技术与方法

流式细胞仪分选转基因斑马鱼胚胎荧光标记 细胞的一种快速方法

王 新¹ 张素珍² 王学谦¹ 李丽萍¹ 张晶晶^{2*} 刘 东^{1*} ('南通大学, 江苏省神经再生重点实验室, 南通 226001; ²广东医学院附属医院, 湛江 524001)

摘要 荧光蛋白在特异组织和器官表达的转基因斑马鱼已经在发育生物学和疾病模型研究 中得到了广泛的应用。这些转基因系有助于追踪和分析数量较少的细胞群。但是如果要分离得到 这些细胞来定量分析mRNA或蛋白质的表达情况比较困难。利用流式细胞仪分选这些荧光标记细 胞是一种解决办法。此方法在不同的实验室中被广泛地应用,也有相关流程的介绍。但是流程一 般较为繁琐,操作比较困难。该文以从转基因斑马鱼Tg(Kdrl:EGFP)中分选绿色荧光蛋白阳性的血 管内皮细胞为例,介绍利用流式细胞仪分选转基因斑马鱼荧光标记细胞的实验流程和技术要点。 该文作者在前人工作的基础上结合大量的实验经验,发展并优化了一套操作简便、效率较高的流 程来分选这些细胞,在此做详细的介绍给大家以供参考。

关键词 转基因;分选;流式细胞仪;斑马鱼

Sorting the Florescence Positive Cells in Transgenic Zebrafish Embryo by Fluorescence-activated Cell Sorting

Wang Xin¹, Zhang Suzhen², Wang Xueqian¹, Li Liping¹, Zhang Jingjing^{2*}, Liu Dong^{1*} (¹Jangsu Key Laboratory of Neuroregeneration, Nantong University, Nantong 226001, China; ²Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, China)

Abstract The florescence proteins are used to specifically label organs, tissues or cell types in transgenic zebrafish reporter lines, which are extensively applied in developmental biology and disease modeling. They allow us to follow the several-labeled cells *in vivo*. In this paper, we introduced the procedure to sort the florescence positive cells in transgenic zebrafish embryo by fluorescence-activated cell sorting (FACs). Based on our experience of several experimental tests, this procedure was optimized to be very efficient and easy to handle.

Key words transgene; sorting; flow cytometry; zebrafish

Received: October 16, 2013 Accepted: November 28, 2013

收稿日期: 2013-10-16 接受日期: 2013-11-28

南通大学自然科学基金(批准号:12Z053)、国家自然科学基金(批准号:31201083、81102524)、江苏省自然科学基金(批准号:12KJB180010、BK2012228)和广东省自然科学基金(批准号:S2011040001478、S2012010008245)资助的课题

^{*}通讯作者。 Tel: 0759-2387140, E-mail: jj.zhang@gdmc.edu.cn; Tel: 0513-85051593, E-mail: liudongtom@gmail.com

This work was supported by the Natural Science Foundation of Nantong University (Grant No.12Z053), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31201083, 81102524), the Natural Science Foundation of Jiangsu (Grant No.12KJB180010, BK2012228) and the Natural Science Foundation of Guangdong (Grant No.S2011040001478, S201201008245)

^{*}Corresponding authors. Tel: +86-759-2387140, E-mail: jj.zhang@gdmc.edu.cn; Tel: +86-513-85051593, E-mail: liudongtom@gmail.com 网络出版时间: 2014-03-03 12:20 URL: http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.03.0333.html

斑马鱼是广泛用于研究组织和器官发育以及 相关疾病的良好的模式生物[1-3]。斑马鱼发育的早期 阶段通体透明,相对于小鼠等其他脊椎动物非常便 于观察和在体(in vivo)成像,特别是其内部组织以及 器官的结构[4]。近年来,多种遗传操作技术在斑马 鱼上得到应用和发展,例如基因表达下调技术、转 基因技术、基因组编辑技术、光遗传学技术等[5-6]。 特别是用荧光蛋白来特异性地标记斑马鱼的组织和 器官的转基因技术, 使这种模式生物更具有吸引力, 在研究中的作用更多。事实上,转基因斑马鱼已经 在生命科学研究的不同领域得到了广泛的应用。到 目前为止,荧光蛋白在特异的组织和器官表达的转基 因系已经达到数百种,囊括了大部分器官和系统,例 如,绿色荧光蛋白标记血管系统的Tg(kdrl:EGFP)^[7]、 红色荧光蛋白标记心脏的Tg(cmlc2:mCherry)^[8]、红色 荧光标记神经细胞的Tg(elavl3:mCherry)^[9]等。这些报 告基因转基因斑马鱼系有助于追踪和分析单个细胞 或数量较少的细胞群,例如一些组织和器官的前体细 胞。但是如果要分离得到这些细胞(特别是要求细胞 数量较大时)来定量分析信使RNA(mRNA)或蛋白质 的表达情况非常困难。利用流式细胞仪分选这些荧 光标记细胞是一种解决方法,此方法在不同的实验 室中被广泛的应用,也有相关流程的介绍[10-12]。但 是流程一般较为繁琐,操作比较困难。本文作者在 前人工作的基础上结合大量的实验经验,发展并优 化了一套操作简便、效率较高的流程来分选血管内 皮细胞,在本文中作详细的介绍,以供在转基因斑马 鱼胚胎中分选内皮细胞或其他细胞类型作参考。

1 材料与方法

1.1 斑马鱼

AB系斑马鱼以及Tg(Kdrl:EGFP)转基因系喂养和 杂交方案严格按照过去文献中的描述进行^[13-14]。收集 鱼卵培养于28.5℃胚胎培养液(胚胎培养液=60 µg/mL 海盐),根据形态特征区分发育阶段^[15]。

1.2 荧光显微成像和激光共聚焦显微成像

24 hpf和48 hpf的Tg(*Kdrl:EGFP*)斑马鱼胚胎用 egg water/0.16 mg/mL tricaine(Ms-222)/1% 1-phenyl-2thiourea(Sigma)麻醉后,包埋到1%的低熔点琼脂糖里 面(UltraPureTM Low Melting Point Agarose, Invitrogen)。 用Leica SP5(Leica Microsystems)激光共聚焦显微 20×镜头成像,图像处理用 Leica LAS AF lite(Leica Microsystems)软件。 细胞涂片用Zeiss Axioscope A1(Carl Zeiss MicroImaging)显微镜观察和成像。

1.3 流式细胞仪分选荧光标记细胞

在实验中采用The BD FACS Aria[™] I/II Cell Sorter(BD Biosciences)来分选绿色荧光标记细胞或 红色荧光标记细胞。在分选相关参数设定时,操作 按照仪器厂家的说明。

1.4 实时定量PCR分析

总RNA的提取使用Trizol(Invitrogen),并按照厂 家说明书进行。逆转录采用Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche)试剂盒,过程按照厂家 说明书进行。Taqman实时定量PCR的引物来自Life Technologies,实验流程参照之前的工作^[16]。

1.5 统计方法

文中所有实验重复3次以上,数据以均数±标准 误表示,应用SPSS 11.0进行统计分析。均值之间的 比较用*t*检验,*P*<0.05认为有统计意义。

2 结果

2.1 胚胎收集和去绒毛膜

收集AB系野生型斑马鱼以及Tg(Kdrl:EGFP)转 基因系胚胎,本实验选用胚胎的发育阶段为24 hpf(图 1),等胚胎到了期待的发育阶段大约半小时之前,将 胚胎转移到6孔板(BD Falcon[™] 6-well plates), 每孔大 约3 mL左右溶液, 放入100~250只胚胎, 用移液器或 胶头吸管吸去egg water。注意不要混淆egg water和 embryo medium, embryo medium一般用来培养去掉 绒毛膜的斑马鱼胚胎。然后加入含有0.5 mg/mL链 霉蛋白酶(pronase, Roche)的egg water, 对于24~48 hpf 的斑马鱼胚胎持续10~15 min。每隔1~2 min用1 mL 的移液器轻轻吹打,防止部分较早脱去绒毛膜的胚 胎消化过度黏在容器底部。约10 min后, 经过连续 几次上下吹打,大部分胚胎已经脱掉绒毛膜,不同的 斑马鱼品系所需时间稍有差异。之后用PBST溶液 清洗3次,再用无钙的任氏(Ringer)溶液清洗1次,之 后将去掉绒毛膜的胚胎转移到15 mL的Falcon Tube 中,24 h的胚胎每管大约放入300~400个,根据发育 的不同阶段可以适量增加或减少。

2.2 斑马鱼胚胎细胞分离及分选

每个15 mL的离心管(BD Falcon[™] Tube)中加入 10 mL浓度为0.25%的胰酶,每管大约含有300~400 个胚胎。将15 mL的离心管放置到28 ℃左右的环



绿色荧光蛋白标记的为血管内皮细胞。

The endothelial cells were labeled by GFP.





A: 细胞已经完全分离, 无多细胞黏连; B: 绿色荧光标记的为血管内皮细胞; C: 为A图和B图合并后结果。 A: showing cells were segregated; B: GFP+ cells were endothelial cells; C: merged image of A and B.





P4为绿色荧光蛋白阳性细胞, P5为绿色荧光蛋白阴性细胞。

P4 was GFP+ cell population, and P5 was GFP- cell population.

图3 流式细胞仪分选斑马鱼胚胎血管内皮细胞

Fig.3 Sorting the zebrafish vascular endothelial cells by FACs



kdrl在绿色荧光蛋白阳性细胞中的表达水平显著高于绿色荧光蛋白 阴性细胞; ftt1在绿色荧光蛋白阳性细胞中的表达水平显著高于绿色 荧光蛋白阴性细胞。*P<0.01, 与绿色荧光蛋白阴性细胞比较。 The expression level of kdrl in GFP+ cells was significantly higher than that in GFP- cells. The expression level of ftt1 in GFP+ cells was significantly higher than that in GFP– cells. *P<0.01 vs GFP– cells.

图4 分选后血管内皮细胞的kdrl和ftt1表达的 实时定量PCR分析 Fig.4 Real-time PCR analysis of kdrl and ftt1 expression in FACs sorted cells

境中(如:斑马鱼房),旋转混匀,此步骤中避免剧烈 震荡防止细胞破碎。每5 min用移液器上下吹吸溶 液。其中,24 hpf的胚胎大约需要在胰酶中处理1h, 48 hpf的胚胎大约需要在胰酶中处理2~3 h, 72 hpf的胚 胎大约需要在胰酶中处理3~4 h。为了提高细胞之间 分离的速度,可以让胰酶处理的胚胎溶液经过注射器 2~3次,常用10 mL或20 mL注射器,针头尺寸为外径 0.8~10.0 mm。之后通过黄色的细胞滤网(BD Falcon™ cell strainer, 100 µm)。4 ℃, 200 ×g离心10 min。去掉上清, 将沉淀细胞在500 µL胰酶+100 µL胎牛血清(FBS)中 重悬。4°C, 200 ×g离心10 min。可选步骤:将分离得 到的细胞在4%多聚甲醛中室温固定30 min。用1 mL或 2 mL 2%的FBS/PBS清洗沉淀细胞两次,将细胞悬浮 在1%的FBS/PBS。显微镜下检查确认细胞已经相互 分离为单个细胞(图2)。进行细胞计数,将细胞浓度 调整到5×105~5×107/mL。将悬浮的细胞通过蓝色滤 网(40 µm)到流式细胞仪专用的聚苯乙烯圆底试管 (BD Falcon[™], Round-Bottom Tube)。通过内皮细胞 表达的绿色荧光蛋白来分选得到斑马鱼胚胎内皮细 胞(图3)。在24 hpf的Tg(Kdrl:EGFP)胚胎中,一般分 选得到的内皮细胞占胚胎所有细胞的2%~3%左右。 在48 hpf的胚胎中,一般分选得到的内皮细胞占胚胎

所有细胞的6%~8%左右。分选所得细胞如果数量 比较少(少于10⁶),并且是用来提取RNA,可以直接分 选到Trizol(Invitrogen)中。

3 讨论

通过本流程可以有效地利用流式细胞仪分选 胚胎斑马鱼绿色荧光蛋白标记的血管内皮细胞。作 者在单次实验中,从24 hpf Tg(Kdrl:EGFP)转基因斑 马鱼胚胎中成功分选得到4×10°个绿色荧光蛋白标 记细胞。本流程同样也可以用来分选荧光蛋白标记 的其他组织的细胞类型,例如心肌细胞、肝脏细胞 等。本流程中有几个地方需要注意:(1)分选出的细 胞可以通过显微镜检查绿色荧光蛋白阳性细胞的 比例。如果绿色荧光蛋白阴性细胞的比例较高,可 以通过再次流式细胞仪进行二次分选。分选后,对 于血管内皮细胞可以进一步通过标志基因(如: kdrl 或者ft1)的表达来进行分析,本次分选的结果如图4, 结果说明:绿色荧光蛋白阳性细胞群中内皮细胞标 志基因表达远高于绿色荧光蛋白阴性细胞群,提示 分选成功;(2)胚胎在胰酶溶液中旋转消化的过程中, 特别是浓度比较大的时候,容易黏在一起。黏在一 起后需要用1 mL移液器来及时吹散,否则会影响细胞 分离的速度,从而最终影响细胞的活力;(3)在用流式 细胞仪分选之前必须通过显微镜检查确认细胞已经 彻底分离,否则容易出现两个或多个细胞黏在一起的 情况,从而会影响下一部分选细胞的纯度;(4)如果分 选后的细胞用来继续培养,可以通过增加吹打的次数 来减少胚胎在胰酶中处理的时间,根据我们的经验最 好控制在1h之内。同时在分选的时候速度不宜过快, 从而来提高细胞的活力; (5)在分选之前应检查细胞 的死亡率。死亡率较高时会减少抽提总RNA的量。

参考文献 (References)

- 1 Bradbury J. Small fish, big science. PLoS Biol 2004; 2(5): e148.
- 2 Rubinstein AL. Zebrafish: From disease modeling to drug discovery. Curr Opin Drug Discov Devel 2003; 6(2): 218-23.
- 3 Zon LI. Zebrafish: A new model for human disease. Genome Res 1999; 9(2): 99-100.
- 4 Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. Biol Rev Camb Philos Soc 2008; 83(1): 13-34.
- 5 Lawson ND, Wolfe SA. Forward and reverse genetic approaches for the analysis of vertebrate development in the zebrafish. Dev Cell 2011; 21(1): 48-64.
- 6 Kwan KM, Fujimoto E, Grabher C, Mangum BD, Hardy ME,

Campbell DS, *et al*. The Tol2kit: A multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. Dev Dyn 2007; 236(11): 3088-99.

- 7 Choi J, Dong L, Ahn J, Dao D, Hammerschmidt M, Chen JN. FoxH1 negatively modulates flk1 gene expression and vascular formation in zebrafish. Dev Biol 2007; 304(2): 735-44.
- 8 Palencia-Desai S, Kohli V, Kang J, Chi NC, Black BL, Sumanas S. Vascular endothelial and endocardial progenitors differentiate as cardiomyocytes in the absence of Etsrp/Etv2 function. Development 2011; 138(21): 4721-32.
- 9 Won Y, Ono F, Ikeda SR. Identification and modulation of voltage-gated Ca²⁺ currents in zebrafish Rohon-Beard neurons. J Neurophysiol 2010; 105(1): 442-53.
- 10 Covassin L, Amigo JD, Suzuki K, Teplyuk V, Straubhaar J, Lawson ND. Global analysis of hematopoietic and vascular endothelial gene expression by tissue specific microarray profiling in zebrafish. Dev Biol 2006; 299(2): 551-62.
- 11 Ma D, Zhang J, Lin HF, Italiano J, Handin RI. The identification and characterization of zebrafish hematopoietic stem cells. Blood

2011; 118(2): 289-97.

- 12 Manoli M, Driever W. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) of fluorescently tagged cells from zebrafish larvae for RNA isolation. Cold Spring Harb Protoc 2012; 2012(8): doi: 10.1101/ pdb.prot069633.
- 13 Huang Y, Wang X, Xu M, Liu M, Liu D. Nonmuscle myosin II-B (myh10) expression analysis during zebrafish embryonic development. Gene Expr Patterns 2013; 13(7): 265-70.
- 14 Jiang Q, Liu D, Gong Y, Wang Y, Sun S, Gui Y, et al. yap is required for the development of brain, eyes, and neural crest in zebrafish. Biochem Biophys Res Commun 2009; 384(1): 114-9.
- 15 Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev Dyn 1995; 203(3): 253-310.
- 16 Krueger J, Liu D, Scholz K, Zimmer A, Shi Y, Klein C, et al. Flt1 acts as a negative regulator of tip cell formation and branching morphogenesis in the zebrafish embryo. Development 2011; 138(10): 2111-20.