

技术与方法——流式细胞术专题

高活性小鼠大脑单细胞制备及流式细胞分选

吴佳瑜 邱琳*

(中国科学院上海营养与健康研究所, 上海 200031)

摘要 小鼠脑组织内含有各种神经细胞, 而大脑组织却十分脆弱。如何解离小鼠大脑组织并成功进行流式细胞分选以获得高活性、高纯度的细胞样本, 对后续研究大脑相关疾病的发病机制具有重要意义。该文从样本前处理到流式细胞分选全流程作了详细的阐述, 为后续单细胞测序和其他相关实验提供技术参考。

关键词 大脑; 单细胞; 制备; 高活性; 流式分选

Isolation and Flow Cytometry Sorting of High-Activity Single-Cell from Mouse Brain

WU Jiayu, QIU Lin*

(Shanghai Institute of Nutrition and Health, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Mouse brain tissue contains a variety of nerve cells, and the brain tissue is very fragile. How to dissociate the mouse brain tissue and successfully perform flow cytometry sorting to obtain high-activity and high-purity cell samples is of great significance for subsequent research on the pathogenesis of brain related diseases. In this paper, the whole process from sample pretreatment to flow cytometry sorting is described in detail, which provides technical references for subsequent single-cell sequencing and other related experiments.

Keywords brain; single-cell; isolation; high-activity; flow cytometry sorting

小鼠大脑是一个结构极其复杂的器官, 由多个区域构成, 是中枢神经系统的主要组成部分。不同大脑区域有着不同的功能, 负责处理不同的神经信号, 协同工作以保证小鼠身体运动和平衡的协调。大脑主要包括神经元和胶质细胞: 神经元通常由胞体、树突和轴突三部分组成; 胶质细胞主要包括星形胶质细胞、少量的突触胶质细胞和小胶质细胞。星形胶质细胞是一种呈放射形的大细胞, 该类细胞通常围绕神经元而分布, 且同脑血管紧密相连形成血脑屏障, 阻挡某些血液传播的病原或一些影响神经活性的化学物质进入, 例如多巴胺和去甲肾上腺

素进入血液后无法通过血脑屏障。小胶质细胞是一种形状小且不规则的胶质细胞, 主要在脑损伤中起吞噬和清除受损脑细胞的作用。髓鞘是一种包裹着神经元轴突的脂类物质, 对神经信号的电传递具有重要意义。研究小鼠大脑对揭示大脑结构和功能具有重要作用, 也为多发性硬化症、中风、阿尔茨海默病等神经系统疾病的治疗提供重要的实验基础^[1]。

流式细胞分选是指在流式细胞术检测细胞表型的基础上, 使用充电分选技术以实现多种特定表型细胞的分离, 具有分选参数多、群体多、纯度高、灵活性强等优势。分选所获得的细胞可进行体外培养, 以用于后续分子生物学研究。流式细胞分选是通过鞘液流形成的含有细胞的带电液滴而实现的, 在流式细胞分选仪流动室的喷嘴处装有一个高速振

收稿日期: 2023-08-28

接受日期: 2023-12-18

*通信作者: Tel: 021-54920936, E-mail: qiulin@sinh.ac.cn

Received: August 28, 2023

Accepted: December 18, 2023

*Corresponding author: Tel: +86-21-54920936, E-mail: qiulin@sinh.ac.cn

荡器, 该装置充电后以每秒几万次的振动频率使鞘液流成为上万个液滴, 如果检测到的细胞特性与要进行分选的细胞特性相符, 则仪器会在此细胞形成液滴时给整个液柱充以相应的电荷(对特定的目标细胞液滴带以正电荷或负电荷; 非目标细胞的液滴则不带电荷)。当充以不同电荷的含细胞的鞘液流经带有正负几千伏恒定电场的偏转板时, 其就根据自身所带的电荷性质产生偏差而落入各自的收集管中, 不带电荷的液滴就进入废液槽中, 从而实现细胞分选的目的。流式细胞分选仪带有压力, 会对细胞造成一定损伤, 因此活性不高的细胞在分选过程中可能会直接死亡。

小鼠大脑组织是机体最脆弱的组织, 消化解离成单细胞后活性不高。一直以来, 如何对小鼠大脑组织进行处理, 获得高活性、高质量的单细胞, 并成功进行流式细胞分选成为制约神经系统疾病研究进展的一个技术难题, 常遇到的问题包括细胞活性低、细胞背景不干净、细胞碎片多、细胞结团率高等。本文结合多年的样本制备和流式细胞前处理经验, 介绍如何获得高活性小鼠大脑单细胞样本。

1 实验材料及方法

1.1 实验动物

实验小鼠品系均为C57BL/6背景, 饲养于中国科学院上海营养与健康研究所动物平台。小鼠实验严格按照动物管理委员的指导进行, 小鼠饲养于SPF级饲养条件, 小鼠每天处于12 h光照和12 h黑夜交替环境中。本研究通过中国科学院上海营养与

健康研究所实验动物管理和使用委员会的批准(批准号: SINH-2022-XYC-1)。

1.2 主要仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 低温离心机购自ThermoFisher公司; 流式细胞分选仪BD FACS Aria II购自美国BD公司; Countstar细胞计数仪购自上海睿钰生物科技有限公司。

1.2.2 主要试剂 主要试剂如表1所示。

1.3 实验方法

1.3.1 溶液配制 组织消化液: 配制了两种浓度和成分的消化酶, 分别是配方1组和配方2组。配方1组是1 mg/mL木瓜蛋白酶、0.5 mg/mL透明质酸酶、150 μg/mL DNA酶I配制于DMEM溶液中, 配方2组是2 mg/mL木瓜蛋白酶和150 μg/mL DNA酶I配制于DMEM溶液中。

30% Percoll溶液配制: 先将Percoll原液按1:9稀释到100% Percoll溶液中, 再按比例稀释成30% Percoll。

1× 红细胞裂解液(RBC lysis buffer)配制: 取9 mL 10× RBC lysis buffer, 再加入81 mL双蒸水稀释至1× RBC lysis buffer的溶液。

1.3.2 采用两种配方消化酶制备小鼠大脑单细胞悬液 将C57小鼠麻醉后再将其四肢用针头固定, 用镊子夹起胸部皮肤, 从剑突处剪开胸腔的皮肤和肋骨, 暴露出心脏和肝脏。用剪刀将头剪下, 从剪断处沿着脑中缝将小鼠头骨剪开, 之后用镊子夹住头骨向两侧拨开, 取出小鼠大脑(6只), 去掉嗅球、中脑、小脑以及内部核团, 保留小鼠大脑皮层和海马部分, 质量为0.38 g±0.05 g。将小鼠组织分为两组, 每组3

表1 主要试剂
Table 1 The major reagents

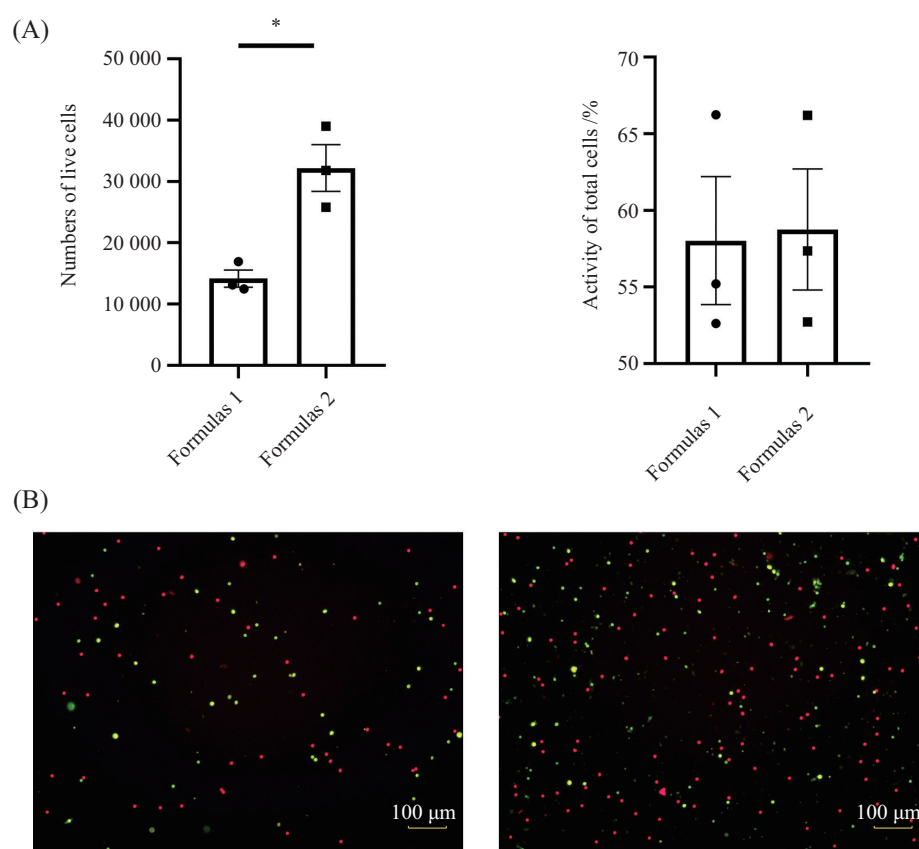
试剂名称 Name of reagent	厂家 Company	货号 Product code
Papain	Sigma	P4762
DNase I	Sigma	DN25
DMEM	Gibco	11965-092
10× PBS	Sangon Biotech	E607016
Cell staining buffer	Biolegend	420201
DAPI	Beyotime	C1002
Percoll	GE	17-0891-02
HBSS	Hyclone	SH30031.02
RBC lysis buffer (10×)	Biolegend	420301

只,分为消化酶配方1组和配方2组。将每个组织放在5 mL圆底离心管中,用剪刀快速剪切成2~3 mm³的小块,置于冰上,用于后续消化^[2]。各组每个样本加入2 mL消化液,放于紫盖消化管(Miltenyi公司)内,置于全自动组织消化器(Miltenyi公司),采用37C-M-LIDK-1程序,该程序转速为930 ×g,消化15 min后停止消化,可见消化液已变浑浊,并加入等体积完全培养基终止消化。消化后细胞的悬液再用40 μm滤网过滤,最后用1 mL注射器活塞轻轻转动按压,辅助过滤。

过滤好的单细胞悬液,置于水平转子的离心机内,4 °C、450 ×g离心5 min,弃去上清。加入2 mL HBSS重悬细胞沉淀,4 °C、450 ×g离心5 min,弃去上清。取15 mL离心管,再加入4 mL 30% Percoll溶液,重悬细胞沉淀,4 °C、600 ×g离心15 min,可见上层漂浮白色髓鞘组织,下层是细胞沉淀,用移液枪轻轻转动吸弃上清及髓鞘组织。再加5 mL PBS重悬

沉淀,4 °C、450 ×g离心5 min。加入1× 红细胞裂解液2 mL,室温作用10 min,加入2 mL PBS终止裂解,4 °C、450 ×g离心5 min,弃去上清,加入200 μL PBS重悬细胞,混匀后取10 μL,加入10 μL AO/PI染料,混匀后滴入细胞计数板的小室内,插入到细胞计数仪Countstar读板仓内,可根据染料结合情况得到细胞活性和浓度数值。

1.3.3 流式细胞分选 根据不同配方消化酶的结果可知,活细胞得率高的是配方2组。为了进一步提高细胞活性达到单细胞测序(10× Genomics)的活性要求并减少碎片的产生,可通过流式细胞分选提高其活性。加入核酸染料DAPI,使其终浓度为1 μg/mL,DAPI阴性为活细胞,作为流式分选的依据。流式细胞仪器准备:打开仪器面板电源,将6 L无菌1× PBS加入到鞘液桶内。执行开机程序,待鞘液液滴稳定后,调节流式细胞仪的液滴延迟(drop



A: 活细胞数量和总细胞活性,数据以3次独立实验的平均值±标准差表示,* $P<0.05$ 。B: AO/PI染色特征性图片,绿色代表活细胞,红色代表死细胞。

A: the number of live cells and the activity of the total cells, values are expressed as $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments, * $P<0.05$. B: characteristic images after staining with AO/PI, green represents live cells, and red represents dead cells.

图1 两种配方酶消化后活细胞数量、细胞活性和形态图片

Fig.1 The number of live cells, cell viability and morphology after enzyme digestion of the two formulas

delay)。准备一管 AccudropBeads, 上样速度范围是 800~1 500 events, 点击自动计算 drop delay 的按钮, 设备计算 drop delay。点击液流监控按钮, 让仪器自动监控液流变化。流式分选仪器喷嘴选择: 100 μm , 液流频率 30.2 kHz, 振幅 7.4 Volts, 上样速度 1 000~1 500 events/s, 采用两路分选模式。上样液体选择流式细胞染色液, 细胞浓度 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 收集管采用 1.5 mL EP管, 分选完毕后, 将细胞分成两份。一份用于上流式细胞分选仪回测, 另一份加入 AO/PI 染料, 用细胞计数器进行活性检测。

2 实验结果

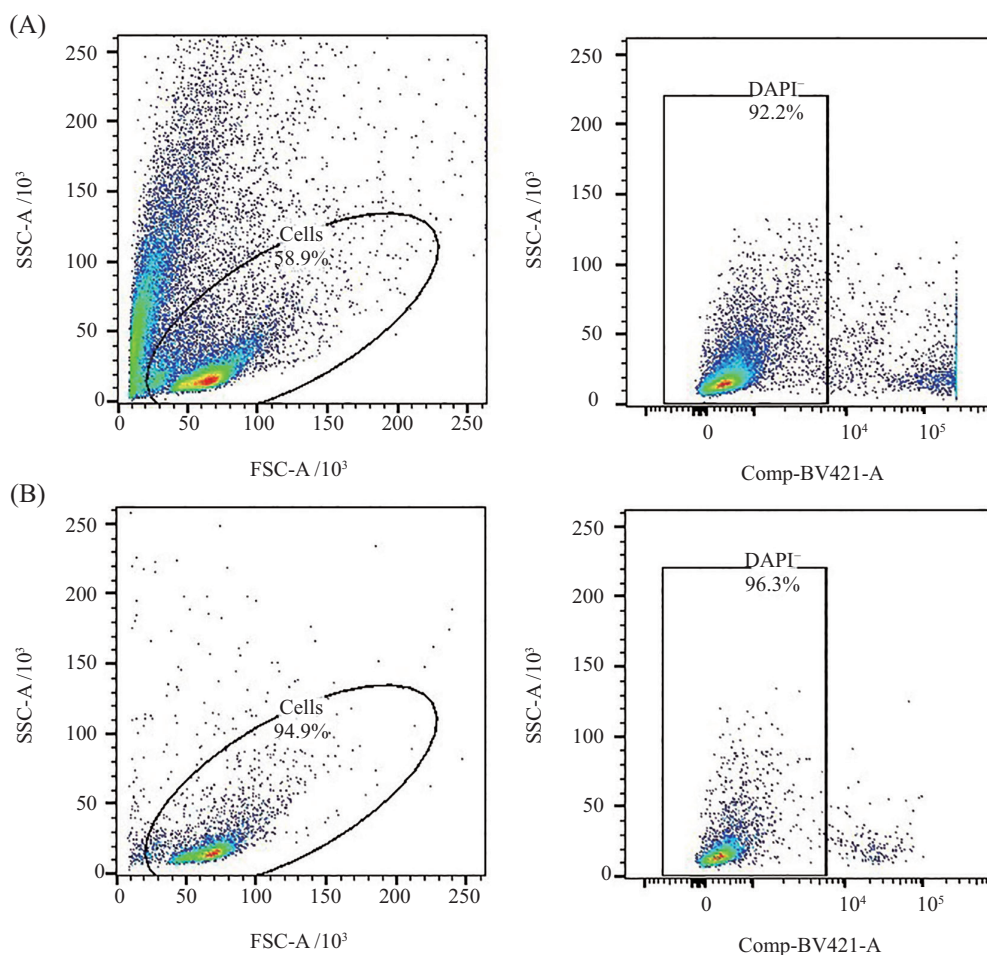
2.1 两种配方酶的消化效果比较

分别用配方1组和配方2组两种组合酶消化, 细

胞悬液与 AO/PI 荧光染料混合, 比较消化后的活细胞数量和细胞活性。如图 1A 所示, 配方 1 组消化后活细胞总数均值为 14 180, 活性均值为 58.03%, 配方 2 组活细胞总数均值为 32 200, 活性均值为 58.76%, 两种组合细胞总数具有显著性差异 ($P < 0.05$) 而活性差异不明显, 因而选择配方 2 组的消化方法。

2.2 流式分选结果对比

组织解离完的样本经流式细胞分选仪分选的目的是去除碎片和死细胞, 达到单细胞测序的活性要求。因为大脑组织细胞种类复杂, 细胞大小不一致。如图 2A 左图 FSC-SSC 显示图中有 2 个群体, 已知侧向散射角(side scattering, SSC)高的一群是细胞活性较差, 接近凋亡的细胞群。右下区域前向散射角(forward scattering, FSC)中等、侧向散射角(SSC)



A: 分选前FSC-SSC图里细胞比例是58.9%, 活细胞(DAPI⁻)比例是92.2%, B: 分选后细胞比例是94.9%, 活细胞(DAPI⁻)比例是96.3%。

The percentage of cells in the FSC-SSC plot before sorting was 58.9%, and the percentage of live cells (DAPI⁻) was 92.2% (A), and the percentage of cells after sorting was 94.9%, and the percentage of live cells (DAPI⁻) was 96.3% (B).

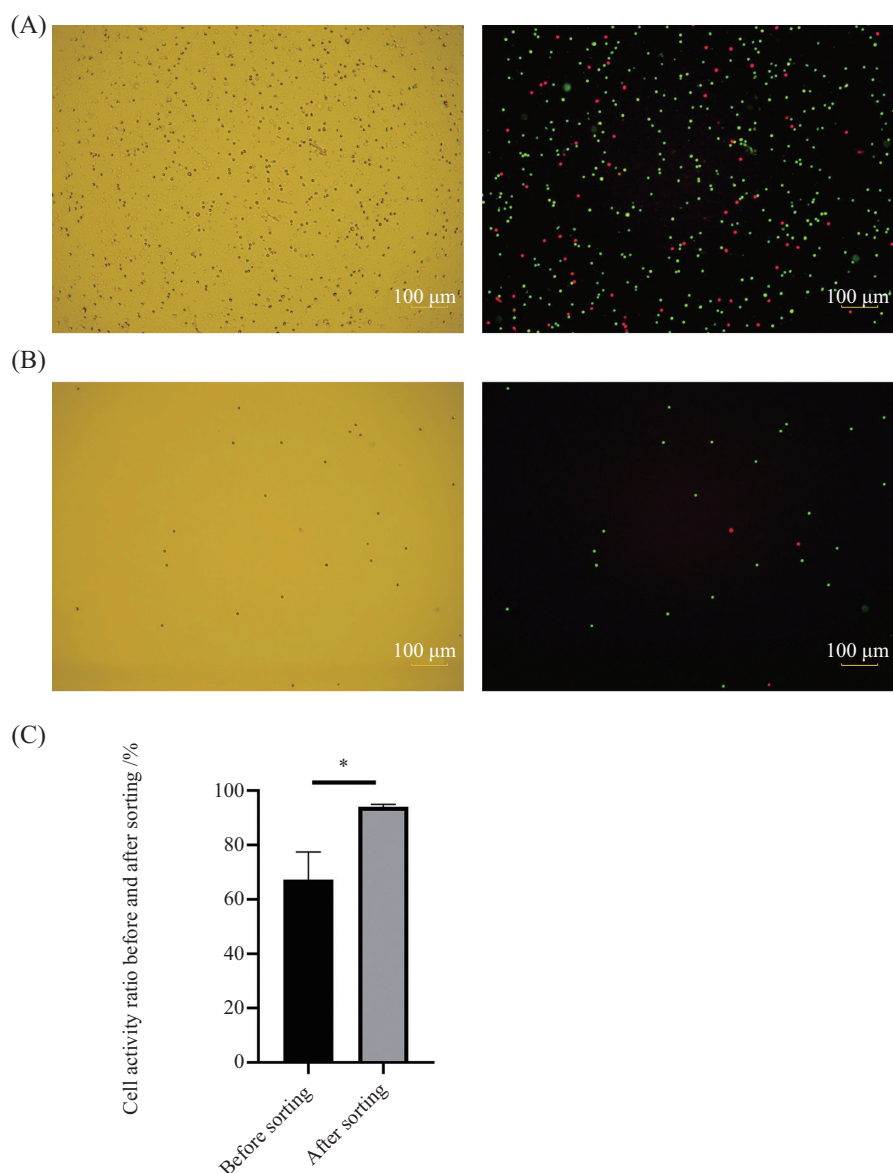
图2 流式细胞分选前后细胞活性对比

Fig.2 Comparison of cell activity before and after flow cytometry sorting

较小的细胞群体为状态较好的活细胞,分选后细胞重新返回流式细胞仪器回测也证明是此群细胞,而且侧向散射角高的即活性不好的细胞和左下角区域内细胞碎片也被流式分选去除。DAPI染色阴性细胞群为活细胞,分选前活细胞比例为92.2%,分选后活细胞比例为96.3%,证明分选是提高活性、去除碎片和死细胞的较好方法,可达到预期效果。

2.3 流式分选前后荧光细胞计数仪计算结果对比

因为流式分选后要进行10× Genomics单细胞测序,该测序技术基于油包水原理,对细胞形态要求规则圆润,且细胞碎片的数量要少,因此用细胞计数仪进行计数和拍照验证流式分选的效果(图3A和图3B)。其中,分选前细胞活性均值为72.92%,分选后细胞活性均值为93.45%,说明流式分选可明显提高



A: 流式分选前细胞形态, 左图为明场, 右图为AO/PI染色, 绿色代表活细胞, 红色代表死细胞; B: 流式分选后细胞形态, 左图为明场, 右图为AO/PI染色, 绿色代表活细胞, 红色代表死细胞; C: 分选前后荧光细胞计数仪统计的活性比例, 分选前活细胞比例为72.92%, 分选后活细胞比例为93.45%。数据以3次独立实验的平均值±标准差表示, * $P < 0.05$ 。

A: cell morphology before flow sorting, the left picture is the bright field, the right picture is the photo after staining by AO/PI, green represents live cells, and red represents dead cells; B: cell morphology after flow sorting, the left picture is the bright field, the right picture is the photo after staining by AO/PI, green represents live cells, and red represents dead cells; C: cell activity ratio before and after sorting calculated by fluorescence counter, the percentage of live cells before sorting is 72.92%, and the percentage of live cells after sorting is 93.45%. Values are expressed as $\bar{x} \pm s$ of three independent experiments, * $P < 0.05$.

图3 荧光计数仪检测流式分选前后细胞形态、细胞活性比例

Fig.3 Cell morphology and cell activity ratio before and after flow sorting detected by fluorescence counter

细胞活性, 具体见图3C。

3 讨论

小鼠大脑单细胞制备的方法分为机械法和酶解法两大类, 机械法快速简便, 但死细胞和碎片较多, 不适用于后续对细胞形态和活性要求高的单细胞测序实验, 酶解法里常用的酶是胶原酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、DNA酶^[3], 采用不同种类酶的组合、浓度及消化时间, 决定了大脑组织解离后细胞的活性和得率。本次实验根据文献[1]探索了两种不同配方酶的浓度和种类, 发现木瓜蛋白酶和DNA酶的组合是获得高活性单细胞的最佳配合, 细胞得率和活性较高。消化后的细胞及产生的碎片经过Percoll纯化可以去除。此外, 与30%~70%双层Percoll相比, 30%单层Percoll的细胞得率高, 且能去掉上层的髓鞘和碎片^[4]。

流式细胞分选仪市场上机型众多, 该文使用的是BD FACS Aria II流式细胞分选仪, 采用的是石英杯激发模式, 液流性能稳定, 灵敏度高。实验结果显示, 分选后纯度也较高。

本文采用了两种方法进行分选前后的活性鉴定, 即细胞计数仪AO/PI染色法和流式细胞DAPI阴性法, 两种方法检测的比例绝对值有所不同, 但趋势相同, 即经过流式细胞分选后活细胞比例提高。活细胞比例绝对值不同是因为两种方法的原理不同造成的。

该方法完整阐述了制备小鼠大脑单细胞以及流式细胞分选的过程, 实验结束后采用流式细胞仪回测和用细胞计数仪计数拍照, 结果显示细胞活性高, 细胞形态完整, 证明该方法稳定可靠, 可以作为一个较好的技术手段, 用于脆弱样本小鼠大脑的分离提取以获得高活性的细胞, 用于下游的单细胞测序技术。

——致谢

感谢中国科学院上海营养与健康研究所肖意传研究员对本研究中的动物实验的指导。感谢中国海洋大学医药学院刘明教授对文章写作的指导。

参考文献 (References)

- [1] GRABERT K, MCCOLL B W. Isolation and phenotyping of adult mouse microglial cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1784: 77-86.
- [2] CALVO B, RUBIO F, FERNÁNDEZ M, et al. Dissociation of neonatal and adult mice brain for simultaneous analysis of microglia, astrocytes and infiltrating lymphocytes by flow cytometry [J]. *IBRO Rep*, 2020, 8: 36-47.
- [3] CARDONA A E, HUANG D, SASSE M E, et al. Isolation of murine microglial cells for RNA analysis or flow cytometry [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(4): 1947-51.
- [4] HERRON S, DELPECH J C, MADORE C, et al. Using mechanical homogenization to isolate microglia from mouse brain tissue to preserve transcriptomic integrity [J]. *STAR Protoc*, 2022, 3(4): 101670.