

小鼠背根神经节细胞类型特异神经元流式分选

Isolation of Cell-Type-Specific Neurons in Mouse Dorsal Root Ganglion by FACS

姜博文¹, 鲍岚¹, 王斌^{1,2,*}

¹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, 生物化学与细胞生物学研究所, 中国科学院, 上海; ²上海脑科学与类脑研究中心, 上海

*通讯作者邮箱: wangbin@sibcb.ac.cn

引用格式: 姜博文, 鲍岚, 王斌. (2019). 小鼠背根神经节细胞类型特异神经元流式分选. *Bio-101* e1010323.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010323.

How to cite: Jiang, B. W., Bao, L. and Wang, B. (2019). Isolation of Cell-Type-Specific Neurons in Mouse Dorsal Root Ganglion by FACS. *Bio-101* e1010323. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010323. (in Chinese)

摘要:初级感觉神经元是介导躯体感觉传导的一类假单极神经元, 包括传递疼痛、痒觉、热、机械感觉、本体感觉以及多种伤害性刺激反应。初级感觉神经元的胞体聚集在一起形成背根神经节 (Dorsal Root Ganglion, DRG), 具有很高的细胞异质性。近年来大规模的单细胞测序技术根据不同的分子标记物和躯体感觉传递功能将初级感觉神经元分为 10 类 (Li 等, 2016)。然而, 不同细胞类型的初级神经元发挥躯体感觉传递功能的分子调控机制却远未研究清楚。流式细胞分选能够将荧光标记的细胞分选并富集, 是研究特异类型细胞功能和分子机制的重要技术。目前, 流式分选在肿瘤、免疫和干细胞等领域广泛应用, 但在初级感觉神经元中的研究相对较少。本文主要介绍了在 *Sst-Cre;Ai9-tdTomato* 小鼠中得到选择性表达 Somatostatin 这类初级感觉神经元的流式分选方法。

关键词: 背根神经节神经元; 细胞类型特异; 流式分选

材料与试剂

1. 咬骨钳 (WPI, catalog number: 501333)
2. 系结镊 (苏州六六视觉科技股份有限公司, catalog number: 53320A)
3. 维纳斯剪 (苏州六六视觉科技股份有限公司, catalog number: 54139B)
4. 玻璃吹管 (工厂自制)
5. 15 ml 离心管 (Corning, catalog number: 430790)

6. 玻璃底皿 (Cellvis, catalog number: D29-20-1-N)
7. 盖玻片
8. 细胞滤网
9. *Sst-Cre;Ai9-tdTomato* 成年小鼠 (由 *Sst-Cre* (Jackson Lab 品系编号 018973) 和 *Ai9-tdTomato* (Jackson Lab 品系编号 007909) 交配得到)
10. 胶原酶 (Sigma-Aldrich, catalog number: C9891)
11. DNA 酶 I (Sigma-Aldrich, catalog number: DN25)
12. 胰蛋白酶 (Sigma-Aldrich, catalog number: T8003)
13. 胎牛血清 (Ausbian, catalog number: VS500T)
14. 左旋多聚赖氨酸 (PDL) (Sigma-Aldrich, catalog number: P0899)
15. L-15 培养基 (Gibco, catalog number: 11415-056)
16. DMEM 基础培养基 (Gibco, catalog number: 10313-021)
17. Neurobasal 基础培养基 (Gibco, catalog number: 21103-049)
18. B27 辅助因子 (Gibco, catalog number: 17504-044)
19. Percoll 分离液 (Yeasen, catalog number: 40501ES60)
20. 双抗 (青链霉素) (Gibco, catalog number: 15070-063)
21. DAPI (Thermo Fisher, catalog number: D1306)
22. 无水乙醇
23. KCl
24. KH₂PO₄
25. NaCl
26. Na₂HPO₄·12H₂O
27. 磷酸缓冲液 (1× PBS) (见溶液配方)
28. 磷酸缓冲液 (10× PBS) (见溶液配方)
29. DMEM 完全培养基 (见溶液配方)
30. Neurobasal 完全培养基 (见溶液配方)
31. 10× 背根神经节组织消化液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 流式自动分选仪 (SONY, model: MA900)
2. 倒置荧光显微镜(Olympus, model: IX73)
3. Eppendorf 离心机 (Eppendorf, model: 5810R)
4. 37 °C 水浴锅 (常州诺基仪器有限公司, model: HH-420)
5. 超净工作台
6. 培养箱

实验步骤

实验前准备

1. 使用进口的盖玻片经无水乙醇漂洗三次后，室温晾干。
2. 将混合有 0.5 mg/ml 的左旋多聚赖氨酸 (PDL) 滴加于盖玻片上，37 °C 孵育 2 h 或 4 °C 过夜。
3. 用双蒸水漂洗包被的盖玻片三遍，在超净台下吹干或放于 37 °C 培养箱中烘干。
烘干后在培养前用 DMEM 完全培养基孵育于培养箱内。

小鼠 DRG 取材

4. 取 6 只 *Sst-Cre;Ai9-tdTomato* 成年小鼠 (25~30 g)，准备器械 (咬骨钳，系结镊，维纳斯剪等)，取材前，准备 L-15 培养基并放于冰上。
5. 小鼠断头处死，剪开背部皮肤并划开背部肌肉，用咬骨钳清除肌肉至暴露棘突 (图 1A 和 1B)。通过咬骨钳去除棘突后暴露脊髓以及两侧 DRG，利用系结镊和维纳斯剪将分布于脊髓两侧的背根神经节取下 (图 1C 和 1D)。用维纳斯剪将较大的 DRG 剪碎，放入 L-15 培养基中。

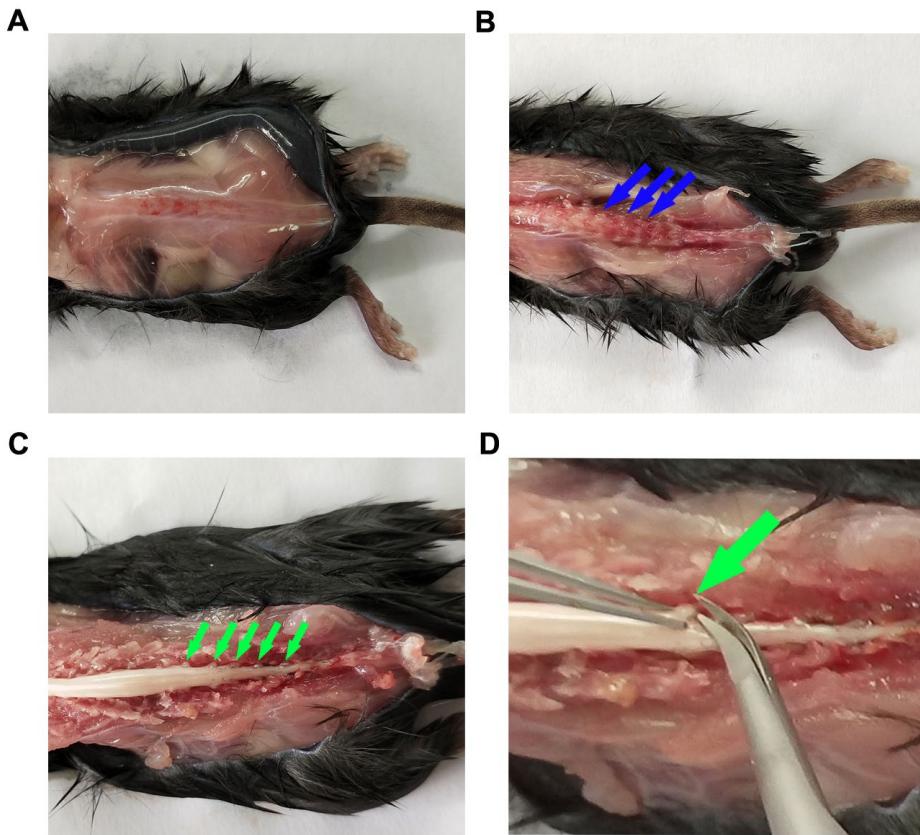


图 1. 小鼠背根神经节取材流程. A. 剪开小鼠背部皮肤。B. 手术刀划开背部肌肉, 咬骨钳清除肌肉至暴露棘突 (蓝色箭头标记处)。C. 咬骨钳暴露脊髓和脊髓两侧的 DRG (绿色箭头标记处)。D. 利用系结镊和维纳斯剪将 DRG (绿色箭头标记处) 取下。

DRG 神经元的分离

6. 用 DMEM 基础培养基漂洗 DRG 组织三遍, 用 DMEM 基础培养基将 10× 消化液配制成 1× 消化液, 在水浴锅 37 °C 消化 35~40 分钟 (根据不同批次消化酶的效率以及组织剪碎的情况而定), 消化过程中每隔 5~6 分钟摇晃一次。
7. 消化结束后, 加入 DMEM 完全培养基终止消化, 同时用 DMEM 基础培养基漂洗三遍。准备三类不同口径大小 (直径分别为 2 mm、1 mm 和 0.5 mm) 的玻璃吹管, 从大至小对 DRG 组织进行吹打, 每根吸管大约 5~10 下左右 (无需将所有组织吹散, 用力过大或吹打次数过多均会影响神经元的状态)。
8. 在细胞悬液中加入 15% 的 Percoll 分离液, $430 \times g$ 离心 5 分钟。
9. 弃上清后, 重新加入 DMEM 基础培养基, 并重悬沉入管底的神经组织, $136 \times g$ 离

心 5 分钟后弃上清，加入 1× PBS (青霉素 50 U/ml, 链霉素 50 µg/ml) 重悬细胞后进行后续的流式分选实验。

10. 将制备好的细胞悬液通过细胞滤网过滤后，转移至细胞流式管中。SONY MA900 流式分选仪进行分选，为了减少分选的假阳性细胞，首先采取死细胞的分选去除。在分选前，加入 DAPI 染料 (500 ng/ml) 染色 2 分钟，用 405 nm 通道激发去除 DAPI 阳性的死细胞类群。
11. 在去除死细胞的神经元中，进一步选取 *tdTomato* 作为荧光标准，采取 Purity 程序进行分选，同时准备 15 ml 离心管进行收集分选的红色阳性细胞。
12. 将分选后的细胞离心， $136 \times g$ 离心 5 分钟，加入 DMEM 完全培养基重悬，种入包被好 PDL 的玻璃底皿中。等细胞完全贴壁 6 小时后，换取 Neurobasal 完全培养基，荧光显微镜下观察和拍照并进行后续实验。

结果与分析

在分选的过程中，我们可以发现具有红色荧光的 Somatostatin 阳性神经元在背根神经节比例为 5.64% (图 2A 和图 2B)。在分选前培养的 Somatostatin 神经元中，红色阳性的神经元零散的分布于整体培养细胞中。经过分选后，可以发现明场视野中的细胞几乎全部为带有红色荧光的神经元，提示我们成功分选了小鼠中 Somatostatin 阳性的背根神经节神经元 (图 2C)，6 只成年小鼠总共分选得到 1.5×10^4 个 Somatostatin 阳性神经元。之前的研究表明，Somatostatin 阳性 DRG 神经元主要参与调控痒觉传递 (Stantcheva 等, 2016)，通过流式分选的方法富集这类神经元对于研究痒觉的分子调控机制具有重要的意义。

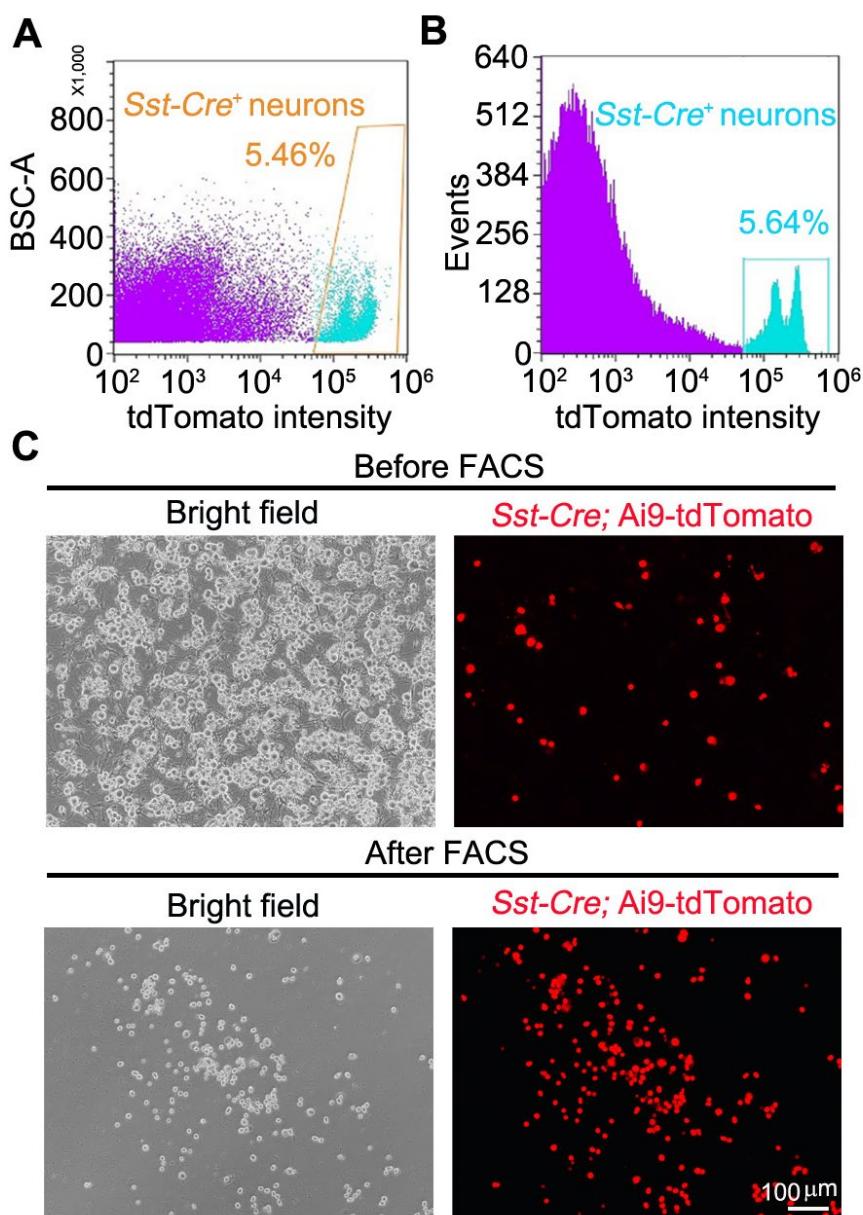


图 2. 小鼠背根神经节 Somatostatin 阳性神经元的分选。A. 流式分选小鼠背根神经节 SomatostatinT 阳性神经元的划分范围。B. 最终分选成功后 Somatostatin 阳性神经元的比例为 5.64%。C. 明场和荧光显微镜观察流式分选后富集的背根神经节 Somatostatin 阳性神经元。比例尺:100 μm。

注意事项

1. 小鼠背根神经节取材时间不能太长 (一般不要超过 1 个小时), 剪碎的组织一定要放于 L15 培养基(保证恒定的 PH 值在 7.4~7.6 之间) 并放于冰上, 取材时间越长 神经细胞状态越差。

2. 要保证消化酶的活性，新配制的消化酶放于-20 °C 中可存放 3 个月。超过 3 个月的消化酶对组织消化不完全而影响神经元活性。
3. 在用滴管吹打细胞的过程中，尽量避免太用力吹打出气泡对细胞产生损伤。用滴管一般吹打 5~10 次，如果吹打超过 10 次后仍然有组织块存在，则放弃吹打，过多的吹打会影响已经打散的细胞活性。
4. 将过滤后的细胞悬液放入 Percoll 分离液中要上下颠倒完全混匀。常用的 Percoll 分离液体积比为 15%，如果需要更纯的神经元，则需要提高 Percoll 的比例，Percoll 的比例越高（可以达到 30%），神经元所占的比例会越高，但损失的细胞数也会更多。
5. 为了保证分选细胞不被污染，分别用 75%乙醇、无菌水和 1× PBS（加入双抗）冲洗流式分选仪 5 分钟。
6. 利用 SONY MA900 流式分选仪分选时可以根据每次分选的不同细胞比例，采取不同的分选程序完成。如果阳性细胞比例较高，可以使用 Purity 这样严格的分选程序保证每个细胞均为阳性细胞而保证纯度。如果阳性细胞比例较低，可以使用 yield 程序在保证较高阳性率的条件下分选得到更多的细胞。

溶液配方

1. 磷酸缓冲液 (1× PBS)
使用去离子水稀释 10× PBS 至 1× PBS
2. 磷酸缓冲液(10× PBS)
KCl 2 g
KH₂PO₄ 2 g
NaCl 80 g
Na₂HPO₄·12H₂O 41.6 g 溶于 1 L 超纯水中
3. DMEM 完全培养基
DMEM 基础培养基 + 10%胎牛血清 + 1%双抗
4. Neurobasal 完全培养基
Neurobasal 基础培养基 + 2% B27
5. 10× 背根神经营养液

8 ml DMEM 基础培养基中加入 80 mg 胶原酶、32 mg 胰蛋白酶和 8 mg DNA 酶 I。

致谢

工作得到了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学研究所以及细胞分析技术平台的大力支持。

参考文献

1. Li, C. L., Li, K. C., Wu, D., Chen, Y., Luo, H., Zhao, J. R., Wang, S. S., Sun, M. M., Lu, Y. J., Zhong, Y. Q., Hu, X. Y., Hou, R., Zhou, B. B., Bao, L., Xiao, H. S. and Zhang, X. (2016). [Somatosensory neuron types identified by high-coverage single-cell RNA-sequencing and functional heterogeneity.](#) *Cell Res* 26(1): 83-102.
2. Stantcheva, K. K., Iovino, L., Dhandapani, R., Martinez, C., Castaldi, L., Nocchi, L., Perlas, E., Portulano, C., Pesaresi, M., Shirlekar, K. S., de Castro Reis, F., Paparountas, T., Bilbao, D. and Heppenstall, P. A. (2016). [A subpopulation of itch-sensing neurons marked by Ret and somatostatin expression.](#) *EMBO Rep* 17(4): 585-600.