通过高内涵成像分析系统对小鼠早期胚胎中蛋白质的 定位及定量分析

The Locating and Quantitative Analysis of Proteins in Mouse Oocytes and Early Embryos via High Content Imaging Analysis System

谈家骏*, 李颖峰

生物物理研究所, 中国科学院, 北京

*通讯作者邮箱: tanjiajun16@mails.ucas.ac.cn

引用格式: 谈家骏, 李颖峰. (2021). 通过高内涵成像分析系统对小鼠早期胚胎中蛋白质的定位及定量分析. // 高内涵成像及分析实验手册. **Bio-101 e1010837. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010837.**

How to cite: Tan, J. J. and Li, Y. F. (2021). The Locating and Quantitative Analysis of Proteins in Mouse Oocytes and Early Embryos via High Content Imaging Analysis System. // High-Content Imaging and Analysis Protocol eBook. **Bio-101 e1010837. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010837. (in Chinese)**

摘要: 早期胚胎发育是一个重要早期生命活动过程。在这一过程中发生了雌雄配子融合, 合子基因组激活等重要事件。许多蛋白的表达、定位的变化对于早期胚胎发育的正常进行至关重要。同时对于这一时期特定蛋白的表达及定位的研究也帮助人们更好地理解这一过程的调控机制。受限于这一时期生物材料的有限性和可操作性, 常规的基于 Confocal 的蛋白质水平及定位研究耗时耗力, 可统计的样本数较少, 统计分析繁琐且重复性差。本方法通过高内涵成像系统的 PreciScan 模式, 可一次性收集上百乃至更多的早期胚胎样品的三维成像数据, 并进行批量计算分析, 方便快捷地获取具有统计学意义的成像数据, 助力早期胚胎中的蛋白质功能研究。

关键词: 三维成像计算, 蛋白质定位, 蛋白质定量, 早期胚胎

试剂与材料

1. Glycine (Sigma, catalog number: G8898)
2. 口吸管 (Sigma, catalog number: A5177)
3. 3.5 cm Petri Dishes (Corning, catalog number: 351008)

4. 96 Well Round (U) Bottom Plate, TC Surface (Thermo Scientific, catalog number: 163320)
5. CellCarrier-96 Ultra Microplates (PerkinElmer, catalog number: 6055302)
6. 2-6 月龄雄鼠
7. 6~8 周龄雌鼠
8. MEM Alpha (Gibco, catalog number: 32571-036)
9. Sodium Pyruvate (100 mM) (Gibco, catalog number: 11360-070)
10. EDTA (Amresco, catalog number: 0322)
11. BSA (Lablead, catalog number: 0332)
12. NaCl (Sigma, catalog number: S5886)
13. KCl (Sigma, catalog number: P5405)
14. Na_2HPO_4 (Sigma, catalog number: S5136)
15. KH_2PO_4 (Sigma, catalog number: P5655)
16. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, catalog number: M1880)
17. Na lactate 60% syrup (ml/liter) (Sigma, catalog number: L1375)
18. NaHCO_3 (Sigma, catalog number: S5761)
19. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, catalog number: C7902)
20. Penicillin-Streptomycin Solution 100x (BBI, catalog number: H225FA0001)
21. 非必需氨基酸, NEAA 100× (Gibco, catalog number: 11140050)
22. 必需氨基酸, EAA 50× (Gibco, catalog number: 11130051)
23. Mineral Oil (Sigma, catalog number: M8410)
24. Poly (vinyl alcohol), PVP (Sigma, catalog number: P8136)
25. DAPI (Beyotime, catalog number: C1002)
26. Anti-Dnmt1 Rabbit polyclonal antibody (以 mDnmt1 (700-1076aa) 肽段为抗原制备)
27. Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG (H + L) (Beyotime, catalog number: A0423)
28. Modified MEM (MMEM) (见溶液配方)
29. KSOM (见溶液配方)
30. KSOM-AA (见溶液配方)
31. 4%多聚甲醛固定液 (见溶液配方)
32. 10× DPBS (见溶液配方)

仪器设备

1. 二氧化碳细胞培养箱
2. 体式显微镜 (Olympus, model: SZ61)
3. 高内涵成像分析筛选系统 (PerkinElmer, model: Opera Phenix)

实验步骤

一、通过体外受精收集不同时期小鼠早期胚胎

1. 准备培养基。

准备四个 3.5 cm Petri Dish, 分别为: Sperm Dish: 1 ml MMEM 培养; Oocyte Dish: 500 μ l MMEM 培养基; Fertilization Dish: 250 μ l MMEM; Wash Dish: 4 个 30-50 μ l KSOM-AA 培养基液滴; Culture Dish: 4 个 KSOM-AA 培养基 30-50 μ l 液滴。所有的培养基需要矿物油液封, 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中平衡至少 6 小时。

2. 精子准备

2.1 准备一只有过繁育经验的 2-6 月龄的雄鼠, 在雌鼠注射完 hCG 后 12-13 小时牺牲。

2.2 立即分离附睾和输精管, 置于平衡好的 Sperm Dish 中, 使用 1 ml 注射器针头穿刺附睾, 释放精子。

2.3 精子获能。将 Sperm Dish 放入 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中 1 小时。

注: 获能后的精子浓度以 1×10^6 - 2.5×10^6 /ml 为宜。

3. 卵细胞准备

3.1 取 6~8 周龄的雌鼠注射 PMSG, 48 小时后注射 hCG, 13 小时后牺牲雌鼠, 迅速分离输卵管后置于平衡好的 Oocyte Dish 中。

3.2 使用 1 ml 注射器针头剥离输卵管中包含 MII 卵细胞的积云细胞团, 转移至 Fertilization Dish。

4. 体外受精。加入 10-20 μ l 获能后的精子至 Fertilization Dish, 培养 4-6 小时。

注: 需根据实际情况调整精子量, 过少会导致受精效率低, 过多会出现多精入卵现象。

5. 持续培养。将受精后的卵细胞/受精卵移至 Wash Dish 的液滴中，去除游离的精子 and 细胞碎片，然后转移至 Culture Dish 持续培养。
6. 收集不同发育阶段的早期胚胎，用含有 3% PVP 的 DPBS 洗 2 次后，准备染色。
从体外受精 (步骤 1.4) 开始计算发育时间，受精卵：8-12 小时；2 细胞：19-36 小时；4 细胞：42-44 小时；8 细胞：56-58 小时；16 细胞：64-66 小时；囊胚：74 小时后。

二、免疫荧光染色

使用口吸管将收集到的胚胎移入 96 孔 U 底板中进行染色，所有更换试剂的步骤均为使用口吸管将胚胎从前一步的试剂中移出后放入新试剂。

1. 加入 100 μ l 4% PFA 在室温固定 15 min。
2. 加入 100 μ l 包含 0.1 M Glycine 的 DPBS 洗三次。
3. 加入包含 0.5% Triton X-100 和 1% BSA 的 DPBS 在室温通透 15 min。
注：由于染色过程中，早期胚胎为游离状态，不同溶液密度变化使其四散漂浮，容易遗漏样品，因此建议此后所有溶液通过包含 1% BSA 维持密度一致性。
4. 加入 100 μ l 包含 0.1% Triton X-100 和 1% BSA 的 DPBS 封闭液，室温封闭 1 小时或 4 °C 过夜。
5. 将 Rabbit anti-DNMT1 抗体按 1: 500 稀释于封闭液，按每孔 50 μ l 加入，室温孵育 2 小时或 4 °C 过夜。
6. 加入 100 μ l 封闭液洗三次。
7. 将 Donkey anti-Mouse 488 抗体用封闭液按 1: 1000 稀释，按每孔 50 μ l 加入，室温孵育 2 小时或 4 °C 过夜。
8. 加入 100 μ l 封闭液洗三次。
9. 按照 1: 1000 稀释 1 mg/ml DAPI 50 μ l 染色 15 min。
10. 将胚胎移入 100 μ l 包含 10%甘油的 DPBS 的 96 PerlinElmer CellCarrier 板中，加入适量矿物油液封。样品可于 4 °C 保存数月。

三、高内涵成像

1. 启动仪器，打开 Harmony 软件，将 96 孔板用擦镜纸擦拭板底后，放入高内涵仪器中等待成像。
2. 根据所用 96 孔板型号选择“Plate Type”，使用 5x 物镜。
3. 设置拍摄参数（图 1）。根据需要在“Channel Selection”设置不同荧光通道（图 1A，绿色：Alexa 488, Ex488/Em500-550；蓝色：DAPI, Ex405/Em435-480）。在“Layout Selection”中选择视野数（Number of Fields），勾选“Use in Test”后，点击上方“Test”进行预拍摄（图 1B）。根据荧光强度调整合适曝光时间和激发光强度后保存文件为“embryo 5x”。

注：可通过“Channel Sequence”选择不同荧光通道拍摄顺序，避免可能的串色。

注：由于早期胚胎细胞较大（超过 70 μm ），可直接使用默认高度参数进行拍摄。

4. 编写目标搜索程序，程序编写及说明见表 1，保存为“Find”。
5. 添加 Find 文件至“embryo 5x”的 Online Jobs，保存文件。
6. 以步骤 3 预拍摄结果设置为孔背景，转换 63x 水镜，选取合适视野，根据荧光强度调整曝光时间，激发光强度，设置堆叠层数和距离进行实验预拍摄。参数调整完毕后保存文件为“embryo 63x”。

注：设置孔背景方式为进入导航栏 (Navigation) Images 界面，在 Well 模块单击鼠标右键选择“Background for Well”。

7. 使用 PreciScan 模式成像，依次加载文件“embryo 5x”和“embryo 63x”后运行。
注：正式拍摄前建议取出 96 孔板，擦拭步骤 6 使用水镜后的液体残余，避免对后续拍摄对焦产生影响。
8. 使用 Harmony 软件进行分析计算，计算流程及说明见表 2 及图 2。
9. 结果导出。依次选择 Setting→Data Management→Export Data，按照需求选择合适的格式导出分析数据。

A

Experiment:

Plate Type:

Autofocus:

Objective:

Opt. Mode:

Binning:

Live Preview: ☐

Max Duration: < 1min

Temperature:

CO2:

Channel Selection

Alexa 488

Time: ms

Power: %

Height: μ m

Excitation: nm

Emission: nm

HOECHST 33342

Time: ms

Power: %

Height: μ m

Excitation: nm

Emission: nm

B

Experiment:

Plate Type:

Autofocus:

Objective:

Opt. Mode:

Binning:

Live Preview: ☐

Max Duration: < 1min

Temperature:

CO2:

Channel Selection

2 Channel(s)

Layout Selection

Plate

Number of Wells:

Well

Number of Fields:

Overlap: %

Use in Test: ☒

Stack

First Plane at: μ m

Number of Planes:

Distance: μ m

Last Plane at: μ m

Overall Height: μ m

Use in Test: ☐

图 1. 拍摄参数设置

表 1：目标搜索程序设置

步骤	说明
Input Image 导入图像	Stack Processing 选择 Individual Planes。
Find Image Region 定位细胞	由于早期胚胎细胞较大，软件内置的 Find Cells 和 Find Nuclei 程序不适用，故需使用 Find Image Region 程序定位对象。 Channel 选取 Alexa 488；Method 选择 Common Threshold，根据信号强度调整合适的 Threshold 参数。
Determine Well Layout 定义对象	Method XY 选取 Multiple Objects，Rescan Magnification 选取 63x。根据需要设置 Object Margin (10~20 μm)和 Field Overlap 比例。
Define Results	点击此步骤后保存，否则程序可能无法正确运行。运行结果见图 2。

图 2. 通过目标搜索程序搜索拍摄对象

表 2：成像结果计算设置

步骤	说明
1. Image Input 导入图像	Stack Processing 选择 3D Analysis，全选 Stack 图层。在 Control 面板中 Representation 模式可选择“XYZ”或“3D”。在图像上单击鼠标右键可直接保存图像或视频，结果如图 3 及附件视频。
2. Find Image Region 定位细胞	Channel 选择 Alexa 488；Method 选择 Local Threshold，根据信号强度设置合适的 Threshold 参数，勾选 Closing, Filling 和 Close Regions at Image Border 选项。 命名 Output Population 为 Embryo；命名 Output Region 为 Embryonic Region。
3. Find Image Region (2) 定位细胞核	Channel 选择 DAPI；ROI 选择 Embryo，其余同上。 命名 Output Population 为 Nuclei；命名 Output Region 为 Nuclear Region。
(Option1) Select Region (可选 1)收缩细胞核区域	由于细胞核边缘的不平整，边缘区域细胞核的定位有时难以与细胞质区分，可能会影响后续对核内信号强度的分析。可通过适当收缩细胞核边界改善。 Population 选择 Nuclei；Region 选择 Nuclear Region；Method 选择 Resize Region，输入合适的 Outer Border 值，通常为 1~2 μm 。
4. Select Region 定义细胞质	Population 选择 Embryo；Region 选择 Embryonic Region；Method 选择 Restrict by Mask。Method-Population 选择 Nuclei；Method-Mask Region 选择 Nuclear Region；勾选 Use Inverted Mask。 Output Region 命名为 Cytoplasmic Region。 可根据需要添加“可选 1”步骤
5. Calculate Intensity Properties 计算全细胞中蛋白信号强度	Channel 选择 Alexa 488；Population 选择 Embryo；Region 选择 Embryonic Region。 <i>注：Method 下拉菜单中可根据需要选择不同输出结果，如平均值 (Mean)，总和 (Sum) 等。</i>
6. Calculate Intensity Properties 计算细胞质中蛋白信号强度	Channel 选择 Alexa 488；Population 选择 Embryo；Region 选择 Cytoplasmic Region。

7. Calculate Intensity Properties 计算细胞核中蛋白信号强度	Channel 选择 Alexa 488; Population 选择 Embryo; Region 选择 Nuclear Region。
8. Calculate Properties 计算信号比例	Population 选择 Embryo, Method 选择 By Formula。根据需要设置公式和参数即可计算不同区域的信号强度比例。
(Option 2) Calculate Morphology Properties (可选 2) 计算形态学性质	根据需要选择特定 Population 和 Region, 可在 Method 下拉菜单中选择不同形态学性质进行计算, 如体积、半径等。
Define Results	点击运行完整程序后保存。 <i>注: 程序编写完成后可选区不同拍摄对象检验参数是否合适, 并作出相应调整。</i>
Evaluation	保存分析程序后, 进入 Evaluation, 选取所有待分析的孔进行批量分析。

图 3. 早期胚胎细胞的三维重构。A, 受精卵; B, 2 细胞胚胎; C, 4 细胞胚胎; D, 8 细胞胚胎。

溶液配方

1. Modified MEM (MMEM)

表 3. Modified MEM (MMEM)

成分	终浓度
Alpha-MEM	-
Sodium Pyruvate	0.33 mM
EDTA	0.01 mM
BSA	3 g/L
Penicillin/Streptomycin (100x)	1x

配置完成后使用 0.22 μ l 滤头过滤，分装于-80 °C 保存，可在 4 °C 保存一周。

2. KSOM (表 4)

表 4. KSOM

成分	终浓度
NaCl	95.0 mM
KCl	2.50 mM
KH ₂ PO ₄	0.35 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20 mM
Glucose	0.20 mM
Sodium lactate	10.0 mM
NaHCO ₃	25.0 mM
Sodium pyruvate	0.20 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.71 mM
EDTA	0.01 mM
L-Glutamine	1.00 mM
BSA	1 g/L
Penicillin/Streptomycin (100x)	1x

配置完成后使用 0.22 μ l 滤头过滤，分装于-80 °C 保存，可在 4 °C 保存一周。

3. KSOM-AA

每 100 ml KSOM 培养基补充 0.5ml NEAA 和 1ml EAA 即可，可在 4 °C 保存一周。

4. 4%多聚甲醛 (4% PFA)

称取 2 g 多聚甲醛粉末至 50 ml 离心管中，加入 40 ml ddH₂O 及 200 μ l 0.2 M NaOH，60-70 °C 水浴至完全溶解 (约 30-60 分钟)，加入 5 ml 10x DPBS，调整 pH 值为 7.8 后定容至 50 ml。可于 4 °C 避光保存 2 个月。

5. 10× DPBS

称取 80 g NaCl，0.2 g KCl，1.42 g Na₂HPO₄，0.27 g KH₂PO₄ 溶于 800 ml 去离子水，用浓盐酸将 pH 值调节至 7.4 后用去离子水定容至 1 L。高温高压灭菌后室温保存。

致谢

中国科学院特别研究助理资助项目 (2019)。

参考文献

1. A. 纳吉, M. 格斯滕斯坦, K. 文特斯滕, R. 贝林杰. (2004) 小鼠胚胎操作实验指南 (影印版). 北京: 科学出版社.