小鼠骨髓造血干细胞流式分析

Flow Cytometry Analysis of Mouse Bone Marrow Hematopoietic Stem Cells

谢嘉怡, 王璿, 赵萌*

中山医学院, 中山大学, 广州, 广东

*通讯作者邮箱: zhaom38@mail.sysu.edu.cn

引用格式: 谢嘉怡, 王璿, 赵萌. (2019). 小鼠骨髓造血干细胞流式分析. *Bio-101* e1010339. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010339.

How to cite: Xie, J. Y., Wang, J. and Zhao, M. (2019). Flow Cytometry Analysis of Mouse Bone Marrow Hematopoietic Stem Cells. *Bio-101* e1010339. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010339. (in Chinese)

摘要:造血干细胞 (Hematopoietic Stem Cells, HSCs) 是具有长期自我更新, 以及分化为各类成熟血细胞能力的成体干细胞。本文以小鼠骨髓组织为例, 使用 7 色共 14 种抗体, 标记出在骨髓细胞中的造血干细胞。用此法标记的 HSCs 还可进行细胞周期、凋亡等实验, 并可用于分选实验。

关键词: 小鼠, 造血干细胞, 流式细胞术

材料与试剂

1. 15 ml 离心管
2. 1.5 ml EP 管
3. 70 μ m 滤膜 (Fisherbrand, catalog number: 22363548)
4. 小鼠 (C57BL/6J, 6~8 周龄, 雄雌各半)
5. 胎牛血清 (FBS, Gibco, catalog number: 10100147)
6. 流式抗体, 见表 1

表 1. 流式抗体

抗体	荧光	品牌	货号	克隆号	浓度
CD34	FITC	ebioscience	11-0341-82	RAM34	0.5 mg/ml
CD150	PE	Biolegend	115904	TC15-12F12.2	0.2 mg/ml
Sca-1	PE-Cy7	Biolegend	108114	D7	0.2 mg/ml
c-kit	APC	Biolegend	105812	2B8	0.2 mg/ml
CD48	APC-Cy7	Biolegend	103432	HM48-1	0.2 mg/ml
CD135	BV421	Biolegend	135315	A2F10	0.2 mg/ml
CD11b (Mac-1)	PE/Cy5	Biolegend	101210	M1/70	0.2 mg/ml
CD3e	PE/Cy5	Biolegend	100310	145-2C11	0.2 mg/ml
Ly-6G/Ly-6C (Gr-1)	PE/Cy5	Biolegend	108410	RB6-8C5	0.2 mg/ml
CD45R/B220	PE/Cy5	Biolegend	103210	RA3-6B2	0.2 mg/ml
TER-119	PE/Cy5	Biolegend	116210	Ter-119	0.2 mg/ml
CD4	PE/Cy5	Biolegend	100514	RM4-5	0.2 mg/ml
CD8a	PE/Cy5	Biolegend	100710	53-6.7	0.2 mg/ml
IgM	PE/Cy5	ebioscience	15-5790-82	II/41	0.2 mg/ml

7. 同型对照及单标抗体，见表 2

表 2. 同型及单标抗体

抗体	荧光	同型对照类型	同型对照抗体	单标抗体
CD34	FITC	Rat IgG2a, κ	ebioscience, 11-4321-80	Biolegend, 108405
CD150	PE	Rat IgG2a, λ	Biolegend, 400507	Biolegend, 108407
Sca-1	PE-Cy7	Rat IgG2a, κ	Biolegend, 400521	Biolegend, 108415
c-kit	APC	Rat IgG2b, κ	Biolegend, 400611	Biolegend, 108411
CD48	APC-Cy7	Armenian Hamster IgG	Biolegend, 400927	Biolegend, 108423
CD135	BV421	Rat IgG2a, κ	Biolegend, 400535	Biolegend, 108433
CD11b (Mac-1)	PE/Cy5	Rat IgG2b, κ	Biolegend, 400609	Biolegend, 108409
CD3e	PE/Cy5	Armenian Hamster IgG	Biolegend, 400909	Biolegend, 108409
Ly-6G/Ly-6C (Gr-1)	PE/Cy5	Rat IgG2b, κ	Biolegend, 400609	Biolegend, 108409
CD45R/B220	PE/Cy5	Rat IgG2a, κ	Biolegend, 400509	Biolegend, 108409
TER-119	PE/Cy5	Rat IgG2b, κ	Biolegend, 400609	Biolegend, 108409
CD4	PE/Cy5	Rat IgG2a, κ	Biolegend, 400509	Biolegend, 108409
CD8a	PE/Cy5	Rat IgG2a, κ	Biolegend, 400509	Biolegend, 108409
IgM	PE/Cy5	Rat IgG2a, κ	ebioscience, 15-4321-80	Biolegend, 108409

8. 磷酸缓冲液 (10x PBS, Sangon biotech, catalog number: E607016-0500)
9. 氯化铵 (天津大茂化学, catalog number: 12125-02-9)
10. 碳酸氢钠 (Sigma-Aldrich, catalog number: S5761, 500 G)
11. EDTA 粉末 (鼎国, catalog number: LE568)
12. 磷酸缓冲液 (1x PBS) (见溶液配方)
13. 红细胞裂解液 (500 ml) (见溶液配方)

仪器设备

1. 离心机 (Eppendorf, catalog numbers: 5804R, 5424R)
2. 移液器
3. 水浴锅
4. 摇床
5. 流式细胞仪 (Thermo fisher scientific, Attune NxT)

实验步骤

1. 颈椎脱臼处死小鼠，从下腹部剪开小鼠腿部皮肤，小心剪开髋关节与踝关节，将小鼠腿部完整取出，分离肌肉，取出股骨与胫骨，浸泡在预冷的 PBS + 2% FBS 中，置于冰上。
2. 沿骨髓剪开骨头两端松质骨部分，用 1 ml 注射器吸取预冷的 PBS + 2% FBS，从一端开口将骨髓从另一端开口吹出，并将两端松质骨部分剪开，将所有骨髓组织吹至预冷的 PBS + 2% FBS 中。
3. 将含有骨髓组织的 PBS + 2% FBS 转移至 15 ml 离心管中，并用注射器反复吹吸打散细胞至无明显骨髓组织团块。
4. 4 °C 500 x g 离心 5 min，弃去上清。
5. 按每组股骨和胫骨获取的骨髓细胞加 1 ml 红细胞裂解液，用红细胞裂解液重悬骨髓组织，用移液枪吹打均匀，37 °C 静置 5 min。裂解后加入 10 ml 的预冷的 PBS + 2% FBS 终止裂解，每管细胞准备 1 个新的 50 ml 离心管，将 1 个 70 μm 滤器置于离心管上，将上述终止裂解后的 11 ml 细胞悬液分次倾倒至滤器中，过滤至 50

- ml 离心管中。4 °C 500 x g 离心 5 min，弃去上清。
- 用 1 ml 体积预冷的 PBS + 2% FBS 重悬细胞 (若细胞总数过少，如少于 10^7 个，则降低重悬体积)，用 PBS 稀释 10~100 倍后用细胞计数板或流式细胞仪 (Attune NxT 流式细胞仪中选择 Statistic-Events/ μ l，得到细胞数后乘回稀释倍数即可) 进行细胞计数。
 - 取 7 份 5×10^5 细胞，调整至 50 μ l 体积，分别加入 0.5 μ l 单标抗体，置于摇床、冰上、避光染色 1 h。
 - HSC 染色：取 1×10^6 细胞，用预冷的 PBS + 2% FBS 调整至 100 μ l 体积，加入抗体混合液，各抗体用量见表 3 及表 4。置于摇床、冰上、避光染色 1 h。HSC 抗体混合液为 Lineage 抗体混合液和 CD34, CD150, Sca-1, c-kit, CD48, CD135 抗体按质量比 2:1:1:1:1:1 混合，Lineage 抗体混合液内抗体等质量混合，如表 3 所示，HSC 抗体混合液如表 4 所示。另外取 7 份 1×10^6 细胞，分别用预冷的 PBS + 2% FBS 调整至 100 μ l 体积，分别加入与染色等量的同型抗体混合液，置于摇床、冰上、避光染色 1 h。同型抗体混合液为 HSC 抗体混合液中分别用某一同型抗体替换某一标记的抗体，并按相同比例混合所得。
 - 分别加入 1 ml 预冷的 PBS + 2% FBS 终止染色，4 °C 500 x g 离心 5 min，弃去上清，用 400 μ l 预冷的 PBS + 2%FBS 重悬细胞，在流式细胞仪中使用单标抗体管调节补偿，然后进行数据收集。

表 3. Lineage 抗体混合液组成

抗体	克隆号	荧光标记
CD11b (Mac-1)	M1/70	PE/Cy5
CD3e	145-2C11	PE/Cy5
Ly-6G/Ly-6C (Gr-1)	RB6-8C5	PE/Cy5
CD45R/B220	RA3-6B2	PE/Cy5
TER-119	Ter-119	PE/Cy5
CD4	RM4-5	PE/Cy5
CD8a	53-6.7	PE/Cy5
IgM	II/41	PE/Cy5

表 4. HSC 抗体混合液组成

抗体	克隆号	荧光标记	抗体用量 (ng/1 × 10 ⁶ cells)
Lineage mix	—	PE/Cy5	100
CD34	RAM34	FITC	50
CD150	TC15-12F12.2	PE	50
Sca-1	D7	PE-Cy7	50
c-kit	2B8	APC	50
CD48	HM48-1	APC-Cy7	50
CD135	A2F10	BV421	50

结果与分析

造血干细胞是具有长期自我更新，以及分化为各类成熟血细胞能力的成体干细胞。目前较常用的小鼠造血干细胞标志为 Lin⁻Sca1⁺cKit⁺CD150⁺CD48⁻ (CD150HSC) 和 Lin⁻Sca1⁺cKit⁺CD34⁻CD135⁻ (Longterm HSC, LT-HSC) (Kiel 等, 2005; Yang 等, 2005)。

Lineage 系列抗原 (Lin) 主要表达在骨髓成熟细胞上，通过 Lin 阴性标记可以去除大部分成熟细胞。Sca-1 表达于小鼠骨髓 HSC 和髓系细胞，c-kit 主要表达在造血干祖细胞上，所以 HSC 存在于 Lin⁻Sca1⁺cKit⁺细胞群中。此外，淋巴细胞活化信号分子 (signaling lymphocyte activation molecule, SLAM) 家族受体是常用的 HSC 标记，其中 CD150 特异表达于拥有长期造血重建能力的 HSC 中 (LongTerm-HSC, LT-HSC)，CD48 阳性的细胞无长期造血能力，所以使用 Lin⁻Sca1⁺cKit⁺CD150⁺CD48⁻即可特异标记出 CD150HSC (Kiel 等, 2005)。另外，CD34 不表达或弱表达于小鼠 HSC 中，CD135 主要表达于拥有短期造血重建能力的 ShortTerm HSC (ST-HSC) 中，故使用 Lin⁻Sca1⁺cKit⁺CD34⁻CD135⁻ (LongTerm HSC) 可用于标记小鼠骨髓中的 LT-HSC (Osawa 等, 1996; Christensen 和 Weissman, 2001; Yang 等, 2005)。

图 1 为小鼠骨髓造血干细胞各抗体及其同型抗体画门流式示意图。图 2 为小鼠造血干细胞分析流式图示例。首先以 FSC-A 和 SSC-A 为轴，画出主要细胞群，然后以 FSC-A 和 FSC-H 去除粘连细胞，画出单个细胞群，再画出 Lin⁻细胞群，一般占单个细胞群的 10%，然后画出 Sca1⁺cKit⁺细胞群 (LSK, Lin⁻Sca1⁺cKit⁺)，接下来可根据实验需要划出 CD150⁺CD48⁻ (CD150HSC) 或 CD34⁻CD135⁻ (LT-HSC)、CD34⁺CD135⁻ (ST-HSC) 和 CD34⁺CD135⁺ (Multipotent Progenitor, MPP)。

图1. 小鼠骨髓造血干细胞各抗体及其同型抗体划门流式示意图

图 2. 小鼠造血干细胞分析流式图

失败经验

细胞分群不明显:

1. 未调补偿或补偿不适合。
*用小鼠骨髓细胞调补偿。
2. 抗体浓度过低。
*适度提高抗体浓度。
3. 抗体失效。
*抗体需避光保存于 2~8 °C，避免冷冻。
*抗体 mix 配好后需注意避光保存，并尽快使用。
4. 抗体孵育时间过短。
*适度延长抗体孵育时间。
5. 染色没有注意避光进行。
*染色时注意避光。
6. 染色时没有在摇床上进行。
*染色时应在摇床上进行，避免细胞成团聚集而染色不充分。

溶液配方

1. 磷酸缓冲液 (1x PBS)

使用去离子水稀释 PBS (10x) (去除钙、镁离子) 至 1x

2. 红细胞裂解液 (500 ml)

氯化铵 4.15 g

碳酸氢钠 500 mg

EDTA (粉末) 18.5 mg

使用去离子水定容至 500 ml, 4 °C 保存

参考文献

1. Christensen, J. L. and Weissman, I. L. (2001). [Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells.](#) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(25): 14541-14546.
2. Kiel, M. J., Yilmaz, O. H., Iwashita, T., Yilmaz, O. H., Terhorst, C. and Morrison, S. J. (2005). [SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells.](#) *Cell* 121(7): 1109-1121.
3. Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H. and Nakauchi, H. (1996). [Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell.](#) *Science* 273(5272): 242-245.
4. Yang, L., Bryder, D., Adolfsson, J., Nygren, J., Mansson, R., Sigvardsson, M. and Jacobsen, S. E. (2005). [Identification of Lin\(-\)Sca1\(+\)kit\(+\)CD34\(+\)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients.](#) *Blood* 105(7): 2717-2723.