应用流式细胞技术分选小鼠各级精母细胞的方法

Isolation of Mouse Spermatocytes Using Flow Cytometry

林震*, 陈瑶, 张玉洁, 童明汉*

分子生物学国家重点实验室, 上海市分子男科学重点实验室, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 中国科学院生物化学与细胞生物研究所, 中国科学院大学, 上海 200031

*通讯作者邮箱: minghan@sibcb.ac.cn (童明汉), linzhen2014@sibcb.ac.cn (林震)

引用格式: 林震, 陈瑶, 张玉洁, 童明汉. (2019).应用流式细胞技术分选小鼠各级精母细胞的方法. *Bio-101* e1010320. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010320.

How to cite: Lin, Z., Chen, Y., Zhang, Y. J. and Tong, M. H. (2019). Isolation of Mouse Spermatocytes Using Flow Cytometry. *Bio-101* e1010320. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010320. (in Chinese)

摘要: 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。根据染色质形态, 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。高效地分选减数分裂时期尤其是 MI 前期各阶段的精母细胞是深入探索减数分裂调控机制的基础。本方案以小鼠为例, 提供一种应用流式细胞技术, 根据精母细胞的核型 (Hoechst 染色) 分选各级精母细胞的方法。本方案获得的各级精母细胞适用于各种常规的生化和分子实验。

关键词: 小鼠, 精母细胞, Hoechst 染色, 流式细胞技术

材料与试剂

1. CO₂ 安乐死箱
2. 剪刀
3. 镊子
4. 培养皿
5. 5 ml 塑料滴管, 15 ml 离心管, 50 ml 离心管, 5 ml 流式管
6. 雄性小鼠 (C57BL/6, 3 周龄及以上)
7. 胎牛血清 (FBS)

8. 常规驴血清 (Jackson ImmunoResearch, catalog number: 017-000-121)
9. 一抗: 兔抗 SYCP3 (Abcam, catalog number: ab15093, 稀释比 1:500), 鼠抗 γ H2AX (Millipore, catalog number: 050636, 稀释比 1:1000)
10. 荧光二抗: Alexa Fluor 488 抗鼠 IgG; Alexa Fluor 594 抗兔 IgG
11. DMEM (Hyclone, catalog number: SH30243.01)
12. 0.25%胰酶 (Gibco, catalog number: 25200072)
13. I 型胶原酶 (Worthington, catalog number: LS004196)
14. DNase I (Sigma-Aldrich, catalog number: DN25)
15. Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, catalog number:14533)
16. 磷酸盐缓冲液 (1x PBS)
17. 碘化丙啶 (PI) (碧云天, catalog number: ST511)
18. Triton X-100 (Sigma-Aldrich, catalog number: T8757-500ML)
19. 柠檬酸钠 (Sigma-Aldrich, catalog number: S1804-500G)
20. EDTA (沪试, catalog number: 10009617)
21. 蔗糖 (沪试, catalog number: 10021418)
22. NaOH (上海实验试剂有限公司, 174320)
23. PMSF (Sigma-Aldrich, catalog number: 78830)
24. DTT (Sigma-Aldrich, catalog number: 43815)
25. Tris (AMRESCO, catalog number: 0497-500G)
26. PFA (AMRESCO, catalog number: J531-500G)
27. Tris-HCl
28. 硼酸
29. I 型胶原酶溶液 (见溶液配方)
30. DNase I 溶液 (见溶液配方)
31. Hoechst 33342 溶液 (见溶液配方)
32. 碘化丙啶 (PI) 溶液 (见溶液配方)
33. 低渗液 (见溶液配方)
34. 1% PFA (见溶液配方)
35. 封闭液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 杂交炉 (UVP Hybrilinker Oven)
2. 流式细胞仪 (BD, model: Aria-II)
3. 荧光显微镜 (Zeiss, model: Axio Scope.A1)
4. 水浴锅

实验步骤

一. 睾丸组织的消化

1. 于 32 °C 杂交炉中预热 PBS、胶原酶和 0.25%胰酶。
2. 将小鼠经 CO₂ 安乐死，取其双侧睾丸，置于含预冷 PBS 的 6 孔板中。
3. 剥除睾丸被膜，并将生精小管充分扯散，每侧睾丸分别置于含 5 ml 预热胶原酶的 15 ml 离心管中，于 32 °C 杂交炉中以 120 rpm 的转速消化 10 分钟，此时生精小管变得细而透明。
4. 室温静置 1 分钟，吸出 4 ml 上清于新的离心管中并置于冰上，原离心管中保留睾丸组织和 1 ml 胶原酶。
5. 往原离心管中加入 4 ml 预热的 PBS、5 ml 预热的胰酶以及 100 µl DNase I，于 32 °C 杂交炉中以 120 rpm 的转速消化 8 分钟，在消化至 5 分钟时，用塑料滴管吹打组织 30 次左右，帮助组织更充分地、与胰酶接触。
注：吹打的步骤切忌用枪头，避免其剪切力过高对细胞造成损害；胰酶消化后液体变得浑浊，无大的组织团块，可见细碎的管状组织，并常伴有少许透明胶状物 (即破碎的细胞释放出的 DNA)。若管状物过多，则表示消化的不充分，若透明胶状物过多，则表明消化过度。本步骤是决定细胞状态的关键一步，初学者需通过不断取样镜检，观察组织的消化状态、细胞的活率等而确定消化的最佳条件。
6. 加入 0.5 ml FBS 终止消化，加入 100 µl DNase I，用塑料滴管轻轻吹打 30 次左右，将细胞悬液及第 4 步的上清液经 70 µm 滤网过滤到 50 ml 离心管中。
7. 计数，一只成年小鼠两侧睾丸可获得约 $5\sim 8 \times 10^7$ 细胞，500 × g 离心 4 分钟。

二. Hoechst 染色

1. 根据计数结果，用 DMEM 将细胞重悬成 10^6 细胞/ml，加入 10 μ l DNase I，并按照 5 μ g/ 10^6 细胞的量加入 Hoechst。

注：重悬时先加 1 ml DMEM 和 10 μ l DNase I，轻弹使沉淀重悬，再加 DMEM 将悬液稀释成 10^6 细胞/ml。

2. 32 °C 杂交炉中以 60 rpm 的转速染色 30 分钟。
3. 500 $\times$ g 离心 4 分钟。去上清，用含 2% FBS、10 μ g/ml DNase I 的 DMEM 重悬，细胞浓度控制在 10^7 /ml。

三. 流式分选

1. 在即将上机时，向细胞悬液中加入 PI (1 μ g/ 10^6 细胞)，用 40 μ m 滤网过滤至流式管中。
2. 样品上机，流速控制在 6,000 细胞/秒以内，预展示 50,000 个细胞，在工作表中画实验所需模板：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/DAPI-A 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 1F。

注：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，但是其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。

3. 接收管内加入含 2% FBS 的 DMEM 作为接收液，将感兴趣的细胞群体收集到接收管中。所得细胞镜检、计数、验证、离心收集，即可用于其他下游实验。

图 1. 流式分选小鼠精母细胞的设门策略

四. 细胞类型验证

1. 分选后的各级精母细胞分别取 50 μ l 置于 1.5 ml 离心管中，向其中加入 50 μ l 低渗液（配制方法参考溶液配方），混匀，于室温低渗 10 分钟；
2. 500 $\times g$ 室温离心 4 分钟，去上清；
3. 加入 10 μ l 100 mM 的蔗糖溶液，重悬细胞；
4. 玻片上滴加 40 μ l 1%PFA 溶液（配制方法参考溶液配方），涂抹均匀，立即将 10 μ l 细胞悬液滴加至玻片上，并置于留有些许缝隙的湿盒中。约 2 小时后，玻片即可晾干，用于免疫荧光染色；
5. 上述精母细胞铺片用 PBST（含 0.1%Triton X-100 的 PBS）洗涤 10 分钟，室温封闭 1 小时（封闭液配制方法参考溶液配方），以封闭液稀释一抗，于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜；
6. PBST 洗涤 3 次，每次 10 分钟，以封闭液稀释二抗，于室温孵育 1 小时；
7. PBST 洗涤 3 次，每次 10 分钟，封片；
8. 荧光显微镜观察。

结果与分析

流式分选所得各级精母细胞通过核铺展结合免疫荧光染色验证细胞类型。细胞铺片以 SYCP3 (联会复合体侧轴组分的标志物) 和 γ H2AX (指示 DNA 双链断裂的信号) 抗体共染免疫荧光, 对所收细胞的纯度进行鉴定。细线前期精母细胞尚未发生联会复合体的组装及 DNA 双链断裂, 其 SYCP3 信号呈斑块状分布, γ H2AX 染色弱阳性; 细线期精母细胞发生联会复合体侧轴组分的组装以及 DNA 双链断裂, 其 SYCP3 呈不连续的线状信号, γ H2AX 信号逐步积累并弥散于整个核; 偶线期精母细胞阶段联会复合体侧轴组分已组装完全, 发生同源染色体的联会及 DNA 双链断裂的修复, 可见 SYCP3 信号为连续的线状并有不同程度的联会现象, γ H2AX 信号随着 DNA 双链断裂的修复也逐渐减少; 粗线期精母细胞同源染色体完全联会, 常染色体上的 DNA 双链断裂均已修复, SYCP3 呈短棒状信号, γ H2AX 信号只存在于性染色体上; 双线期发生同源染色体的解联会, 通过 SYCP3 信号可观察到不同程度的解联会现象, γ H2AX 信号只存在于性染色体上。免疫荧光结果显示, 各个阶段细胞的纯度均在 70% 以上, 污染主要来自于相邻阶段细胞的混入 (图 2A~E)。由于门的设定直接影响细胞的纯度, 若对纯度有更高要求, 可缩小圈选的范围。

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 μ m。通过统计得出纯度结果(E)。

失败经验

消化所得细胞过少：

1. 消化不充分，未充分消化的组织团块在过滤时被丢弃。

注：消化过程中应随时取样镜检，观察消化状态。在胰酶消化时中间需用塑料滴管吹打，帮助组织与胰酶充分接触。

2. 消化过度，细胞破碎。

注：消化过程中应随时取样镜检，消化至理想状态时应立即加 **FBS** 终止消化。

3. 胰酶消化后未加足够量的 **DNase I**。

注：消化时会不可避免地造成少量细胞破碎，其释放出的 **DNA** 会聚集产生透明胶状物，过滤时会堵塞滤网。胰酶消化后应加 **DNase I** 并吹打至透明胶状物消失。

流式分选时细胞碎片过多或 **PI** 阳性细胞过多：

1. 消化过度或消化后的细胞未妥善保存。

注：消化过程中应随时取样镜检，消化至理想状态时应立即加 **FBS** 终止消化。消化并染色后的细胞在重悬时应用含 **2% FBS** 的 **DMEM** 重悬，置于冰上，并尽快上机分选。

2. **PI** 加的过早或用量过大。

注：**PI** 是有细胞毒性的染料，应在即将上机时再加入，并应严格控制用量。

分选后细胞得率低：

1. 机器状态问题。

注：检查流式细胞仪液流的稳定性、**drop delay** 参数及分选电压等。

2. 接收液问题。

注：接收管中应加 **1 ml** 左右的接收液，一般用含 **2% FBS** 的 **DMEM** 作为接收液。

分选后细胞纯度低：

1. 通常与门的设置有关。

注：根据纯度鉴定结果调整门的位置。

溶液配方

1. **I** 型胶原酶溶液

I 型胶原酶粉末用 PBS 溶解成 120 U/ml

4 °C 可短期保存，分装后冻存于-20 °C

2. DNase I 溶液

DNase I 粉末用 PBS 溶解成 5 mg/ml

4 °C 可短期保存，分装后冻存于-20 °C

3. Hoechst 33342 溶液

Hoechst 33342 粉末用 ddH₂O 溶解成 10 mg/ml

4 °C 保存

4. 碘化丙啶 (PI) 溶液

碘化丙啶粉末用 ddH₂O 溶解成 10 mg/ml

4 °C 保存

5. 低渗液

1) 30 mM Tris-HCl (pH 8.2), 50 mM 蔗糖, 17 mM 柠檬酸钠, 5 mM EDTA, 用 50 mM 硼酸调 pH 至 8.2~8.4

2) 使用前加入终浓度为 2.5 mM 的 DTT 和 0.5 mM 的 PMSF

6. 1% PFA

1) 称取 0.25 g PFA 置于 50 ml 离心管中, 加入 22.5 ml ddH₂O

2) 向其中滴加 1 滴 1 M 的 NaOH 助溶, 于 60 °C 水浴 20 分钟以上, 其间颠倒混匀数次, 至 PFA 完全溶解

3) 溶解后的 PFA 冷却至室温, 用 50 mM 硼酸调 pH 至 9.2~9.4, 加入 50 µl Triton X-100, 振荡, 补足体积至 25 ml

7. 封闭液

常规驴血清用 PBST (含 0.1% TritonX-100 的 PBS) 稀释至 10%

致谢

本项目得到中国科学院战略性先导科技专项 (XDB19000000), 国家重点研发计划 (2018YFC1003401 和 2016YFC1000605), 国家自然科学基金 (31671553), 上海市科学与技术委员会基金 (17JC1420102) 以及中科院生化与细胞所基金的支持。感谢中科院生化与细胞所细胞分析技术平台、动物实验技术平台提供的技术与设施服务。本文的

实验方案是在之前已发表文章 (Gaysinskaya 等, 2014) 的基础上改进的, 已用于本实验室发表的文章 (Lin 等, 2017) 和 (Chen 等, 2018) 中。

参考文献

1. Chen, Y., Zheng, Y., Gao, Y., Lin, Z., Yang, S., Wang, T., Wang, Q., Xie, N., Hua, R., Liu, M., Sha, J., Griswold, M. D., Li, J., Tang, F. and Tong, M. H. (2018). [Single-cell RNA-seq uncovers dynamic processes and critical regulators in mouse spermatogenesis.](#) *Cell Res* 28(9): 879-896.
2. Gaysinskaya, V., Soh, I. Y., van der Heijden, G. W. and Bortvin, A. (2014). [Optimized flow cytometry isolation of murine spermatocytes.](#) *Cytometry A* 85(6): 556-565.
3. Lin, Z., Hsu, P. J., Xing, X., Fang, J., Lu, Z., Zou, Q., Zhang, K. J., Zhang, X., Zhou, Y., Zhang, T., Zhang, Y., Song, W., Jia, G., Yang, X., He, C. and Tong, M. H. (2017). [Mettl3-/Mettl14-mediated mRNA N⁶-methyladenosine modulates murine spermatogenesis.](#) *Cell Res* 27(10): 1216-1230.