教学研究

自动化神经组织单细胞悬液制备探索性实验教学实践

宋兴辉[1] 沈浩[2] 陈瑾[1,2]*

([1]浙江大学医学院公共技术平台, 杭州 310058; [2]浙江中医药大学医学技术学院, 杭州 310053)

摘要 组织单细胞悬液制备是细胞生物学中的基础技能, 常用的组织解离方法有机械法和酶法, 不同解离方法在细胞得率和细胞活性上差异较大。在神经科学的各个研究领域, 包括发育研究、疾病病理生理学、药物和毒素筛选, 以及神经疾病动物模型的移植等均需要使用分离的单细胞。然而神经组织细胞间紧密的黏附性及轴突和树突的易碎性阻碍单细胞的获得。自动化组织处理器结合机械法与酶法双重作用可获得高质量的细胞悬液。利用这一技术开展自主设计型神经组织单细胞悬液制备实验, 以提升学生综合分析应用能力, 拓展对前沿科学技术的认识。通过科研与教学相融合的方式, 更好地激发医学生的学习热情, 提高医学生的科研素质, 实现研究型与创新型人才培养的目标。

关键词 单细胞悬液制备; 全自动解离; 探索性实验教学

Exploratory Experimental Teaching Practice on Automatic Neural Tissue Dissociation to Viable Single Cells

SONG Xinghui[1], SHEN Hao[2], CHEN Jin[1,2]*

([1]*Core Facilities*, *Zhejiang University School of Medicine*, *Hangzhou 310058*, *China*;
[2]*College of Medical Technology*, *Zhejiang Chinese Medical University*, *Hangzhou 310053*, *China*)

Abstract Single cell suspension preparation is a basic skill in Cell Biology. Commonly tissues are dissociated by mechanical and enzymatic methods. Different dissociation methods vary greatly in cell yield and cell viability. Neural single cell suspensions are in active use for a myriad of research applications, including the study of development, disease pathophysiology, drug and toxin screening, and grafting in animal models of neurological disorders. However, the acquisition of neural single cells is hampered due to the tight adhesion between neurons and the fragility of axons and dendrites. Automatic tissue dissociator combines the mechanical and enzymatic methods and can obtain high-quality cell suspensions. This technology is used to carry out a self-designed experiment of neural single cell suspension preparation, which is helpful to enhance students' comprehensive analysis and applica-

收稿日期: 2020-04-09 接受日期: 2020-06-08

浙江大学实验技术研究项目(批准号: SJS201714、SJS201712)、浙江中医药大学教育教学改革重大招标项目(批准号: ZB19008)和浙江省科技厅公益项目(批准号: LGF19H150006)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-86633001, E-mail: chenjin0425@zcmu.edu.cn

Received: April 9, 2020 Accepted: June 8, 2020

This work was supported by the Experimental Technology Research Project of Zhejiang University (Grant No.SJS201714, SJS201712), the Educational Reform Project of Zhejiang Chinese Medical University (Grant No.ZB19008) and Public Welfare Project of Zhejiang Science and Technology Department (Grant No.LGF19H150006)

*Corresponding author. Tel: +86-571-86633001, E-mail: chenjin0425@zcmu.edu.cn

URL: http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5310

tion capabilities, and expand their understanding of cutting-edge science and technology. The integration of scientific research and teaching can better stimulate the learning enthusiasm of medical students, improve their scientific research quality, and achieve the goal of culticating research-oriented and innovative talents.

Keywords single cell suspension preparation; automatic dissociation; exploratory experimental teaching

细胞培养是细胞生物学实验教学的重要环节, 它让细胞功能和进程的研究更具可操作性, 很好地弥补了体内实验的不足。原代细胞相较细胞系保持了细胞在体内的许多重要标志和功能, 是细胞生物学研究不可或缺的材料。获取原代细胞常用的组织解离方法有机械法和酶法, 不同解离方法在细胞得率和细胞活性上差异较大[1]。优化实验方案获取高质量单细胞至关重要, 不合适的组织解离可能降低细胞功能和分子实验中获得的数据质量, 产生实验伪象。

在神经科学中, 对脑肿瘤和正常脑组织的分子生物学、免疫学、生理学的研究均需要使用分离的单细胞。数百种神经细胞和神经胶质细胞类型已被描述, 大脑或脊髓中的每种特定细胞类型都有一系列细胞表面分子或分子决定因素, 通过它们可以识别和表征细胞。借助单细胞分析技术研究异质细胞群体间相互作用介导的生物学过程极大推动了神经科学研究的发展, 如流式细胞术, 而这些技术都依赖于组织单细胞悬液的制备[2]。然而由于神经细胞体和成千上万的突触紧密结合, 以及轴突和树突的易断裂阻碍了神经组织单细胞的获得。近年来, 通过不断优化消化酶组合及消化条件, 对于神经组织单细胞解离的方法研究成效显著, 借助gentleMACS组织处理系统, 可有效结合机械法和酶法, 起到双重解离作用, 达到较好的解离效果[3]。

在传统细胞培养的教学中, 因操作困难较少涉及原代细胞的获取培养, 学生缺少相关知识技能的锻炼; 少数原代细胞培养的教学以常见的淋巴细胞或肝细胞为主, 有较成熟的操作方法, 一般细胞得率较高, 但学生很难真正体验到方法探索带来的学习乐趣, 也缺失从分析实验失败原因而改进方法的过程中获得提升分析问题解决问题能力的机会。因此, 为激发学生的探索精神并培养团队协作能力, 利用全自动组织处理系统开展自主设计型神经组织单细胞悬液制备实验, 让学生构建全自动组织机械剪切程序, 探索最优酶解条件。这些前沿技术的开展, 一方面推动细胞生物学实验教学内容的革新, 紧跟科研需求, 使学生能学以致用; 另一方面, 实验自主设计探索学习有助于培养学生的综合科研能力, 为细胞生物学研究型人才的培养提供新的科研训练内容。

1 实验原理

1.1 单细胞悬液制备

单细胞悬液制备一方面需有效地从胞外基质中释放细胞, 另一方面限制对细胞活性和表面修饰蛋白结构进行改造, 目前实体组织单细胞悬液制备方法有机械法和酶消化法。机械法包括研磨法、剪碎法、匀浆法等, 主要通过给予组织较大的压力, 使细胞从组织中释放出来, 但手动机械解离组织由于吹打幅度和速度差异导致活细胞得率的波动, 重复性较差。酶消化法主要是水解组织间的胶原纤维和黏多糖物质, 分开细胞间的紧密连接, 达到制备单细胞悬液的目的, 但酶孵育条件较难控制, 实体组织细胞易黏连成团, 产率较低[4]。

酶消化能力具有组织特异性, 胶原蛋白酶对胶原中Pro-X-Gly-Pro序列的中性氨基酸和甘氨酸间的肽键有特异性水解作用; 中性水解酶可水解非极性氨基酸残基N-端肽键; 而胰蛋白酶可裂解赖氨酸和精氨酸残基C-端侧链多肽[5]。已有研究表明, 在小鼠脑和脊柱少突胶质细胞群解离中, Accutase酶解细胞得率较高(1.6×10^6个/350 mg脑组织), 同时, 少突胶质细胞表面抗原完整性保持较好[6]。由神经干细胞和前体细胞团聚形成的神经球的解离研究表明, 通过Accutase、Trypsin/EDTA、TrypLE单一处理结合机械研磨或多种酶相继处理更有利于将团聚细胞块解离成单一细胞悬液[4]。

1.2 gentleMACS组织处理系统

gentleMACS组织处理系统可从任何组织中获得单细胞悬液, 具有标准化的组织解离程序, 能提高下游分析的重复性和可靠性。该系统可实现机械法和酶法的整合, 运用特制组织解离管, 使得组织在定子和转子间实现机械剪切。系统配置程序设计功能,

可根据组织特点设计转速、加速度、循环数, 控制机械力作用。同时配备加热模块, 在低转速条件下进行酶孵育, 同步实现机械解离与酶解离。

2 教学设计与安排

2.1 教学目的

(1)知识目标: 掌握组织单细胞解离的基本操作步骤;

(2)能力目标: 学会组织单细胞解离的实验条件设计与改进, 探索最优化的解离方法;

(3)素质目标: 在自主设计探索过程中, 培养分析问题与解决问题的能力, 以及团队协作能力, 提升科研的严谨性(图1)。

2.2 教学重难点

(1)教学重点: 神经组织单细胞悬液制备的酶法和机械法的建立;

(2)教学难点: 单细胞制备操作中人为损伤的避免, 以及最优化解离方案的筛选。

2.3 实验材料与设备

(1)实验材料包括: C57BL/6小鼠(7周、雌性, 由浙江大学动物实验中心提供)、Hank's平衡盐溶液(Hank's balanced salt solution, HBSS)(Thermo Fisher公司)、Accutase酶(Thermo Fisher公司)、Collagenase酶(Sigma-Aldrich公司)、Papain酶(Sigma-Aldrich公司)、Trypsin/EDTA酶(Thermo Fisher公司)。

(2)实验仪器包括: gentleMACS组织处理系统(Miltenyi公司)、超净工作台(Thermo Fisher公司)、倒置荧光显微镜(ZEISS公司)、组织解离管(Miltenyi公司)、70 μm过滤器(Miltenyi公司)、低温离心机(Eppendorf公司)、移液枪(Eppendorf公司)、无菌离心管(Axygen公司)、无菌枪头(Axygen公司)、35 mm培养皿(Corning公司)。

2.4 教学安排

(1)学时安排: 本实验教学重点是启发学生探索不同酶解条件的筛选以期获得最佳解离效果。目前报道的组织解离酶较多, 而酶解条件又有不同组合, 课堂上的有限学时无法对每种酶解原理一一阐述。同时gentleMACS组织处理器的操作使用若仅通过课堂演示效果不佳, 且学生占用课堂时间熟悉仪器操作会影响后续实验进度。因此, 关于组织酶解理论基础、方案设计及仪器操作学习可在课前自主完成, 课堂教学4学时完成不同酶解条件实验及结果分析。

(2)课前准备: 小鼠脑组织由老师或助教于课前准备好, 称取每份脑组织400 mg。所有动物实验均通过浙江大学实验动物福利伦理审查委员会批准。

(3)实验分组与教学实施: 根据实验目的进行分组, 按4种解离酶分成4个大组。在4个大组内再根据设计的实验条件分小组, 建议3人为1个小组(表1)。实验前1周, 教师布置半开放自主设计性实验的内容及设计要求、实施时间及考核方法。以组为单位进行资料查阅与分析、实验方案讨论与设计、实验准备及实施, 按规定时间提交实验内容的可行性报告。课堂上老师对实验原理及实验要求进行讲解, 并对

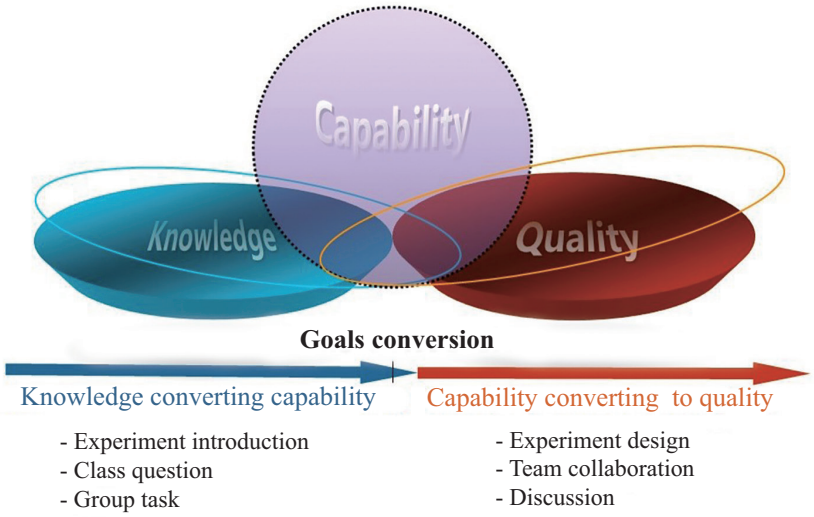


图1 课程目标评价

Fig.1 Evaluation of course objectives

表1 实验分组

Table 1 Groups of the experiment

转速/r·min^{-1} Spin /r·min^{-1}	Accutase酶解时间/min Accutase hydrolysis time /min			Collagenase酶解时间/min Collagenase hydrolysis time /min			Papain酶解时间/min Papain hydrolysis time /min			Trypsin/EDTA酶解时间/min Trypsin/EDTA hydrolysis time /min		
	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30
1 500	Group 1			Group 4			Group 7			Group 10		
2 000	Group 2			Group 5			Group 8			Group 11		
2 500	Group 3			Group 6			Group 9			Group 12		

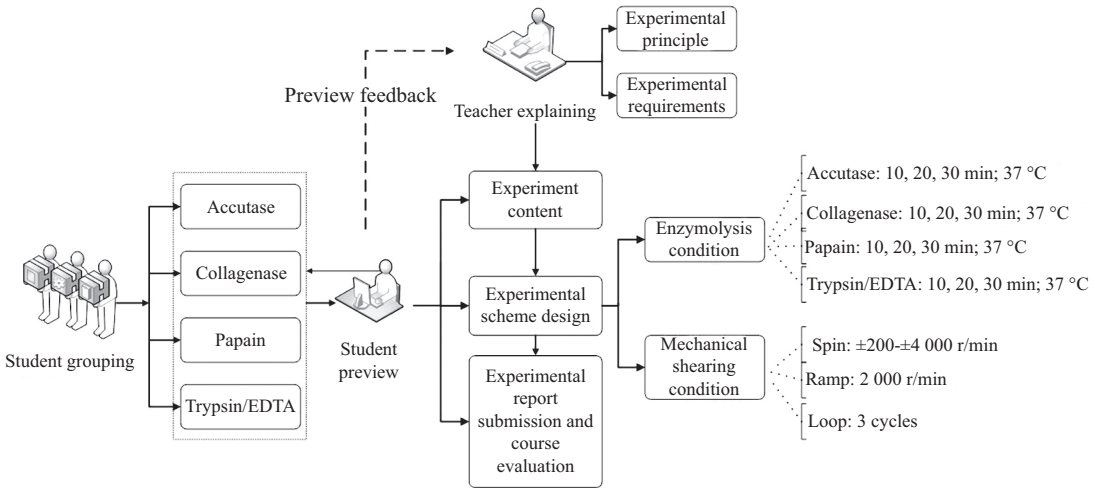


图2 实验教学实施

Fig.2 Implementation of experimental teaching

学生的实验设计进行评判, 然后学生开始实验, 分工合作, 完成所有设计内容; 实验结束后, 同组学生共享实验结果, 并经过分析和讨论得出实验结论, 汇总实验报告(图2)。实验教学的评估体系分为预习报告(30%)、基本操作(20%)、数据处理(10%)与实验报告(40%)这几个方面。实验报告重点阐明测试酶的解离原理、解离条件、解离结果分析及思考题回答。

3 实验步骤

(1)将新鲜神经组织(脑组织或脊髓组织, 本文以大脑为例)放入10 cm的培养皿中, 并加入1 mL HBSS, 保持大脑湿润。使用15T手术刀刀片将大脑组织切成体积小于1 mm×1 mm×1 mm的碎块。

(2)将脑组织碎块转移至组织解离管, 根据消化酶工作浓度配置解离液, 向解离管加入2 mL酶工作液。

(3)旋紧组织解离管, 上下颠倒混匀组织块与酶解离液, 使组织块落在解离管的定子与转子间, 避免黏在管壁上。随后将解离管倒置插入gentleMACS组织处理系统通道上。

(4)设置解离程序, 选择管类型为C管, 根据设计程序, 选择转速spin、加速度ramp、循环数loop, 点击添加。选择输入所需的参数, 点击OK(图3)。

(5)解离结束后重悬样品, 经过70 μm过滤器过滤后, 收集细胞滤液至50 mL离心管。加入10 mL HBSS清洗过滤器, 以免细胞残留。

(6)将细胞悬液于室温下以1 680 r/min离心10 min, 小心弃去上清。

(7)加入预冷的碎片去除溶液(Miltenyi), 混匀后加入4 mL PBS, 于4 °C、16 800 r/min离心10 min, 去除PBS和中间碎片层, 再加入PBS至终体积为15 mL, 混匀, 于4 °C、5 544 r/min离心10 min, 小心弃去上清。

(8)加1 mL HBSS重悬细胞, 取45 μL细胞悬液, 加入0.40%锥虫蓝染液5 μL, 使锥虫蓝终浓度为0.04%。死细胞被染成蓝黑色, 用细胞计数板在显微镜下分别对活细胞和死细胞进行计数。计算细胞得率和活性。

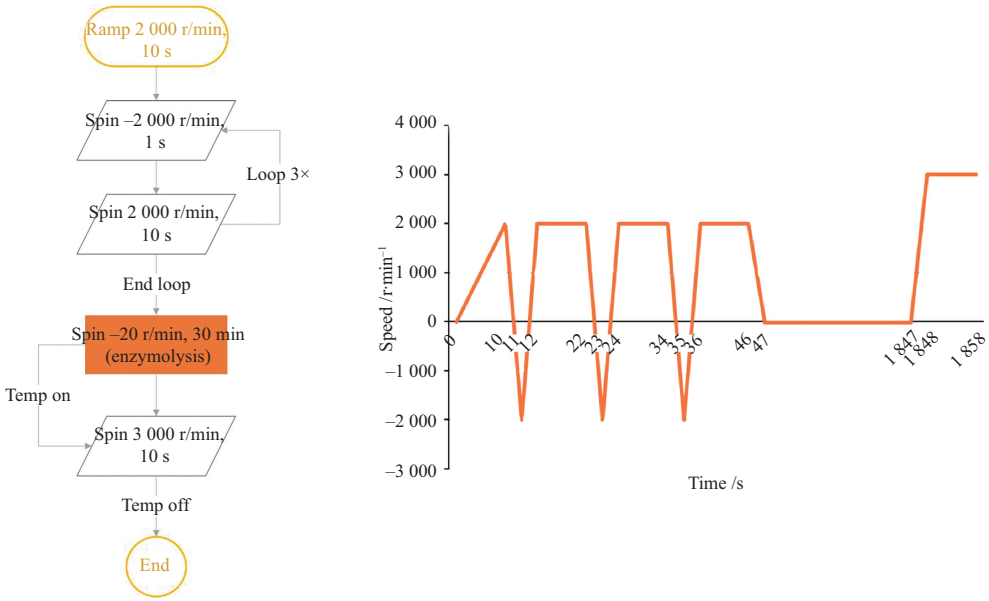


图3 神经组织解离程序设计示例

Fig.3 Example of neural tissue dissociation program design

4 实验结果分析与讨论

4.1 神经组织酶解离的敏感性差异规律

脑组织酶解后活细胞计数结果如图4所示，每克脑组织平均含3.2×10^5个细胞。脑组织对不同酶的敏感性存在差异，对Papain酶最为敏感，活细胞得率最高，解离效果最好；对Collagenase和Accutase 2种酶敏感性差异不大，但对Trypsin/EDTA酶不敏感，解离效果最差。这与神经元细胞体外培养过程中，用Trypsin对细胞进行解离不同。体外培养细胞主要通过分泌细胞外基质及其表面表达的黏附因子而相互作用，原始组织间则主要通过胶原纤维和黏多糖物质紧密连接，消化酶作用物质不同，同时有研究表明，单独纯化的胰蛋白酶通常对组织解离效果不佳，Trypsin/EDTA处理导致DNA释放使得细胞悬液变黏稠，因此不建议用Trypsin/EDTA来处理细胞[4]。

相较于肝、肺等组织，神经组织细胞间紧密的黏附性及轴突和树突的易碎性，使得神经组织解离单细胞的得率仍较低；且对于不同来源的组织，或获取不同的目的细胞，其解离条件均有差异，如在少突胶质细胞群的解离过程中，Accutase酶解细胞得率较高，而Collagenase D加DNase I的酶组合可同时获得较高得率的神经细胞和浸润的血细胞[6-7]。由此，分离神经元细胞核被作为制备神经组织单细胞悬液的常用方法，用于研究核移植、核小体结构、基因表现及转录调控过程等[8-9]。对教学来说，制备细胞核程序过于复杂，学生不易操作，而且不好进行质控。

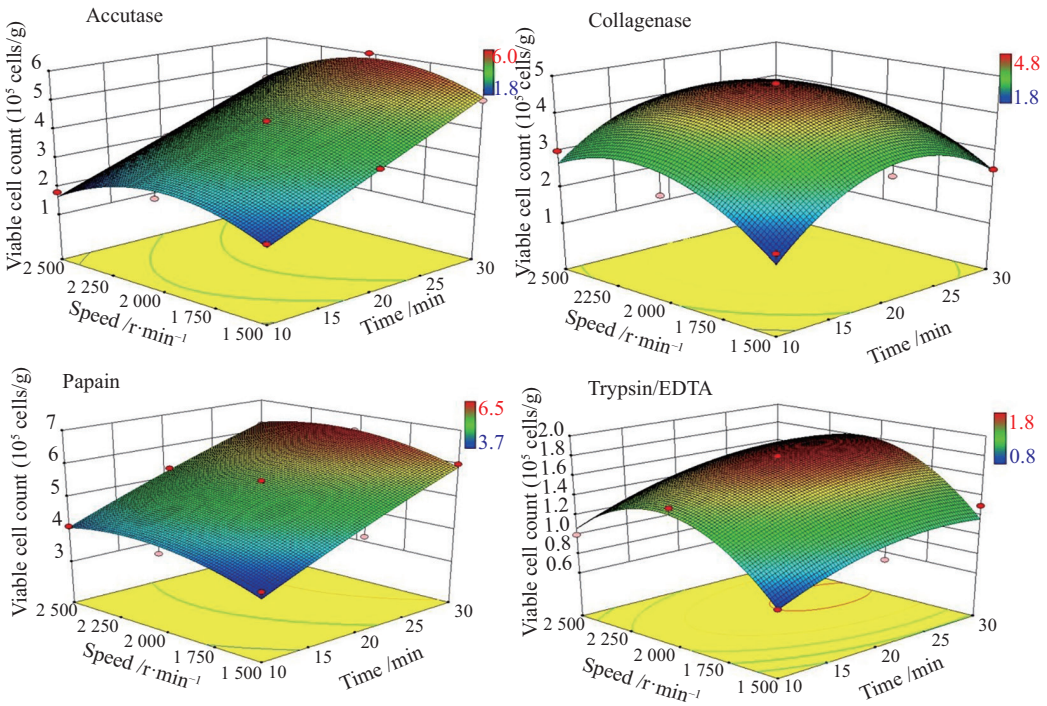
4.2 自动化神经组织解离程序建立

借助gentleMACS组织处理系统，对不同酶处理时间和不同机械剪切速度条件进行组合，评价解离效果，结果表明，酶处理时间影响单细胞得率，30 min解离时间的效果最佳；机械剪切速度也影响活细胞比例，在2 000 r/min处理条件下解离效果最优(图4)。根据结果可获得制备神经组织单细胞悬液的优化方案，选用Papain或Accutase处理30 min，结合2 000 r/min的机械剪切速度可获得较高活细胞得率。该实验方法探索了机械法与酶解法双重作用的最优组合方案，以提高神经组织解离效率；通过程序控制解离过程，减少人为机械操作的误差，提高下游分析的重复性和可靠性；且全程在密闭解离管中进行，能保证细胞处理的无菌性和学生安全。由于实验教学时间、材料等的限制，并未对所有影响条件进行筛选实验，如不同酶组合的解离效果、机械剪切力的循环数改变等，有待进一步探索。

5 实验教学探讨

5.1 自主设计实验开设的创新性

细胞生物学实验教学是对理论教学的重要补充与实践，学生通过实验验证理论知识，培养学习的兴趣与探索精神。以往实验教学以验证性实验为主，具有成熟的操作步骤，学生根据老师提供的实验方案按部就班操作即可，实验结果也已被验证，实验报告千篇一律。这种模式不可避免地压抑了学生的



颜色从蓝色–绿色–红色表示活细胞数增加。

The color from blue to green to red indicated an increase in the number of viable cells.

图4 不同解离条件下神经组织活细胞数

Fig.4 Viable neural cells under different dissociation conditions

创新思维, 使学生不能真正融入实验。如何以恰当的方式激发学生主动思考, 锻炼发现问题、解决问题的能力, 是本科细胞生物学实验教学的改革重点。本文提出利用全自动组织处理系统, 自主设计神经组织单细胞解离方案, 探索最优解离条件。该教学方法最大的特点是实验前没有标准的实验方案, 老师只提供实验原理与总体设计思路, 具体通过学生分组完成实验设计、探索分析, 最终得出结论。这种半开放式设计实验能充分调动学生的参与感, 培养学生科学设计的严谨性、科学分析问题与解决问题的能力, 同时促进团队合作交流[10]。全自动组织处理系统的编程模块也给实验带来了乐趣。从学生总结中了解到, 半开放设计性实验受到了学生的普遍欢迎, 他们对于该类实验的评价是能够调动自主学习的积极性; 从某种程度上模拟了科研实验的过程, 能够培养科学思维能力及创新意识。

5.2 实验项目的科学前沿性和综合研究性

学生科学素养的培养是实验教学的一大目标, 将新颖性的科研实验和基础性的教学实验相结合, 以科研成果促进教学改革。根据细胞生物学的特点, 其实验项目应体现科学前沿性和综合性、实际应用性和研究性[11]。本实验以神经组织为研究对象, 一是基于神经科学近年来在单细胞层面的热点研究, 二是由于神经组织细胞间紧密的黏附性及轴突和树突的易碎性, 使得单细胞悬液制备有一定难度, 具有实验探索的意义。对于失败结果, 学生进行独立分析, 查阅资料, 提出改进方案; 对于成功结果, 可直接应用于神经科学研究, 最大限度地增强学生的自主性与参与度, 提高学生独立分析、创新思维和实践应用能力。相信这种“以科研促教学”的模式可以不断推动细胞生物学的教学改革, 从而培养出研究型和创新型的人才。

5.3 以大型仪器设备为支撑, 促进大型仪器的资源共享

传统实验教学以手工法为主, 在此应用实验平台大型仪器资源, 大型仪器设备承载了研究和开发的先进理念, 同时也是先进制造和分析技术的集中体现, 有利于拓展学生对前沿研究技术的了解, 增强了实验教学的新颖性、实用性、前瞻性, 也提升了学生的动手能力和学习兴趣。本实验引入gentleMACS组织处理系统, 将酶孵育与机械剪切同步在仪器上完成。大型仪器在使用上有一定难度, 这恰好适用于开放/半开放式实验教学, 学生利用课外

时间参加讲座、查阅资料、参与操作培训，掌握基本技能，提高实验教学效果，培养发现问题、分析问题和解决问题的能力，启迪创新性思维，提高综合应用知识的能力，为课堂综合性、设计性实验的开展奠定基础。在课外前沿技术学习过程中，合理安排实验时间和实验顺序，从而使学生能最大限度地使用先进的实验设备，也能激发学生的科研兴趣，加强学生的专业技能，同时促进高校大型仪器的资源共享[12]。大型仪器参与实践教学，不仅是让学生共享实验资源，更重要的是将“研究、创新、合作”的理念贯穿到课程设置、课程讲授、实验能力训练、结果分析等各个环节中的全新教学模式中。在实验教学过程中，嵌入高端的系统硬件和软件条件、前沿的课程理论与实验教学内容、一流技术的教师队伍、高水平科研与技术开发，从而构建开放、共享、综合的实践教学平台[13]。

参考文献 (References)

[1] BREWER G J, TORRICELLI J R. Isolation and culture of adult neurons and neurospheres [J]. Nat Protoc, 2007, 2(6): 1409-98.

[2] VALET G. Cytomics, the human cytome project and systems biology: top-down resolution of the molecular biocomplexity of organisms by single cell analysis [J]. Cell Prolif, 2005, 38(4): 171-4.

[3] PENNARTZ S, REISS S, BILOUNE R, et al. Generation of single-cell suspensions from mouse neural tissue [J]. J Vis Exp, 2009, 29: 1-3.

[4] JAGER L D, CANDA C A, HALL C A, et al. Effect of enzymatic and mechanical methods of dissociation on neural progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells [J]. Adv Med Sci, 2016, 61: 78-84.

[5] SPADA F, FUOCO C, PIRRÒ S, et al. Characterization by mass cytometry of different methods for the preparation of muscle mononuclear cells [J]. N Biotechnol, 2016, 33(5 Part A): 514-23.

[6] ROBINSON A P, RODGERS J M, GOINGS G E, et al. Characterization of oligodendroglial populations in mouse demyelinating disease using flow cytometry: clues for MS pathogenesis [J]. PLoS One, 2014, 9(9): e107649.

[7] LEGROUX L, PITTET C L, BEAUSEIGLE D, et al. An optimized method to process mouse CNS to simultaneously analyze neural cells and leukocytes by flow cytometry [J]. J Neurosci Meth, 2015, 247: 23-31.

[8] 周竹娟, 郑健, 徐炎. 胎鼠皮质神经元细胞核的制备和鉴定[J]. 卒中与神经疾病(ZHOU Z J, ZHENG J, XU Y. Separation and identification of the karyoplasts of cortical neurons of embryonic rats [J]. Stroke and Nervous Diseases), 2007, 15(2): 98-102.

[9] 冯伟生, 阮成钧, 冯振卿, 等. 大量活性神经元细胞核的分离技术[J]. 中国组织工程研究与临床康复(FENG W S, RUAN C J, FENG Z Q, et al. Isolation technique for harvesting a great amount of active neuronal nuclei [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research), 2008, 12(29): 5788-92.

[10] 薛雅蓉, 刘常宏. 细胞生物学“半开放设计性实验”教学的意义与实施方法[J]. 实验技术与管理(XUE Y R, LIU C H. Teaching significance and implementation ways of “Half-Open-Designed Experiments” in cell biology [J]. Experimental Technology and Management), 2013, 30(8): 167-70.

[11] 张晶, 华子春. 细胞生物学课程体系优化的实践与思考[J]. 中国细胞生物学学报(ZHANG J, HUA Z C. Thought on teaching practice and reform in the course of cell biology [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2011, 33(6): 716-9.

[12] 林爱琴, 卜文婕, 高继光, 等. 大型仪器在医学细胞生物学实验教学中的应用[J]. 基础医学教育(LIN A Q, BU W J, GAO J G, et al. Application of large instruments in experimental teaching of medical cell biology [J]. Basic Medical Education), 2019, 21(12): 951-3.

[13] 杜莹, 贾连群, 宋囡, 等. 中医药院校大型仪器设备用于实验教学的探索[J]. 中国中医药现代远程教育(DU Y, JIA L Q, SONG N, et al. The exploration of using large scale instruments and equipment in the experimental teaching in university of traditional chinese medicine [J]. Chinese Medicine Modern Distance Education of China), 2019, 17(14): 17-9.