小鼠乳腺干细胞流式分选

FACS Sort Mouse Mammary Stem Cells

宋文倩，曾艺*

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

*通讯作者邮箱: yzeng@sibcb.ac.cn

引用格式：宋文倩，曾艺. (2019). 小鼠乳腺干细胞流式分选. *Bio-101* e1010321. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010321.

How to cite: Song, W. Q. and Zeng, Y. (2019). FACS Sort Mouse Mammary Stem Cells. *Bio-101* e1010321. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010321. (in Chinese)

摘要：流式分选可根据细胞发射的不同荧光实现细胞分群及单克隆分选，从而进一步研究不同细胞的基因、蛋白等表达差异。由于其具有检测灵敏度高，回收率高的特点而被广泛用于干细胞的研究。本方案以小鼠乳腺为例，通过流式分选，富集乳腺干细胞类群。为进一步研究乳腺干细胞的生理生化特性及分化潜能提供了基础。

关键词：乳腺干细胞，流式分选

材料与试剂

1. 平皿盖
2. 剪刀
3. 滤膜 (40 μ m, 70 μ m)
4. 胶原酶 III (Worthington, catalog number: LS004183)
5. DNase I (Sigma-Aldrich, catalog number: D4263)
6. 胎牛血清 (HyClone, catalog number: SH30396.03)
7. 胶原蛋白酶 III
8. 流式抗体来源及使用浓度 (表 1)

表 1. 流式抗体来源及使用浓度

抗体名称	来源	公司	货号	使用浓度
FITC-conjugated-CD31	rat	BD	553372	2.5 µg/ml
FITC-conjugated-CD45	rat	BD	553080	2.5 µg/ml
FITC-conjugated- TER119	rat	BD	557915	2.5 µg/ml
CD24-PE/cy7	rat	Biolegend	101822	1 µg/ml
CD29-APC	Hamster	Biolegend	102216	1 µg/ml
FITC-conjugated-CD201	mouse	eBioscience	12-2012-82	1 µg/ml

9. Trypsin-EDTA 0.05% phenol red (Invitrogen, catalog number: 25300062)
10. RPMI 1640 培养液 (Gibco, catalog number: C1187550BT)
11. DMEM 高糖培养液 (Hyclone, catalog number: SH30243.01)
12. PBS
13. 消化缓冲液
14. DMEM 培养基
15. 红细胞裂解液 (Sigma-Aldrich, catalog number: R7757)
16. PS 双抗
17. 组织消化液（见溶液配方）

仪器设备

1. 流式细胞仪 FACSJazz (Becton Dickinson)
2. 细胞培养箱 (Esco)
3. 冷冻离心机 (Eppendorf)
4. 生物安全柜 (Esco)
5. 天平 (Sartorius)
6. 摇床 (Tensuc)
7. 水浴锅

实验步骤

一. 获取乳腺组织及消化

1. 配制组织消化缓冲液: 在RPMI 1640培养液中, 加入5%的胎牛血清, 1%的PS双抗, 25 mM HEPES (pH 8.0)。37 °C水浴锅中预热备用。
2. CO₂箱中安乐死小鼠。收取小鼠乳腺, PBS清洗后, 放到6 cm平皿盖中, 用剪刀剪碎组织至肉糜状, 称取组织重量。
3. 按照每克乳腺组织10 ml消化液准备好消化缓冲液, 放在50 ml离心管中 (不超过30 ml/管)。加入胶原蛋白酶III (终浓度300 U/ml)。将剪碎的组织加入配好的消化缓冲液中, 摇匀。
4. 将装有组织的离心管平放在37 °C摇床中, 100转/分钟, 消化2 h, 期间每15 min剧烈摇晃一次。组织充分消化后, 消化液呈均一状态, 无肉眼可见组织块, 只有脂肪滴浮在液体表面。

二. 分离单细胞

1. 取出组织消化液, 用常温的PBS补齐50 ml体积。201 × g, 4 °C离心使细胞沉淀。离心时升速的加速度为9, 降速的加速度为0或1, 离心5 min。
2. 去除上层脂肪及上清, 加入1~2 ml红细胞裂解液, 轻弹重悬沉淀, 室温静置5 min。转移细胞到15 ml离心管中, 加入PBS补齐15 ml。
3. 201 × g, 4 °C离心5 min使细胞沉淀, 吸除上清。加入2 ml预热的0.05% trypsin-EDTA重悬沉淀, 37 °C培养箱中孵育5 min, 期间轻弹管壁一次使细胞更好地消化。此时会形成白色絮状细胞团, 这是由于死亡细胞释放DNA导致的。
4. 加入2 ml预热的无血清DMEM培养基, 再加入0.1 mg/ml 的DNase I, 放在37 °C继续孵育5 min。期间, 轻弹管壁使更多的单细胞释放出来。用10 ml含5%胎牛血清的PBS终止胰酶反应。
5. 将细胞通过70 μm滤膜过滤, 去除细胞团块。201 × g, 4 °C离心5 min, 吸除上清; 用预冷的5%的胎牛血清重悬沉淀 (大约每4个乳腺150~200 μl体积), 置于冰上备用。

三. 流式分选乳腺干细胞

1. 取出少量细胞进行单色抗体染色 (约50 μ l), 用于FACS时做颜色补偿。剩余细胞加入一抗染色, 冰上孵育20 min。期间轻弹细胞沉淀以使细胞能够充分染色。
2. 用含5%胎牛血清的PBS补齐15 ml体积后离心, 吸除上清, 用500~1,000 μ l 5%的胎牛血清重悬沉淀, 冰上孵育二抗20 min。
3. 离心, 5%的胎牛血清重悬沉淀, 通过40 μ m滤膜过滤细胞, 做好分选准备。
4. 进行流式分选, 用含50%胎牛血清的PBS承接分选到的细胞。15 ml管中预放7~8 ml承接液。

结果与分析

如图 1 所示, 在小鼠乳腺单细胞悬液中框取 FSC 较大的活细胞 (SSC 选择 log 展示)。接着去掉粘连细胞, 框取单细胞。在单细胞中选择 CD31/CD45/Ter119 阴性的细胞。根据 CD24 和 CD29 的表达框取 luminal, basal 和 stroma 细胞。Basal 细胞为 CD24⁺CD29^{high} 的一群。根据之前的报道, 乳腺干细胞特异性存在于 basal 细胞层中, 在成年 (8w 及以上) ICR 品系的小鼠乳腺中占 3%左右。

图 1. 小鼠乳腺干细胞分选示意图

失败经验

如果存在单细胞得率低的情况，可以考虑从以下几点改进：

1. 第一步消化不够充分：组织在消化前可以剪得更碎一些；在消化过程中，可以更加剧烈地摇晃以使组织更加充分地消化。
2. 在胰酶和 DNA 酶处理时细胞损失：如果胰酶和 DNA 酶消化不够完全，可能导致细胞形成团块，留在滤膜上，从而减少单细胞得率。如果出现这种情况，可以适当增加处理的强度，可以用移液器吹打团块细胞，使更多的单细胞释放出来。

如果出现细胞分群不好的情况，可以考虑：

1. 单细胞少，很多细胞是由 2~3 个细胞组成的细胞团块。
2. 在加抗体孵育过程中，细胞过多形成沉淀。在冰上孵育时，应该过 10 分钟轻弹一次沉淀，使细胞能够更充分地染色。

溶液配方

1. 组织消化液

在 RPMI 1640 培养液，加入 5% 的胎牛血清，1% 的 PS 双抗，25 mM HEPES (pH 8.0)。使用之前加入 300 U/ml 的胶原蛋白酶 III

致谢

曾艺实验室的工作得到国家自然科学基金的支持。本文实验方案用于本实验室发表的文章 (Cai 等, 2014; Wang 等, 2015; Song 等, 2019)。

参考文献

1. Cai, C., Yu, Q. C., Jiang, W., Liu, W., Song, W., Yu, H., Zhang, L., Yang, Y. and Zeng, Y. A. (2014). [R-spondin1 is a novel hormone mediator for mammary stem cell self-renewal](#). *Genes Dev* 28: 2205-2218.
2. Song, W., Wang, R., Jiang, W., Yin, Q., Peng, G., Yang, R., Yu, Q. C., Chen, J., Li, J., Cheung, T. H., Jing, N. and Zeng, Y. A. (2019). [Hormones induce the](#)

- [formation of luminal-derived basal cells in the mammary gland.](#) *Cell Res* 29(3): 206-220.
3. Wang, D., Cai, C., Dong, X., Yu, Q. C., Zhang, X. O., Yang, L. and Zeng, Y. A. (2015). [Identification of multipotent mammary stem cells by protein C receptor expression.](#) *Nature* 517(7532): 81-84.