骨骼肌肌肉干细胞流式分选

Isolation of Skeletal Muscle Stem Cells by FACS

韩莉莉，胡苹*

生物化学与细胞生物学，中国科学院生物化学与细胞生物学研究所，上海

*通讯作者邮箱:hup@sibcb.ac.cn

引用格式：韩莉莉，胡苹. (2019). 骨骼肌肌肉干细胞流式分选. *Bio-101* e1010352. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010352.

How to cite: Han, L. L. and Hu, P. (2019). Isolation of Skeletal Muscle Stem Cells by FACS. *Bio-101* e1010352. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010352. (in Chinese)

摘要：为了提高分离效率，采用两步法进行肌肉干细胞的分离和分选。首先分离小鼠骨骼肌，并将肌肉组织消化为单细胞悬液。然后利用流式分选的方法，使用杂细胞标签 CD45、CD31 和 Sca1 进行负筛后，再使用 VCAM1 进行阳性筛选，从而获得高纯度肌肉干细胞。采用此方法获得的肌肉干细胞可直接用于各种测序或进行细胞培养。

关键词：骨骼肌，肌肉干细胞，VCAM1

材料与试剂

1. 10 cm dish
2. 培养皿
3. 离心管
4. 封口膜
5. 移液管
6. 10 ml 注射器
7. 20 G 针头
8. 40 μ m 滤膜
9. FACS 管
10. 小鼠
11. 马血清 (Hyclone, catalog number: SH30074.03)

12. Collagenase II (Worthington, catalog number: LS004177)
13. Dispase (Life Technologies, catalog number: 17105-041)
14. CD31-APC (Clone MEC13.3, BioLegend, catalog number: 102510, 4 °C)
15. CD45-APC (Clone 30-F11, BioLegend, catalog number: 103112, 4 °C)
16. Pacific Blue anti-mouse Ly-6A/E (Anti-Sca1 , clone D7, BioLegend, catalog number: 108120, 4 °C)
17. Biotin anti-mouse CD106 (Anti-vascular cell adhesion molecule 1 (anti-VCAM 1), clone 429, BioLegend, catalog number: 105704, 4 °C)
18. F-10 (Gibco, catalog number: 11550-043)
19. Penicillin-streptomycin mixture (Hyclone, catalog number: SV10030)
20. PE/Cy7 streptavidin (BioLegend, catalog number: 405206, 4 °C)
21. 乙醇
22. PI
23. Wash medium (WM) (见溶液配方)
24. Muscle dissociation buffer (MDB) (见溶液配方)
25. Stock collagenase II solution (见溶液配方)
26. Stock dispase solution (见溶液配方)

仪器设备

1. 移液枪
2. 眼科剪
3. 尖头镊子
4. 手术刀
5. ZWY 恒温水浴培养振荡器 (上海智城分析仪器制造有限公司, model: ZWF-110X 30)
6. 水平离心机 (Thermo Scientific, model: labofuge 400 R)
7. 高速流式细胞分选仪-Aria Sorp (BD, FACS Aria SORP)

实验步骤

- 一、肌肉解剖 (15~20 min/只小鼠, 6 周龄~28 月龄均可)

1. 一只小鼠准备一个 10 cm dish，在每个 10 cm dish 中加入 10 ml WM。
2. 将小鼠安乐死。
3. 将小鼠尸体用 70%乙醇喷湿，腹部朝上放在解剖台上。
4. 用镊子夹起脚踝周围的皮肤，剪一个小切口。
5. 剥开腿部皮肤，使后腿肌肉全部暴露出来，如图 1 所示。

图 1. 小鼠后肢骨骼肌

6. 取下所有后腿肌肉，放入准备好的 10 cm dish 中，并剔除肌间脂肪。
7. 如果实验需要也可将前肢的三头肌解剖下来。
8. 将肌肉转移至一个新的培养皿中，用镊子固定肌肉的一端，然后用手术刀将肌肉切成薄片。这一步骤应在 10 min 内完成。

注：此步骤目的在于尽可能增加肌肉组织与消化液的接触面积，提高消化效率。

二、分离单核细胞

1. 将切好的薄片状肌肉组织转移至 50 ml 离心管中，加入 10 ml MDB。
注：一个离心管内最多放置两只小鼠的肌肉量，即 20 ml MDB。
2. 用封口膜将离心管封好，水平固定在 37 °C 恒温水浴摇床上 (平行于摇床运动方向，并完全浸没于水中)，60~70 rpm，1 h。
3. 在每个离心管中加入预冷的 WM 至 50 ml，轻柔地上下颠倒混匀。
4. 用水平离心机 4 °C 500 × g 离心 5 min。弃上清，在管底留 8 ml。
5. 加入 1 ml stock collagenase II solution 和 1 ml stock dispase solution。
6. 用 5 ml 移液管将沉淀重悬，吹吸 10~15 次或吹吸至没有阻力即可。

7. 用封口膜将离心管封好,水平固定在 37 °C 恒温水浴摇床上 (平行于摇床运动方向,并完全浸没于水中), 60~70 rpm, 30 min。
8. 用 10 ml 注射器和 20 G 的针头吹吸十次。
注: 将液体吹到管壁上, 避免气泡。
9. 在每个离心管中加入预冷的 WM 至 50 ml, 轻柔地上下颠倒混匀。
10. 用水平离心机 4 °C 500 × g 离心 5 min。弃上清, 在管底留 10 ml。
11. 取一个干净的 50 ml 离心管, 准备好 40 μm 滤膜。
12. 用 10 ml 的移液管把沉淀重悬, 自然过滤。
13. 在沉淀管里加 10 ml WM, 清洗离心管后过滤。
14. 另取 10 ml WM 冲洗滤膜。用 200 μl 的移液枪将滤膜底部残留的液体转移到离心管里。
15. 在每个离心管中加入预冷的 WM 至 50 ml, 轻柔地上下颠倒混匀。
16. 用水平离心机 4 °C 500 × g 离心 5 min。立刻彻底吸干上清。
注: 不要吸到沉淀。
17. 用 600 μl WM 重悬细胞沉淀, 计数。约 8~12 × 10⁶ 个细胞/只小鼠。

三. 染色

1. 在 5 ml 的 FACS 管中加入 190 μl WM, 取 10 μl 细胞悬液放入其中, 作为未染样品。
2. 取 3 个 1.5 ml 离心管, 做好标记, 每管中加入 190 μl WM 和 10 μl 细胞悬液。按照表 1 进行染色 (作为单染样品):

表 1. 单染样品染色

Antibdy	1	2	3
CD31-APC			
CD45-APC	+		
Sca1-Pacific Blue		+	
VCAM1-biotin			+

3. 将剩余所有细胞悬液转移至一个 1.5 ml 离心管中 (即实验组), 加入抗体 VCAM1、

CD31、CD45、Sca1，各 5 μ l/只小鼠。

4. 将所有的样品固定在 rocker 上，最低转速，4 $^{\circ}$ C，40 min。
5. 每管加 WM 至 1.5 ml，轻柔地上下颠倒数次混匀。用固定角转子 4 $^{\circ}$ C 250 $\times$ g 离心 5 min。
6. 彻底弃上清，单染组用 200 μ l WM 重悬细胞沉淀，实验组用 500 μ l WM 重悬。
7. 在 VCAM1 单染组细胞中加入 0.5 μ l PE/Cy7。
8. 在实验组细胞中加入 5 μ l PE/Cy7 和 1 μ l PI (PI 终浓度为 0.3 μ g/ml)。将所有的样品固定在 rocker 上，最低转速，4 $^{\circ}$ C，20 min。
9. 将除 VCAM1 单染管外的其他单染管置于冰上避光备用。
10. 在染了 PE/Cy7 的每个离心管中加入 WM 至 1.5 ml，轻柔地上下颠倒数次混匀。用固定角转子 4 $^{\circ}$ C 250 $\times$ g 离心 5 min。
11. 彻底弃上清，VCAM1 单染组用 200 μ l WM 重悬细胞沉淀，并 40 μ m 过滤后转移至 5 ml 的 FACS 管中。
12. 实验组用 500 μ l WM 重悬，并 40 μ m 过滤后转移至 5 ml 的 FACS 管中。
13. 另取 500 μ l WM 冲洗实验组的 1.5 ml 离心管，将洗涤液同样 40 μ m 过滤后转移至 5 ml 的 FACS 管中，注意将滤膜上的残液吸净。然后再取 1 ml WM 加入 FACS 管中，轻柔混匀。

四. 分选

1. 选用 70 μ m 喷嘴。
2. 调电压。
3. 上单染组样品，调补偿，确保阳性群清晰。
4. 用 15 ml 的离心管装 5 ml WM 收集 CD31⁻CD45⁻Sca1⁻VCAM⁺的细胞群，如图 2 所示。

图 2. CD31⁻CD45⁻Sca1⁻VCAM⁺的细胞群分选. A. P5 为 CD31⁻CD45⁻Sca1⁻的细胞群. B. P6 为 CD31⁻CD45⁻Sca1⁻VCAM⁺的细胞群. C. CD31⁻CD45⁻Sca1⁻VCAM⁺的细胞群在单核细胞混合悬液中占比 4.0%。

注意事项

1. 从小鼠安乐死到肌肉切成薄片放入 MDB 中，全程最好保证 15 min 内完成。
2. 肌肉组织要保证切成均匀的薄片，否则消化不彻底会造成肌肉干细胞损失。
3. 消化过程中注意观察，待消化至无片状组织后，及时终止消化，否则会导致肌肉干细胞死亡。

溶液配方

1. Wash medium (WM)
F-10 + 10%HS (horse serum, 马血清)
1× PS (青霉素-链霉素双抗), 冰上备用
2. Muscle dissociation buffer (MDB)
700~800 U/ml collagenase II 溶液 (溶剂为 WM) 10 ml/只小鼠
现用现配, 冰上备用
3. Stock collagenase II solution
将 collagenase II 粉末溶于 1× PBS 至终浓度 1,000 U/ml
0.22 μm 过滤, 分装成 1 ml/tube, -20 °C 保存

4. Stock dispase solution

将 dispase 粉末溶于 1× PBS 至终浓度 11 U/ml

0.22 μm 过滤，分装成 1 ml/tube，-20 °C 保存，三个月内用完

致谢

感谢香港科技大学 Tom H Cheung 博士共同讨论肌肉干细胞分选方法。感谢中国科学院生物化学与细胞生物研究所细胞平台的边玮、王雪冬、丁宇波、俞珺璟老师在分选仪器使用中的帮助。感谢中国科学院器官重建与制造战略性先导科技专项 (XDA16021400)，科技部重点研发计划 (2017YFA002700)，自然科学基金委员会 (91649104，31671536)，NN-CAS Foundation，上海市科委 (Y753S11802，18ZR1446300) 的资助。