich, catalog number: Y0503)
23. TrypLE Express (Gibco, catalog number: 12604021)
24. 7-AAD Viability staining solution (Life Technologies, catalog number: 00-6993-50)
25. Basal medium (见溶液配方)
26. Sorting medium (见溶液配方)

仪器设备

1. 眼用剪 (10 cm 直剪, 上海三友, catalog number: 042000)
2. 眼科镊 (10 cm 弯, 上海三友, catalog number: 044571)
3. 电动移液器 (Eppendorf Easypet 3)
4. 37 °C 水浴锅 (上海精宏, catalog number: DK-420)
5. 4 °C 离心机 (Eppendorf, model: 5804R)
6. 流式分选仪器 (BD Aria III)

实验步骤

一、分离小鼠小肠隐窝

1. 将 6~8 周的 *Lgr5-GFP* 小鼠执行安乐死后，取小鼠小肠，在离体前尽可能地去除肠系膜，用 PBS 冲洗肠道内的粪便，并沿肠道纵向剖开。
2. 用 ice-cold PBS 将肠道组织清洗两遍，并剪成 2~4 mm 的小片段，转移至 15 ml 离心管。
3. 向 15 ml 离心管中加入 12 ml 30 mM EDTA-PBS，水平置于冰上，在 4 °C 冷库摇床孵育 20 min。
4. 将组织转移到一个新的 15 ml 离心管中，加入 10 ml PBS，大力垂直手摇 4 min。
5. 待组织沉入管底后，将上清含有隐窝细胞的悬液过 70 μ m 细胞筛，置 50 ml 离心管中 (若需要得到大量的隐窝细胞，可重复步骤 3~5 两到三次)。
6. 将滤过的隐窝细胞悬液 150 $\times$ g，4 °C 离心 10 min。
7. 将上清小心去除，并用预冷的 PBS 或者 advanced DMEM/F12 将隐窝细胞清洗两次，离心步骤同 6。

二、分离肠道干细胞

1. 将一(7)中分离的隐窝细胞转移至新的 15 ml 离心管，2 ml TrypLE Express 消化液重悬，37 °C 水浴锅孵育 5~10 min。
2. 用 10 ml 移液管吹打重悬数次，取 10 μ l 细胞悬液于显微镜下进行镜检，> 50% 细胞消化成单细胞即可。
3. 加入终浓度为 10% 的 FBS，并将细胞悬液滤过 40 μ m 细胞筛。
4. 将滤过的隐窝细胞悬液 500 $\times$ g，4 °C 离心 5 min。
5. 用 Basal medium 清洗细胞 2 次，离心步骤同 4。
6. 将细胞进行 CD45/Ter119/CD31/EpCAM 染色 (不同抗体浓度参照抗体说明书)，4 °C 孵育 30 min (目的是为了去除免疫细胞等非上皮细胞)。
7. 500 $\times$ g，4 °C 离心 5 min，并用 PBS 洗两次。
8. 将细胞重悬于 Sorting medium 中 (约 5×10^6 个/ml)，上机前 5 min 进行 7AAD 染色，以去除死细胞。

- 将制备好的单细胞悬液转移至 FACS 管中，通过 Aria III 进行流式分选，gating strategy: 7-AAD-CD45-Ter119-CD31-Epcam⁺, GFP^{high} 的细胞群为肠道干细胞，GFP^{low} 的细胞群为祖细胞。

结果与分析

Lgr5-GFP 小鼠的绿色荧光呈嵌合表达，约 20% 的隐窝细胞有绿色荧光。富集分离得到的完整隐窝如图 1A，分选得到的 GFP^{high} 和 GFP^{low} 细胞群如图 1B。一只小鼠平均可分选得到 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个肠道干细胞和祖细胞。

图 1. 小鼠肠道隐窝和肠道干细胞的分离. A. 分离得到的完整的肠道隐窝. B. 流式分选得到 *Lgr5-GFP*^{high} 的肠道干细胞和 *GFP*^{low} 的祖细胞。

注意事项

- 实验过程中需要用到的 PBS 应精确配比，高温灭菌并预冷。
- 实验开始前将需要用到的试剂和培养基准备好，培养基可在 4 °C 保存不超过 2 周。
- B27 和 N-Acetyl-L-cysteine 呈酸性，加入培养基后，培养基颜色呈黄色。
- 第一次大力手摇后可能大部分都是绒毛，如果镜检时发现隐窝细胞很少可将该组分弃掉，取隐窝细胞富集的组分进行后续实验。
- 在对隐窝细胞进行消化时，根据细胞量可适当增加消化液体积。隐窝细胞浓度过高会导致在消化过程中死细胞结团，影响细胞得率。
- 如果离心过程中出现细胞不能完全沉降下来或者贴壁情况，可提前将 15 ml 和 50

ml 离心管用 FSB 或者 1% BSA-PBS coating。

7. CD45/Ter119/CD31 可选用同一荧光标记的抗体。

溶液配方

1. Basal medium
Advanced DMEM/F12
10 mM HEPES
1x GlutaMax
1x Penicillin-Streptomycin
2. Sorting medium
Basal medium
1x N2 supplement
1x B27 supplement
1 mM N-Acetyl-L-cysteine
10 μ M Y-27632

致谢

陈剑峰实验室的该工作得到了中国科学院大学，生物化学与细胞生物学研究所，中国科学院分子细胞科学卓越创新中心的大力支持。

参考文献

1. Hamilton, K. E., Crissey, M. A., Lynch, J. P. and Rustgi, A. K. (2015). [Culturing adult stem cells from mouse small intestinal crypts](#). *Cold Spring Harb Protoc* 4: 354-358.
2. Sato, T. and Clevers, H. (2013). [Primary mouse small intestinal epithelial cell cultures](#). *Methods Mol Biol* 945: 319-328.
3. Wang, F., Scoville, D., He, X. C., Mahe, M. M., Box, A., Perry, J. M., Smith, N. R., Lei, N. Y., Davies, P. S., Fuller, M. K., Haug, J. S., McClain, M., Gracz, A. D., Ding, S., Stelzner, M., Dunn, J. C., Magness, S. T., Wong, M. H., Martin, M. G., Helmrath, M. and Li, L. (2013). [Isolation and characterization of intestinal stem cells based on surface marker combinations and colony-formation assay](#). *Gastroenterology* 145(2): 383-395 e1-21.