人类多能干细胞基于多能性表面标志物的流式分析

Flow Cytometry of Human Pluripotent Stem Cells

李笑，程新*

生物化学与细胞生物研究所，中国科学院上海生命科学研究院，上海

*通讯作者邮箱: xcheng@sibcb.ac.cn

引用格式: 李笑，程新. (2019). 人类多能干细胞基于多样性表面标志物的流式分析. *Bio-101* e1010307.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010307.

How to cite: Li, X. and Cheng, X. (2019). Flow Cytometry of Human Pluripotent Stem Cells. *Bio-101* e1010307. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010307. (in Chinese)

摘要: 流式细胞术 (Flow Cytometry) 是通过带有荧光标记的抗体与细胞标志物的特异性结合，从而在单细胞水平上对标志物进行定量分析或分选的技术。基于蛋白标志物的表达位置是细胞表面还是细胞内部，一般有两种染色方式，对于细胞表面的蛋白标志物，多使用偶联荧光基团的特异性抗体来结合目的蛋白，流式细胞仪可以通过对荧光表达的检测来对细胞标志物的表达进行分析。对于细胞内部的蛋白标志物，需要对细胞先进行固定和穿膜通透，再通过一抗特异性结合目的蛋白，之后利用带有荧光基团的二抗特异性结合一抗，才能通过流式细胞仪检测相应荧光并对细胞标志物的表达进行分析。人类多能干细胞 (human pluripotent stem cells, hPSCs)，包括人胚胎干细胞 (human embryonic stem cells, hESCs) 和人诱导多能干细胞 (human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)，具有体外无限增殖和分化为各种细胞的潜能，表达于人类 ESC/iPSC 的标志物包括: SSEA3 (stage-specific embryonic antigen-3)，SSEA4 (stage-specific embryonic antigen-4)，TRA-1-60 (tumor-related antigen-1-60)，TRA-1-81 (tumor-related antigen-1-81)，OCT4，SOX2，NANOG 等 (Zhao 等, 2012)，通常情况下，我们通过流式细胞术检测 SSEA3，SSEA4 和 TRA-1-60，TRA-1-81 这两组表面蛋白标志物来对细胞进行定性分析。本文以人类胚胎干细胞 H9 ES 细胞系为例，用偶联不同荧光基团的抗体分别标记 SSEA3，SSEA4 和 TRA-1-60，TRA-1-81，通过流式细胞仪对两组蛋白标志物进行检测和分析。

关键词: 多能干细胞，胚胎干细胞，流式细胞术

材料与试剂

1. Matrigel Matrix (Corning, catalog number: 354230)
2. 细胞培养用 6 孔板 (Falcon, catalog number: 353046)
3. 0.25% Trypsin (Corning, catalog number: 25-053-CI)
4. 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum) (Corning, catalog number: 35-081-CV)
5. 牛血清白蛋白 (BSA) (Sigma-Aldrich, catalog number: A1470)
6. Alexa Fluor® 488 anti-human/mouse SSEA-3 (Biolegend, catalog number: 330306)
7. Alexa Fluor® 647 anti-human SSEA-4 (Biolegend, catalog number: 330408)
8. PE Mouse anti-Human TRA-1-60 Antigen (Biosciences, catalog number: 560193)
9. Alexa Fluor® 647 anti-human TRA-1-81 Antibody (Biolegend, catalog number: 330706)
10. 1× DPBS (Corning, catalog number: 21-031-CVR)
11. FACS buffer (见溶液配方)

仪器设备

1. 离心机 (Eppendorf, model: 5415R)
2. 流式细胞分析仪 (BD, model: FACSCelesta)
3. 显微镜
4. 移液枪
5. 培养箱

软件

1. FlowJo10.4.0

实验步骤

1. 人类胚胎干细胞 H9 ES 是用 1:6 稀释的 matrigel 基质胶配合小鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryonic feeder, MEF) 作为饲养层的常规培养方法, 可参考 Kennedy 等 (2007)。
2. 消化并收集细胞:

细胞培养于 6 孔板中，加入预热的 0.25% Trypsin，1 ml/孔，置于 37 °C 培养箱 1~2 分钟消化细胞，镜下看到细胞之间连接稍稍松散，加入血清 0.5 ml/孔，用移液枪吹打至单个细胞，转移至 50 ml 离心管中，加入 40 ml 1 × DPBS 洗涤，400 × g 离心，除去上清，留下细胞沉淀。

3. 用 1 × DPBS 1 ml 重悬细胞沉淀并对细胞进行计数，取出约 3×10^6 个 H9 ES 活细胞平均分装在 3 个 1.5 ml 离心管中，分别标记 Control 和 Test1, Test2。用 1 × DPBS 洗涤两次，每次加入 1 ml 1 × DPBS，400 × g 离心，除去上清，留下细胞沉淀。
 4. 配抗体稀释液：由于有两组不同的抗体，根据每组中两个抗体偶联的荧光基团不同，用 SSEA3 和 SSEA4 染 Test1 管中的细胞，用 TRA-1-60 和 TRA-1-81 染 Test2 管中的细胞。
 - 1) SSEA3 和 SSEA4 抗体稀释液：取 1 × DPBS 98 μ l，向其中加入 1 μ l Alexa Fluor® 488 anti-human/mouse SSEA-3 (1:100) 和 1 μ l Alexa Fluor® 647 anti-human SSEA-4 (1:100)。
 - 2) TRA-1-60 和 TRA-1-81 抗体稀释液：取 1 × DPBS 98 μ l 向其中加入 1 μ l PE Mouse anti-Human TRA-1-60 Antigen (1:100) 和 1 μ l Alexa Fluor® 647 anti-human TRA-1-81 Antibody (1:100)。
 5. 对 Control 管的细胞沉淀加入 100 μ l 1 × DPBS 重悬，对 Test1 管的细胞沉淀加入 100 μ l SSEA3 和 SSEA4 抗体稀释液重悬进行染色，对 Test2 管的细胞沉淀加入 100 μ l TRA-1-60, TRA-1-81 抗体稀释液重悬进行染色。
 6. 为了较长时间维持细胞的活性，将细胞置于冰上避光孵育 30 分钟。
 7. 400 × g 离心，除去上清，留下细胞沉淀。
 8. 洗涤 2 次：对 3 管细胞沉淀分别加入 1ml 1 × DPBS 重悬，400 × g 离心，除去上清。
 9. 用 1 × DPBS 约 400 μ l 重悬细胞并用流式细胞分析仪进行分析。
- 注：
- 1) 配制抗体稀释液时最好按抗体说明书推荐的比例进行稀释，如果说明书没有注明合适的浓度，需要测试不同的稀释比例，选取最适的抗体稀释比。
 - 2) 为保持细胞活性，对细胞进行离心时最好使离心机保持在 4 °C。

3) 根据流式细胞仪的检测最适体积以及细胞浓度来确定细胞上机时所需的重悬体积。

结果与分析

我们使用实验常用的人类胚胎干细胞 H9 ES 细胞系 (图 1)，用流式细胞分析仪 (BD FACSCelesta) 对 Control, Test1 和 Test2 三个样品进行检测。通过查询抗体偶联荧光基团的光谱，我们可以选择每个荧光对应的最合适的激发光，并选择合适的发射光收集通道，从而对荧光信号进行检测和分析。本实验中，H9 ES 细胞表面蛋白 SSEA3 和 SSEA4 偶联的荧光基团，分别可由流式细胞仪中的 488 nm 和 647 nm 波长的激光进行激发，由 FITC 和 APC 通道对二者的发射光进行收集，通过对荧光信号的检测和分析，推断出对应的蛋白标志物的表达情况。TRA-1-60 和 TRA-1-81 偶联的荧光基团分别可由 561 nm 和 647 nm 波长的激发光激发，由 PE 和 APC 通道对二者的发射光进行收集。

检测得到的数据除了可以直接在仪器上分析之外，也可以导出 “.fcs” 文件，用 FlowJo.exe 程序进行分析。本次实验导出 FCS 3.0 数据，用软件 FlowJo10.4.0 分析。分别将每组蛋白标志物中的两个抗体所带的荧光作为两个分析参数，我们用双参数点图加十字门进行分析 (图 2)。图中横纵坐标分别表示两个荧光信号相对强度的值，点代表细胞，通过颗粒密度反应同样荧光强度的细胞数量的多少，每个象限中的数字表示该区域的细胞的占比 (%)。Control 样品由于没有用抗体染色，作为阴性对照，得到的细胞类群应是没有荧光信号的，通过画十字形门，使该群细胞主群框在双阴性的象限中。复制同一分析模式，Test1 样品的结果显示其有 99.8% 的细胞处于 SSEA3⁺SSEA4⁺ 双阳性的象限中。同理，通过对 Test2 样品的 TRA-1-60 和 TRA-1-81 进行分析，结果显示有 96.5% 的细胞处于 TRA-1-60⁺ 和 TRA-1-81⁺ 双阳性的象限中，因此流式细胞术分析的结果证明该 H9 ES 细胞基本都表达人类多能干细胞标志性蛋白 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 和 TRA-1-81。

图 1. 培养中的 H9 ES 细胞形态图。图中集落状略微突起的是 H9 ES 细胞群，周围分支状的细胞是小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF)。

图 2. 流式细胞术分析显示 H9 ES 同时表达细胞表面蛋白标志物 SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 和 TRA-1-81. 图 A 从左向右依次是 Control, Test1, 横轴 FITC 标记 SSEA3, 纵轴 APC 标记 SSEA4, 图 B 从左向右依次是 Control, Test2, 横轴 PE 标记 TRA-1-60, 纵轴 APC 标记 TRA-1-81. 通过十字门分析, Test1 样品中有 99.8% 的细胞为 SSEA3⁺SSEA4⁺, Test2 样品中有 96.5% 的细胞 TRA-1-60⁺和 TRA-1-81⁺。

失败经验

1. 确保抗体均按照说明书正确存储。
2. 抗体稀释浓度不合适。如果说明书没有注明合适的浓度，需要测试不同的稀释比例，选取最适的抗体稀释比。
3. 确保抗体连接了合适的荧光素，如果没有偶联荧光素，需加入连接有荧光素的二抗。
4. 确保调整到合适的电压，找到目标细胞群。

5. 确保使用正确的激发光来激发荧光素，并使用正确的通道来检测荧光。
6. 确保使用的抗体偶联的不同荧光素的光谱之间没有重叠，如果荧光素的光谱之间有重叠，有可能造成荧光之间的串色，需要进行补偿调节。也可以通过调节电压，或者对不同抗体进行单染等方法，减小不同荧光素之间的相互串扰。
7. 在做流式分析时候，由于本实验中所用的 H9 ES 培养体系中除了 ES，还有 MEF，所以在做流式分析时候，有可能出现极少比例的阴性细胞，可能是 MEF 产生的信号。

溶液配方

1. FACS buffer
 - 1× DPBS
 - 0.5% BSA
 - 在 4 °C 保存

致谢

程新实验室的工作得到中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所的支持。本文实验方案改编自文章 Cheng 等 (2012)。

参考文献

1. Cheng, X., Ying, L., Lu, L., Galvao, A. M., Mills, J. A., Lin, H. C., Kotton, D. N., Shen, S. S., Nostro, M. C., Choi, J. K., Weiss, M. J., French, D. L. and Gadue, P. (2012). [Self-renewing endodermal progenitor lines generated from human pluripotent stem cells](#). *Cell Stem Cell* 10(4): 371-384.
2. Kennedy, M., DSouza, S. L., Lynch-Kattman, M., Schwantz, S., and Keller, G. (2007). [Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures](#). *Blood* 109(7): 2679-2687.
3. Zhao, W., Ji, X., Zhang, F., Li, L., and Ma, L. (2012). [Embryonic stem cell markers](#). *Molecules* 17: 6196-6236.