树鼩精原干细胞系的分离和建系培养

Establishment of Spermatogenic Stem Cell Lines from Tree Shrew

李聪^{1, #}, 毕蕊^{2, #}, 郑萍^{1, *}

¹ 遗传资源与进化国家重点实验室, 昆明动物研究所, 中国科学院大学, 昆明市, 云南省; ² 动物模型与人类疾病机理重点实验室, 昆明动物研究所, 中国科学院大学, 昆明市, 云南省;

*通讯作者邮箱: zhengp@mail.kiz.ac.cn

#共同第一作者/同等贡献

引用格式: 李聪, 毕蕊, 郑萍. (2021). 树鼩精原干细胞系的分离和建系培养. *Bio-101* e1010935. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010935.

How to cite: Li, C., Bi, R. and Zheng, P. (2021). Establishment of Spermatogenic Stem Cell Lines from Tree Shrew. *Bio-101* e1010935. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010935. (in Chinese)

摘要: 树鼩与灵长类动物关系密切, 在生物医学研究中比啮齿类动物有更多优势。然而, 由于树鼩雌性生殖生物学基本知识如发情周期, 体外胚胎培养周期和技术等的缺乏, 从而阻碍了树鼩的广泛应用。基因操作方法的缺乏阻碍了树鼩的广泛应用。目前在小鼠和大鼠中精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)能够在体外长时间扩增培养, 并且进行基因编辑。在这里, 我们描述了一种分离、培养体系, 能够进行树鼩精原干细胞(tree shrew spermatogonial stem cells, TS-SSCs)的长期体外扩增, 并保持其干细胞的特性。在我们的研究中, 我们使用 THY1(CD90)抗体流式分选或磁珠分选、或者差异贴壁的方式来富集 TS-SSCs。在原代培养过程中, 培养基中添加一定浓度的 wnt3a 可以提高 SSCs 的存活率。使用树鼩支持细胞(tree shrew sertoli cells, TS-STO)作为饲养层对于 TS-SSCs 增殖是必要的。将 TS-SSCs 与基因编辑方法结合起来的培养系统的发展, 为对树鼩进行精确的基因操作铺平了道路。

关键词: 树鼩, 精原干细胞, 分离, 细胞培养

材料与试剂

1. 4 月龄至 3 岁龄雄性树鼩
2. 0.22 μ m 滤器 (Millipore, catalog number: SLGP033RB)
3. 细胞滤网 (Falcon, catalog number: 352350)

4. 15 ml 离心管 (NEST, catalog number: 601052)
5. 50 ml 离心管 (NEST, catalog number: 602001)
6. 24 孔板 (Corning, catalog number: 3524)
7. 培养皿 (60 mm) (Corning, catalog number: 430166)
8. 磁力架 (Miltenyi/美天旎, catalog number: 130-042-301)
9. 50 ml 注射器 (国产(经销), catalog number: ks001)
10. 冻存管 (Nunc, catalog number: 375418)
11. Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red (Thermo Fisher, catalog number: 25200072)
12. Collagenase IV 胶原酶 IV (Gibco, catalog number: 17104-019)
13. DMEM, Powder, High Glucose, Pyruvate (Thermo Fisher, catalog number: 12800017)
14. DNA 酶 I 脱氧核糖核酸酶 (Sigma, catalog number: DN-25)
15. Gibco PSN (Gibco, catalog number: 15640055)
16. 明胶 (gelatin) (Amresco, catalog number: 9764-500 g)
17. Stempro-34 SFM (1×), liquid (Thermo Fisher, catalog number: 10639-011)
18. FBS QUALIFIED AUSTRALIA ORIGIN 500 ml 澳洲胎牛血清 (Thermo Fisher, catalog number: 10099141)
19. 丙酮酸钠 100 mM (Gibco, catalog number: 11360-070)
20. MEM Non-Essential Amino Acids Solution, 100× (Gibco, catalog number: 11140-050)
21. 牛血清白蛋白 (BSA) (Aladdin/阿拉丁, catalog number: 9048-46-8)
22. 2-Mercaptoethanol for molecular biology, for electrophoresis, suitable for cell culture, BioReagent, 99% (GC/titration) (Sigma, catalog number: M3148-500 ml)
23. L-谷氨酰胺 (Sigma, catalog number: 56-85-9)
24. EGF (epidermal growth factor) (Life Technologies, catalog number: PHG0311)
25. Recombinant Human GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) Protein, R&D Systems, catalog number: 212-GD-010)
26. Mouse LIF (leukemia inhibitory factor)(Millipore, catalog number: ESG1107)
27. bFGF (basic fibroblast growth factor) (Millipore, catalog number: GF003)
28. rhWnt3a (R&D, catalog number: 5036-WN)

29. Anti-PE micro beads (Miltenyi/美天旎, catalog number:130-048-801)
30. PE Anti-human CD90 (THY1) (BioLegend, catalog number: 328110)
31. 磁珠柱子 MS-columns (Miltenyi/美天旎, catalog number: 130-042-201)
32. 磁珠柱子 LS-columns (Miltenyi/美天旎, catalog number: 130-042-401)
33. Mitomycin C from *Streptomyces caespitosus* powder (Sigma, catalog number: M4287)
34. 腐胺(putrescine) (Sigma, catalog number: V900377)
35. TS-SSC 培养基 (见溶液配方)
36. 胶原酶IV (见溶液配方)
37. DNA 酶 I 脱氧核糖核酸酶 (见溶液配方)
38. 明胶 (gelatin) (见溶液配方)
39. Mitomycin C from *Streptomyces caespitosus* powder (20×) (见溶液配方)
40. Glutamine (100×) (见溶液配方)

仪器设备

1. 流式细胞仪 (BD, 型号: Influx)
2. 恒温水浴锅 (北京水光明医疗器械, 型号: 001)
3. 细胞培养箱 (Thermo Fisher , 型号: 371 气套式)
4. 倒置显微镜 (尼康, 型号: TE2000)
5. 超净工作台 (苏净集团安泰公司, 型号: SW-CJ-2FD)
6. 高温高压灭菌锅 (YAMATO, 型号: 全系列)
7. 移液器/移液枪 (Eppendorf, 型号 Research plus)
8. 超纯水系统 (Millipore, 型号 Milli-Q)

实验步骤

一、树鼩睾丸组织的消化

1. 取 2 只 4 月龄至 3 岁龄雄性树鼩 (推荐 7 月龄-1 岁龄左右), 断颈处死, 将树鼩浸泡在 75%医用酒精中消毒, 防止毛发中的真菌等物质漂浮空气中影响后续实验操作, 但要注意在酒精中浸泡时间不宜太长, 以防止树鼩身体僵硬影响后续操作;

2. 取出睾丸，将其置于含有 2×双抗的 PBS 中进行清洗。多清洗几次(3-4 次)。然后将睾丸组织转移至超净台中，继续用含有 2×双抗的 PBS 进行清洗。多清洗几次(3-4 次)，此步骤注意无菌操作，超净台中所用手术器械需提前灭菌；
3. 去除白膜和残余附睾组织。充分剪碎组织。提前配制好消化液 (DMEM 溶液中胶原酶终浓度 2 mg/ml，DNA 酶终浓度为 0.2 mg/ml，双抗 2×)。将组织转移至含有消化液的 50 ml 离心管，37 °C 水浴消化 30 min-45 min。消化期间每隔 5 min 摇晃一下，使组织与消化液充分接触。消化完成后，362 × g 离心 5 min；
4. 0.25%胰酶重悬细胞沉淀。37 °C 水浴消化 5-10 min，FBS 终止消化；
5. 添加 20-30 ml DMEM 溶液，混匀，用 70 μm 滤网过滤后，362 × g 离心 5 min，弃上清；
6. 添加 20 ml DMEM 溶液重悬细胞沉淀，混匀，362 × g 离心 5 min，弃上清，此步骤重复 1 次。

二、树鼩精原干细胞的富集培养

针对精原干细胞的富集实验，主要包括以下三种方式，可根据具体情况选择使用。

1. 磁珠分选

- 1.1 加入 10 ml PBS 重悬细胞沉淀，混匀，362 × g 离心 5 min，弃上清，此步骤重复 1 次；
- 1.2 加入 10 ml 1% BSA 再洗一次。混匀，362 × g 离心 5 min，上清不要倒出来，因为残留的 1% BSA 会稀释抗体，用移液枪小心吸出；
- 1.3 500 μl 的 1% BSA 中加入 20 μl THY1 抗体重悬细胞，室温滚筒上标记 30 min（过一会儿用手弹一下，不要有气泡）；
- 1.4 10 ml 的 1% BSA 吹打混匀，362 × g 离心 5 min，弃上清，此步骤重复 1 次；
- 1.5 500 μl 的 1% BSA 中加入 20 μl 磁珠抗体 (Anti-PE micro beads) 重悬细胞。避光，室温滚筒上标记 15 min（磁珠在用之前，吹打混匀，严格避光）；
- 1.6 10 ml 的 1% BSA 吹打混匀，362 × g 离心 5 min，弃上清，此步骤重复 1 次；
- 1.7 根据细胞量（5-10 ml），选择合适的 1% BSA 重悬细胞；
- 1.8 将磁珠分选柱固定在磁力架上，磁珠分选柱下面套上 200 μl 枪头，向分选柱内呈滴状加入 2 ml 的 1% BSA 润洗；

- 1.9 待液体全部流出后，加入 1% BSA 重悬细胞样品，使其在自然状态下流出；
- 1.10 待样品全部流出后，再加入 2 ml 的 1% BSA 冲洗；
- 1.11 将分选柱从磁力架上取下，放置在 15 ml 离心管中，向磁珠分选柱中加入一定量（2-3 ml）的 1% BSA，将柱塞推下，使液体流出（若洗脱不干净，可重复该步骤）；
- 1.12 将收集到的样品 $362 \times g$ 离心 5 min，树鼩精原干细胞培养基重悬。将收集到的细胞接种在明胶包被的 24 孔板上，细胞密度 1×10^5 - 5×10^5 个/孔，记为 P0 代。

2. 差异贴壁

树鼩精原干细胞培养基重悬消化后离心的细胞沉淀，按照细胞密度 1×10^5 - 5×10^5 个/孔，将细胞接种在明胶包被的 24 孔板上，记为 P0 代。

3. 流式分选

与磁珠分选方式相似。

- 3.1 加 10 ml 1% BSA 重悬细胞沉淀，混匀， $362 \times g$ 离心 5 min，弃上清，此步骤重复 1 次；
- 3.2 1 ml 的 1% BSA 中加入 20 μ l THY1 抗体重悬细胞沉淀，常温避光孵育抗体 30 min；
- 3.3 抗体标记结束后，用 10 ml PBS 重悬细胞沉淀，混匀， $362 \times g$ 离心 5 min，弃上清，此步骤重复 1 次；
- 3.4 根据细胞量，用 1% BSA 重悬细胞至流式专用玻璃管中，进行流式细胞分选，阴性对照的细胞除了不标记抗体外，其余的操作都相同；
- 3.5 分选得到的阳性细胞，树鼩精原干细胞培养基重悬。将收集到的细胞接种在明胶包被的 24 孔板上，细胞密度 1×10^5 - 5×10^5 个/孔。记为 P0 代。

4. 培养步骤

- 4.1 磁珠分选、流式分选阳性细胞或者直接原代消化的细胞按照细胞密度 1×10^5 - 5×10^5 个/孔接种在明胶包被的 24 孔板上，培养基中添加 10 ng/ml wnt3a，记为 P0 代。培养 2 天后，弃一半培养基，添加一倍培养基，培养至第 4 天培养基全部更换，根据皿中体细胞贴壁情况，5 天至 1 周后传代；
- 4.2 将培养 5-7 天的 P0 代细胞小心的用移液枪吹下来， $161 \times g$ 离心 5 min，弃上清，树鼩精原干细胞培养基重悬，培养基中添加 10 ng/ml wnt3a，细胞密度 1×10^5 - 5×10^5 个/孔铺至明胶处理过的 24 孔板上，记为 P1 代。隔天半换液，4 天后培养基全部更换，根据皿中体细胞贴壁情况，5 天至 1 周后传代；

注释: 在 P0-P1 高密度的细胞培养中, 不积极换液是培养重点, 培养基中添加 wnt3a 有助于精原干细胞对体外环境的适应, 建系成功率高。

- 4.3 将培养 5-7 天的 P1 代细胞小心的用移液枪吹下来, $161 \times g$ 离心 5 min, 弃上清, 树鼩精原干细胞培养基重悬, 培养基中添加 10 ng/ml wnt3a, 细胞密度 5×10^4 - 1×10^5 个/孔铺至有饲养层细胞的 24 孔板上, 记为 P2 代。隔天半换液, 4 天后培养基全部更换, 根据凋亡细胞量, 5-7 天后传代;

注释: 在本周培养过程中可见大量分化细胞的凋亡细胞。

- 4.4 饲养层(树鼩支持细胞, tree shrew sertoli cells, TS-STO)制备方式: 在 P0、P1 代时, 可以将皿中贴壁的体细胞采用 0.05% 胰酶消化后至 60 mm 皿中培养, 培养基为 DMEM 溶液加 10% FBS, 培养密度维持在 6-7 天传一代即可。

- 4.5 饲养层的处理: 在汇合度 90%的 TS-STO 中加入终浓度为 10 μ g/ml 的丝裂霉素 C 处理 3 h 后, PBS 洗 3 次, 消化传至 24 孔板内, 细胞密度 1×10^5 个/ml;

- 4.6 将培养 5-7 天的 P2 代细胞小心的用移液枪吹下来, $161 \times g$ 离心 5 min, 弃上清, 树鼩精原干细胞培养基重悬, 培养基中添加 10 ng/ml wnt3a, 细胞密度 5×10^4 - 1×10^5 个/孔铺至有饲养层细胞的 24 孔板里, 记为 P3 代。隔天半换液, 4 天后培养基全部更换, 5-7 天后传代。本周培养中可逐步见到三五成群的葡萄状、不规则几何状集落出现;

- 4.7 将培养 5-7 天的 P3 代细胞小心的用移液枪吹下来, $161 \times g$ 离心 5 min, 弃上清, 树鼩精原干细胞培养基重悬, 培养基中添加 10 ng/ml wnt3a, 细胞密度 5×10^4 - 1×10^5 个/孔铺至有饲养层细胞的 24 孔板里, 记为 P4 代。隔天半换液, 4 天后培养基全部更换, 5-7 天后传代;

- 4.8 P4 后细胞集落已能大量扩增, 之后以 1:3-5 传代即可, 培养基中已经不用添加 wnt3a。

结果与分析

图 1. 树鼯精原干细胞系的建立

在建系培养过程中，P2 或 P3 时应该出现如图 1 中箭头所示的葡萄样集落，之后的培养注意细胞密度即可。

溶液配方

1. TS-SSC 培养基

10 ml 树鼯精原干细胞完全培养基成分

树鼩精原干细胞培养基

成分	终浓度	配制 10 ml 所需用量
Stempro34 SFM(1×)	-	补齐至 10 ml (约 8.3 ml)
FBS	10%	1 ml
Stempro34 supplement	-	250 μ l
丙酮酸钠	1 mM	100 μ l
NEAA	1 mM	100 μ l
腐胺	60 μ M	25 μ l
青霉素链霉素双抗	1 mM	100 μ l (防污染作用，可不添加)
rhEGF	10 ng/ml	10 μ l
bFGF	2 ng/ml	1 μ l
Mouse LIF	100 U	10 μ l
rhGDNF	40 ng/ml	4 μ l
L-谷氨酰胺	2 mM	100 μ l
rhWNT3A	10 ng/ml	10 μ l
β -巯基乙醇	0.1 mM	0.07 μ l

培养基配制完成后，0.22 μ M 滤膜过滤后，4 °C 保存。建议每次配制培养基时不要配制过多，一般情况下，4 °C 保存使用时间推荐在 2 周以内。

2. 胶原酶IV

称取 0.4 g 胶原酶，转移至 50 ml 离心管中，带进细胞间操作台加入 40 ml 的 DMEM 基础培养基，浓度为 10 mg/ml，混匀。手动使用注射器和 0.22 μ m 滤器过滤灭菌，分装后放入 -20 °C 备用；

3. DNA 酶 I 脱氧核糖核酸酶

称取 50 mg DNA 酶，转移至 15 ml 离心管中，带进细胞间操作台加入 10 ml 的 PBS，浓度为 5 mg/ml，混匀。手动使用注射器和 0.22 μ m 滤器过滤灭菌，分装后放入 -20 °C 备用；

4. 明胶 (gelatin)

称取 0.1 g 明胶，转移至玻璃瓶中，加入 100 ml 纯水，浓度为 0.1%，灭菌锅灭菌后，常温储存；

5. Mitomycin C from *Streptomyces caespitosus* powder (20×)

在细胞间超净台里操作，2 mg 丝裂霉素 C 中加入 10 ml 的 DMEM 基础培养基，混匀，浓度为 200 µg/ml，分装后放入-20 °C 备用；

6. Glutamine (100×)配制方法

称取 1.168 g 的 L-谷氨酰胺，转移至 40 ml 的 PBS 中，在细胞间超净台里加入 28 µl β-巯基乙醇，混匀。手动使用注射器和 0.22 µm 滤器过滤灭菌，分装后放入-20 °C 备用；

其余试剂按照试剂说明书进行配制及储存。

致谢

相关工作得到了中国科学院(XDB13000000 和 XDA01010203)、云南省(2015HA038)、NSFC-云南联合基金项目(U1702284)以及昆明动物所“135”项目资助。实验方案中提到的树鼩精原干细胞分离建系培养方法由李朝晖和班文赞共同建立(班文赞, 2016)。相关内容 2017 年发表于《Cell Research》上(Li *et al.*, 2017)。

参考文献

1. 班文赞. (2016). 树鼩精原干细胞转基因载体的构建. 昆明理工大学硕士学位论文.
2. Li, C. H., Yan, L. Z., Ban, W. Z., Tu, Q., Wu, Y., Wang, L., Bi, R., Ji, S., Ma, Y. H., Nie, W. H., Lv, L. B., Yao, Y. G., Zhao, X. D. and Zheng, P. (2017). [Long-term propagation of tree shrew spermatogonial stem cells in culture and successful generation of transgenic offspring](#). *Cell Res* 27(2): 241-252.