小鼠造血祖细胞流式分析

Flow Cytometry Analysis of Mouse Bone Marrow Hematopoietic Progenitor Cells

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). 小鼠造血祖细胞流式分析. *Bio-101* e1010340. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010340.

How to cite: Xie, J. Y., Wang, J. and Zhao, M. (2019). Flow Cytometry Analysis of Mouse Bone Marrow Hematopoietic Progenitor Cells. *Bio-101* e1010340. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010340. (in Chinese)

摘要: 造血祖细胞 (Hematopoietic Progenitor Cells, HPCs)是由造血干细胞分化来的, 具有定向分化潜能的造血前体细胞。造血祖细胞主要分为 4 类: common myeloid progenitors (CMPs), common lymphoid progenitors (CLPs), granulocyte-macrophage progenitors (GMPs) 和 megakaryocyte-erythrocyte progenitors (MEPs)。分析造血祖细胞可研究造血干细胞向各系分化的能力。本文以小鼠骨髓组织为例, 使用 7 色共 14 种抗体, 对 4 类主要的造血祖细胞 (CMPs、CLPs、GMPs 和 MEPs) 进行标记。

关键词: 小鼠, 造血祖细胞, 流式细胞术

材料与试剂

1. 6 孔板
2. 15 ml 离心管
3. 1.5 ml EP 管
4. 70 μ m 滤膜 (Fisherbrand, catalog number: 22363548)
5. 小鼠 (C57BL/6J, 6~8 周龄, 雄雌各半)
6. 胎牛血清 (FBS, Gibco, catalog number: 10100147)
7. 流式抗体 (见表 1)
8. 同型对照及单标抗体 (见表 2)
9. 磷酸缓冲液 (10x PBS, Sangon biotech, catalog number: E607016-0500)
10. 氯化铵 (天津大茂化学, catalog number: 12125-02-9)
11. 碳酸氢钠 (Sigma-Aldrich, catalog number: S5761, 500 G)

12. EDTA 粉末 (鼎国, catalog number: LE568)

13. 磷酸缓冲液 (1x PBS) (见溶液配方)

14. 红细胞裂解液 (500 ml) (见溶液配方)

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
Sca-1	PE-Cy7	Biolegend	108114	D7	0.2 mg/ml
c-kit	APC	Biolegend	105812	2B8	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
FgRII	PE	Biolegend	101308	93	0.2 mg/ml
IL-7R	APC/Cy7	Biolegend	135039	A7R34	0.2 mg/ml

表 2. 同型对照及单标抗体

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
Sca-1	PE-Cy7	Rat IgG2a, κ	Biolegend, 400521	Biolegend, 108415
c-kit	APC	Rat IgG2b, κ	Biolegend, 400611	Biolegend, 108411
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
FgRII	PE	Rat IgG2a, λ	Biolegend, 400507	Biolegend, 108407
IL-7R	APC/Cy7	Rat IgG2a, κ	Biolegend, 400523	Biolegend, 108423

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，置于 6 孔板中，加入 5 ml 预冷的 PBS + 2% FBS 中。
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 °C 500 x g 离心 5 min，弃去上清。
 4. 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。
 5. 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 10⁷ 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/μl，得到细胞数后乘回稀释倍数即可) 进行细胞计数。
 6. 取 7 份 5 × 10⁵ 细胞，调整至 50 μl 体积，分别加入 0.5 μl 单标抗体，置于摇床、冰上、避光染色 1 h。
 7. 取 1 × 10⁶ 细胞，调整至 100 μl 体积，加入抗体 mix，具体抗体及用量见表 3 及表 4，置于摇床、冰上、避光染色 1 h。Progenitor 抗体混合液为 Lineage 抗体混合液和 CD34, Sca-1, c-kit, CD135, IL-7R, FgRII 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，progenitor 抗体混合液如表 4 所示。另外取 7 份 1 × 10⁶ 细胞，分别用预冷的 PBS + 2% FBS 调整至 100 μl 体积，分别加入与染色抗体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 progenitor 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。
 8. 分别加入 1 ml 预冷的 PBS + 2% FBS 终止染色，500 x g 离心 5 min，弃去上清，用 400 μl 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，并进行数据收集。

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. Progenitor 抗体混合液组成

抗体	克隆号	荧光标记	抗体用量 (ng/1x10 ⁶ cells)
Lineage mix	—	PE/Cy5	100
CD34	RAM34	FITC	50
CD16/32	93	PE	50
Sca-1	D7	PE-Cy7	50
c-kit	2B8	APC	50
IL-7R	A7R34	APC-Cy7	50
CD135	A2F10	BV421	50

结果与分析

研究表明造血发育谱系为，长期造血干细胞 (Long-term HSCs, LT-HSCs) 分化为短期造血干细胞 (short-term HSCs, ST-HSCs)，ST-HSCs 分化为多能祖细胞 (Multipotent progenitor, MPP)，MPP 分化为具有定向分化能力的前体细胞如：CLPs 和 CMPs 等。CLPs 继续分化为多种种类的淋巴细胞，CMPs 分化为粒系/巨噬细胞前体细胞 GMPs 和红系/巨核系前体细胞 MEP。IL-7R 标记 CLPs 和其他下游淋巴系祖细胞，CD135 主要

表达在较早期祖细胞和 ST-HSC 上，故 IL-7R 和 CD135 联用可标记 CLPs。通过集落形成能力及移植实验发现，分选的各种造血祖细胞具有体内、外定向分化潜能，如：CD16/32^{lo}CD34⁺标记的 CMPs 可分化为 CFU-megakaryocyte (CFU-Meg)，CFU-megakaryocyte/erythroid (CFU-MegE)，CFU-granulocyte/macrophage (CFU-GM)，CFU-granulocyte (CFU-G)和 CFU-macrophage (CFU-M) 等多种髓系集落；CD16/32^{hi}CD34⁺标记的 GMPs 只可分化为 CFU-M, CFU-G 和 CFU-GM 巨噬细胞或粒系细胞集落，CD16/32^{lo}CD34⁺标记的 MEPs 只能分化为 CFU-Meg, BFU-E 和 CFU-MegE 巨核细胞和红系细胞的集落。而移植 CD16/32^{lo}CD34⁺标记的 CMPs 可诱导受体小鼠骨髓和脾脏出现供体来源的 Gr-1⁺/Mac-1⁺ 的粒单核细胞和 TER119⁺的红系细胞；移植 CD16/32^{hi}CD34⁺标记的 GMPs 只可诱导骨髓和脾脏出现供体来源的 Gr-1⁺/Mac-1⁺ 的粒单核细胞；移植 CD16/32^{lo}CD34⁺标记的 MEPs 只可诱导骨髓和脾脏出现供体来源的 TER119⁺的红系细胞。但移植 4 周后以上供体来源的细胞就会消失，提示以上造血祖细胞只有有限的自我更新能力 (Kondo 等, 1997; Akashi 等, 2000)。

图 1 为小鼠骨髓造血祖细胞抗体及其同型抗体画门示意图。图 2 为小鼠造血祖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，再划出 Lineage⁻细胞群，一般占单个细胞群的 10%，然后画出 Sca-1-c-kit⁺细胞群 (LK, lineage-Sca-1-c-kit⁺)，在 LK 中以 CD34 和 CD16/32 为轴，根据两者的表达情况划分为 GMPs、CMPs 和 MEPs。另外，从 Lineage⁻细胞群出发，以 IL-7R 和 CD135 为轴，可画出 IL-7R⁺CD135⁺的 CLPs。

图 1. 小鼠造血祖细胞抗体及其同型抗体画门示意图

图 2. 小鼠造血祖细胞分析流式图

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. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. and Weissman, I. L. (2000). [A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages.](#) *Nature* 404(6774): 193-197.

2. Kondo, M., Weissman, I. L. and Akashi, K. (1997). [Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow](#). *Cell* 91(5): 661-672.