

# 小鼠造血干细胞的流式分析

陈琳 李晶晶 周波\*

(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 细胞生物学国家重点实验室, 上海 200031)

**摘要** 造血干细胞极为稀少, 约占骨髓中所有有核细胞的0.01%。几十年来, 如何从骨髓中分离造血干细胞一直是研究的焦点问题。流式细胞术在识别和分离造血干细胞及祖细胞中起着关键性的作用。三十年间, 有多种不同的细胞标志物和分离手段用于小鼠骨髓中造血干细胞的分析和分选。该文对所有分离策略作了分类总结, 并详细介绍了现在认可度最高且应用最广泛的造血干细胞的分离方法: SLAM家族分离策略。然而, 仅仅对造血干细胞进行体外的流式分析并不能完整描述造血干细胞在体内的行为特征。谱系示踪技术弥补了这一不足。该文使用 $\alpha$ -catulin<sup>GFP</sup>和 Fgd5-CreERT2; Rosa26-Tomato小鼠详细说明了如何使用流式细胞仪来分析和量化造血干细胞中的报告荧光蛋白信号。

**关键词** 造血干细胞; 流式细胞术; 骨髓

## Flow Cytometric Analysis of Mouse Hematopoietic Stem Cells

CHEN Lin, LI Jingjing, ZHOU Bo\*

(State Key Laboratory of Cell Biology, Center for Excellence in Molecular Cell Science,  
Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract** Hematopoietic stem cells represent a rare population with an estimated frequency of 0.01% of total nucleated cells in bone marrow. Isolating and separating HSCs from bone marrow has been the focus of intense investigation for decades. Flow cytometry has been critical in establishing methods to isolate and identify hematopoietic stem cells and their progenitors. For more than 30 years, researchers have been uncovering and combining emerging markers used for improving the purification of hematopoietic stem cells from mouse bone marrow. This article summarizes all the phenotypic markers and strategies used to purify HSCs and details the most acknowledged and widely adopted SLAM family isolation protocol. However, *in vitro* flow cytometric analysis of hematopoietic stem cells does not provide a true description of the behavior of HSCs in their native physiological state. The application of genetic lineage tracing in HSCs has bridged the gap. This article uses  $\alpha$ -catulin<sup>GFP</sup> and Fgd5-CreERT2; Rosa26-Tomato mice to detail instructions on how to use flow cytometry to analyze and quantify reporter fluorescent protein signals in HSCs.

**Keywords** hematopoietic stem cells; flow cytometry; bone marrow

收稿日期: 2021-07-21 接受日期: 2021-09-22

国家自然科学基金面上项目(批准号: 81730006)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 021-54921123, E-mail: bo.zhou@sibcb.ac.cn

Received: July 21, 2021 Accepted: September 22, 2021

This work was supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (Grant No.81730006)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-54921123, E-mail: bo.zhou@sibcb.ac.cn

造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)是血液系统中的成体干细胞,有着长期自我更新的能力和分化成各类成熟血细胞的潜能。它是目前研究历史最长且最为深入的一类成体干细胞。HSC的研究对其他干细胞,包括肿瘤干细胞,都有着重要的指导意义。

小鼠成体HSC通常定植于骨髓中,占有骨髓细胞的0.01%。利用流式细胞仪,我们可以分析并分离出HSC。目前利用流式细胞仪鉴定HSC的两类策略都是基于HSC本身的特征,一是使用组合抗体来确定HSC,二是利用HSC本身的生理特性,例如某些荧光染料的高排出性来确定HSC。

组合抗体方案主要基于Lineage、Sca-1和c-Kit标记,也就是“LSK”(Lineage<sup>-</sup>、Sca-1<sup>+</sup>和c-Kit<sup>+</sup>)群体<sup>[1-2]</sup>。Lin(Lineage)系列抗原主要表达于骨髓成熟血系细胞中, Lin负选择可以去除绝大部分的成熟血系细胞。Sca-1主要表达于骨髓HSC和髓系细胞中, c-Kit主要表达于造血干/祖细胞中。LSK细胞约占所有骨髓细胞的0.1%,其中绝大部分是造血祖细胞(hemopoietic progenitor cell, HPC),且HSC约占LSK的10%。后续引入了多种不同的表面抗体如CD34<sup>[3]</sup>、Tek<sup>[4]</sup>和EPCR<sup>[5]</sup>,以区分HSC和分化祖细胞。

SLAM(signaling lymphocyte activation molecule)家族的蛋白包括CD150、CD48和CD244,它们可用于明确区分HSC和HPC。其中CD150特异性表达于有长期造血重建能力的HSC中,而CD48阳性的细胞无长期造血能力,所以使用Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>CD48<sup>-</sup>的抗体组合可以特异性标记出高纯度的HSC<sup>[6]</sup>。

SLAM家族分离策略是目前使用最广泛且认可度最高的流式细胞仪分析和分离策略。本文详细讲解了如何使用SLAM系列抗体对HSC进行分离。此法标记的HSC可以用于细胞周期分析、凋亡等实验,也可以在分选后用于体外克隆、移植等实验。

另一类策略是根据HSC对某些荧光染料如DNA结合染料Hoechst 33342<sup>[7]</sup>或线粒体结合染料Rhodamine123<sup>[8]</sup>的高排出性来识别HSC。HSC表面高表达多种转运体,例如ATP结合盒转运蛋白[ATP-binding cassette (ABC) transporters],而转运体可以持续泵出荧光染料。骨髓细胞经Hoechst 33342染色后,在紫外光激发下,会产生蓝色和红色波长信号,而HSC会

因为低Hoechst 33342染料保留,形成“边群”。但是多种转运体的表达是随着年龄增长而逐渐获得的,因此在幼龄小鼠中很难检测到这一边群。

从体内分离HSC后进行移植实验,充分证实了HSC的存在,阐明了HSC具有自我更新和多谱系分化的能力,并解释了HSC的异质性。但是这些HSC都是体外分选获得且在非生理的移植情况下分析的<sup>[9]</sup>。移植引入了一个重要的变数,即把细胞从原生的骨髓环境中分离出来,然后归巢定植。实际上,在正常生理稳态下,HSC离开骨髓后并不会主动回到骨髓。而且我们为保证移植的有效性,常使用辐照后的小鼠作为受体。而辐照加剧了非生理的特性,使小鼠偏离了生理状态<sup>[10]</sup>。此外,移植后对HSC性质和功能进行的分析,缺少了实时性。

仅仅使用表面抗体或染料并不能在生理状态下分析和量化HSC。转基因技术(Transgenic, Tg)和基因敲入技术(knock-in, KI)提供了新的策略。我们可以直接将荧光蛋白序列引入特异的启动子后,这样目标细胞群体会直接表达荧光蛋白信号;也可以将位点特异性重组酶,如Cre重组酶<sup>[11]</sup>引入目的基因型启动子后,再配合报告基因小鼠,这样就可以对目的细胞群体及其子代进行示踪。如果使用可诱导型重组酶,例如CreER变体(Cre和Estrogen receptor的融合蛋白)<sup>[12]</sup>,改变诱导剂他莫昔芬的注射时间,则可以观测到细胞在不同时间的增殖和分化情况。

一个成功的谱系示踪系统应同时兼具良好的特异性和高效率。首先,Cre重组酶最好只表达于我们感兴趣的干祖细胞,而不是下游细胞中。其次,目的基因必须在HSC中有高的标记效率。很遗憾的是,现有的谱系示踪系统很少能兼具以上两种特征,我们通常需要做出权衡。目前已经构建了多种不同的HSC特异性的Tg或KI小鼠模型(表1)。但是,特异性很好的基因,如*Cttnal1*<sup>[13]</sup>、*Hoxb5*<sup>[14]</sup>、*Tek*<sup>[15-16]</sup>、*Krt18*<sup>[17]</sup>,一般都是低效率的,而标记效率较高的基因*Fgd5*<sup>[17-18]</sup>、*Pdzk1ip1*<sup>[19]</sup>、*Mds*<sup>[20]</sup>又不完全特异。另外还有一些基因如*Vwf*<sup>[17,21]</sup>、*Gprc5c*<sup>[22]</sup>直接反映了造血异质性,它们可优先标记HSC的一些亚群。除了使用特异性的基因来对一整群HSC进行标记和示踪外,最近还发展出在每个细胞内生成独特的DNA/蛋白质条形码来对HSC进行示踪的新技术<sup>[23-24]</sup>。

这里我们分别选择了 $\alpha$ -catulin<sup>GFP</sup>(KI)和*Fgd5-CreERT2*; *Rosa26-Tomato*(KI)来展示它们对HSC的

表1 造血干细胞直接标记和系谱追踪的小鼠模型

Table 1 Mouse model for labeling and lineage tracing of HSC

基因	构建策略	对HSC的标记效率	表达谱
Gene	Construction strategy	Labeling efficiency in HSCs	Expression pattern
<i>Vwf</i>	BAC Tg: EGFP <sup>[21]</sup>	About 60%	HSC, Mk, EC
<i>Fgd5</i>	KI: mCherry <sup>[18]</sup>	About 80%	HSC, EC
<i>Cttnl1</i>	KI: GFP <sup>[13]</sup>	About 50%	HSC, EC
<i>Hoxb5</i>	KI: tri-mCherry <sup>[14]</sup>	About 22%	HSC
<i>Pdzk1p1</i>	BAC Tg: EGFP <sup>[19]</sup>	About 27%	HSC
<i>Tek</i>	Tg: GFP <sup>[16]</sup>	About 5%	HSC and other cells
<i>Gprc5c</i>	BAC Tg: EGFP <sup>[22]</sup>	About 28%	HSC
<i>Mds</i>	KI: GFP <sup>[20]</sup>	About 12%	HSC, MPP, MkP
<i>Fgd5</i>	KI: CreERT2 <sup>[18]</sup>	About 30%, tdTomato	HSC, EC
<i>Krt18</i>	Tg: CreERT2 <sup>[17]</sup>	About 2%, YFP	HSC
<i>Pdzk1p1</i>	BAC Tg: CreERT2 <sup>[19]</sup>	About 20%-30%, tdTomato	HSC
<i>Tek</i>	KI: Mer-Cre-Mer <sup>[15]</sup>	About 0.5%, YFP	HSC and other cells
<i>Vwf</i>	KI: CreERT2 <sup>[17]</sup>	About 12%, tdTomato	HSC, Mk, EC

CreERT2: 融合了T2突变体雌激素受体配体结合域的Cre重组蛋白; EC: 内皮细胞; EGFP: 增强型绿色荧光蛋白; GFP: 绿色荧光蛋白; KI: 基因敲入; Mk: 巨核细胞; MkP: 巨核细胞祖细胞; MPP: 多能祖细胞; Tg: 转基因; YFP: 黄色荧光蛋白。

CreERT2: Cre recombinase fused to estrogen receptor ligand-binding domain with T2 mutation; EC: endothelial cell; EGFP: enhanced green fluorescent protein; GFP: green fluorescent protein; KI: knock-in; Mk: megakaryocyte; MkP: megakaryocyte progenitor; MPP: multipotent progenitor; Tg: transgenic; YFP: yellow fluorescent protein.

标记和示踪情况。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 实验动物

$\alpha$ -catulin<sup>GFP</sup>(JAX#028342)、*Fgd5-CreERT2*; *Rosa26-Tomato*(JAX#027789)成体野生型小鼠均来自美国杰克逊实验室, 它们都被维持在C57BL/6J遗传背景。实验小鼠饲养地点为中国科学院分子细胞科学卓越创新中心的SPF级屏障设施。饲料为辐照除菌后的商品化无菌饲料(货号: 10100100), 由江苏协同医药生物工程有限责任公司提供。饮水为去离子水, 加盐酸调pH值至2.8~3.0, 然后经高温高压除菌后备用。动物实验方案经过中国科学院分子细胞科学卓越创新中心实验动物管理委员会审批(批准号: SIBCB-S372-1901-005)。

### 1.2 主要试剂和仪器

胎牛血清(fetal bovine serum)(货号: FSP500)购自ExCell Bio公司; 20×磷酸缓冲液(20×PBS)(货号: B548117)购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 75%乙醇(货号: G73537W)购自上海泰坦化学有限公司; 流式抗体如表2所示。

剪刀、镊子、23/25G注射器、5 mL流式管(Falcon® Round Bottom Polystyrene Tubes)(货号: 352008)购自美

国Life Sciences公司。

低温离心机(5804R、5424R)购自美国Eppendorf公司; 流式细胞分析仪(FACS Fortessa)和流式细胞分选仪(FACS SORP Aria)均购自美国BD公司; 涡旋混合器(VORTEX-2)购自美国Scientific Industries公司。

### 1.3 小鼠骨髓细胞制备

首先利用二氧化碳麻醉或颈椎脱臼处死小鼠。使用75%乙醇喷淋小鼠, 在下腹部剪开毛皮, 暴露出腿部肌肉。剪断小鼠髌关节与踝关节, 将小鼠腿部小心取出, 使用无尘纸将骨骼外肌肉剥离, 并将剥好的骨骼浸泡于冰上的PBS中。通过徒手去除髌骨, 获得股骨与胫骨, 然后用剪刀将远端端剪去, 注意不可破坏骨结构。

使用23/25G针头从近端端旋转入针, 若未去除髌骨则可能导致入针困难, 用FACS缓冲液(1×PBS, 2%胎牛血清)将骨髓完整吹至无菌的4 mL离心管中, 并用注射器反复吹吸打散细胞至无明显的骨髓组织团块。对每根骨头, 可以重复操作几次, 以确保所有骨髓细胞都已吹出。一只小鼠的骨髓细胞总数约为10<sup>8</sup>个。对HSC的分析至少需要10<sup>6</sup>个细胞。通过100 μm滤膜将骨髓过滤到干净的5 mL流式管中, 该过程应在冰上进行, 以保证细胞状态。在预

冷的低温离心机中1 500 r/min、4 °C离心5 min, 使用真空泵将上清去除, 并用FACS缓冲液将细胞重悬定容至100  $\mu$ L。

#### 1.4 细胞流式抗体染色

首先按照质量比制备Lineage混合液(表3), 然后按照表4添加抗体混合液, 抗体染色方案可以按需调

表2 流式抗体  
Table 2 Flow cytometry antibody

抗体 Antibody	荧光基团 Fluorophores	克隆号 Clone	浓度 Concentration
Ter119	FITC	Ter-119	0.5 mg/mL
CD3	FITC	17A2	0.5 mg/mL
CD5	FITC	53-7.3	0.5 mg/mL
CD8a	FITC	53-6.7	0.5 mg/mL
B220	FITC	RA3-6B2	0.5 mg/mL
Gr1	FITC	RB6-8C5	0.5 mg/mL
Ter119	APC780	Ter-119	0.2 mg/mL
CD3	APC780	145-2C11	0.2 mg/mL
CD5	APC780	53-7.3	0.2 mg/mL
CD8a	APC780	53-6.7	0.2 mg/mL
B220	APC780	RA3-6B2	0.2 mg/mL
Gr1	APC780	RB6-8C5	0.2 mg/mL
CD117 (c-Kit)	APC-cy7	2B8	0.2 mg/mL
CD117 (c-Kit)	BV421	2B8	50 $\mu$ g/mL
Sca-1 (Ly6a)	PerCP-cy5.5	E13-161.7	0.2 mg/mL
CD48	APC	HM48-1	0.2 mg/mL
CD150 (SLAM)	PE	TC15-12F12.2	0.2 mg/mL
CD150 (SLAM)	BV605	TC15-12F12.2	100 $\mu$ g/mL
CD150 (SLAM)	Biotin	TC15-12F12.2	0.5 mg/mL
Streptavidin	BV650	None	0.1 mg/mL

表3 Lineage混合液配比  
Table 3 Lineage mix ingredient ratio

抗体 Antibody	克隆号 Clone	质量比 Weight ratio
Ter119	Ter-119	4
CD3	17A2	2
CD5	53-7.3	2
CD8a	53-6.7	2
B220	RA3-6B2	2
Gr1	RB6-8C5	1

表4 SLAM家族分离策略  
Table 4 SLAM family isolation protocol

抗体 Antibody	克隆号 Clone	荧光标记 Fluorophores	抗体用量(ng/1 $\times$ 10 <sup>6</sup> 个细胞) Dosage of antibody (ng/1 $\times$ 10 <sup>6</sup> cells)
Lineage mix	—	FITC	600
CD117 (c-Kit)	2B8	APC-cy7	100
Sca-1 (Ly6a)	E13-161.7	PerCP-cy5.5	200
CD48	HM48-1	APC	100
CD150 (SLAM)	TC15-12F12.2	PE	200

“—”表示多种抗体的混合液, 详细信息见表3。

“—” represents the mixture of multiple antibodies, and the detailed information is shown in Table 3.

整, 并且每一个通道需要准备对应的同型抗体对照管和单标管用于调节补偿。

将细胞于冰上避光孵育30 min, 每隔5~10 min 振摇一次, 避免细胞死亡结团。一抗孵育结束后, 添加5 mL FACS缓冲液终止染色, 在低温离心机中1 500 r/min、4 °C离心5 min, 使用真空泵将上清去除。用FACS缓冲液将细胞重悬定容至100  $\mu$ L, 添加二抗。将细胞于冰上避光孵育30 min, 每隔5~10 min 振摇一次, 避免细胞死亡结团。

所有染色结束后添加5 mL FACS缓冲液终止染色, 在低温离心机中1 500 r/min、4 °C离心5 min, 弃上清。

用添加DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)的FACS缓冲液(1 ng/mL)重新悬浮细胞至需要的浓度, 流式分析细胞浓度通常为 $10^6$ 个/mL。需注意DAPI染料激发光波长为405 nm, 发射峰在350~470 nm, 在大部分流式细胞仪中和BV421共通道, 使用时应避免冲突。因为长时间孵育过程持续伴随细胞死亡, 会导致团块形成, 需要再次使用100  $\mu$ m的滤网将细胞过滤到干净的5 mL流式管中。在流式细胞仪中利用单标抗体管调节补偿, 然后对试验管进行数据收集。

## 2 结果

### 2.1 野生型小鼠HSC流式分析和分选策略

SLAM家族分离策略将HSC定义为Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>CD48<sup>-</sup>的细胞。首先使用Lineage系列抗原排除骨髓中成熟的血系细胞。c-Kit主要表达在造血干祖细胞上, Sca-1表达于小鼠骨髓HSC和髓系细胞, 所以Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>已经可以用于确定绝大部分造血干祖细胞。CD150特异表达于拥有长期造血重建

能力的HSC中。而CD48标记的细胞则无长期造血能力, 为HPC。CD150<sup>-</sup>CD48<sup>+</sup>的细胞被定义为多能祖细胞(multipotent progenitor, MPP)。

抗体及对应荧光基团的组合请参见表4, 操作步骤可参见上面的实验方法, 流式分析或分选的圈选(Gating)策略见图1。使用SLAM分离策略, 可在每百万小鼠骨髓细胞中分离出50~100个HSC。

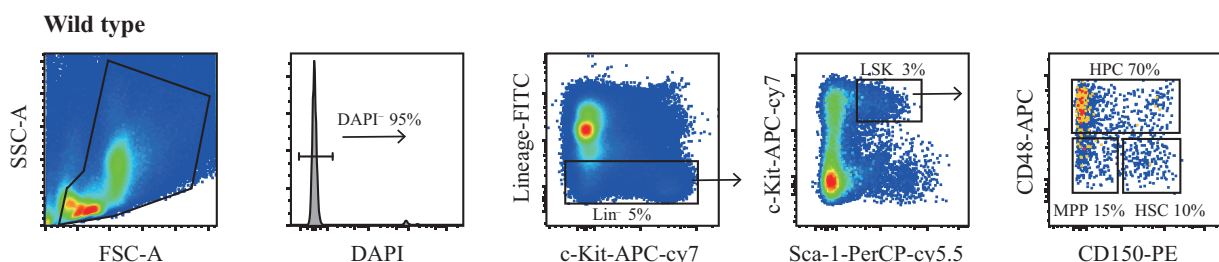
### 2.2 带荧光标记的HSC的流式分析和分选策略

使用成年 $\alpha$ -catulin<sup>GFP</sup>小鼠制备骨髓细胞, 可以进一步富集HSC。如图2所示, 对骨髓细胞进行SLAM抗体染色, 圈取Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>CD48<sup>-</sup>细胞后分析GFP的表达, 可以清晰地看到 $\alpha$ -catulin<sup>GFP</sup>特异性集中在HSC群体中, 约占HSC群体的52%, 这些GFP阳性的HSC是能够长期造血重建的HSC, 而GFP阴性的HSC则不能<sup>[13]</sup>。因此, 在流式分析和分选中引入 $\alpha$ -catulin<sup>GFP</sup>有利于富集骨髓HSC。

需要注意的是, 由于GFP和FITC有相似的激发和发射波长, 不能共用, 因此流式抗体的荧光基团选择需要做一定的调整, 具体方案请参见表5。

### 2.3 HSC谱系示踪小鼠的流式分析和分选策略

HSC是成年小鼠血液细胞的来源, 它在不同生理或病理状态下的分化动力学存在差异, HSC特异性的谱系示踪系统为我们提供了很好的体内工具来研究HSC的分化命运和谱系, 其中*Fgd5-CreERT2*是一个经典的HSC特异性示踪工具<sup>[17-18]</sup>。对*Fgd5-CreERT2; Rosa26-Tomato*小鼠腹腔注射他莫昔芬进行诱导后, *Fgd5*<sup>+</sup>细胞及其子代会表达Tomato红色荧光。如图3所示, 两周后对骨髓细胞进行SLAM抗体染色, 圈取Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>CD48<sup>-</sup>细胞后分析Tomato的表达, 可以清晰地观察到Tomato特异性集中在HSC群体中, 约占HSC群体的31%, 且在MPP和



各细胞群的相对数量(在父群中的百分比)。LSK: Lineage<sup>-</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup>。

The relative number of each cell population (percentage in the parent group). LSK: Lineage<sup>-</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup>.

图1 野生型小鼠造血干细胞流式分析中的细胞群圈选策略

Fig.1 Flow cytometry gating strategy for wild type mice hematopoietic stem cells

HPC也有一定荧光。

需要注意的是，由于Tomato和PE有相似的激发和吸收波长，不能共用，因此流式抗体的荧

光基团选择需要做一定的调整，具体方案请参见表6。此外，*Fgd5-CreERT2; Rosa26-Tomato*自带ZsGreen荧光，在流式细胞仪电压较低时检测不到，

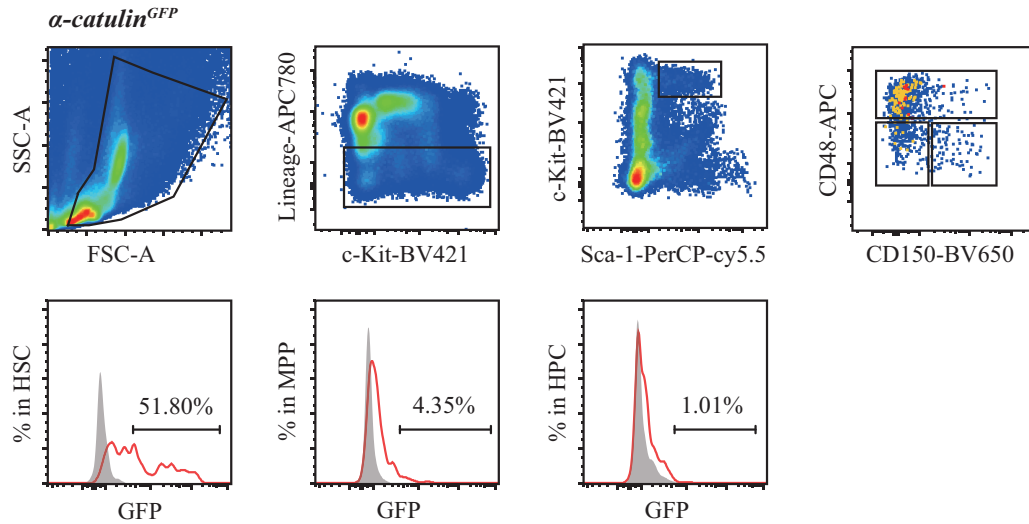


图2  $\alpha$ -catulin<sup>GFP</sup>小鼠荧光蛋白表达情况

Fig.2 Fluorescent protein expression of  $\alpha$ -catulin<sup>GFP</sup> mice

表5 含GFP时SLAM家族分离策略

Table 5 SLAM family isolation protocol with GFP

抗体	克隆号	荧光标记	抗体用量(ng/1×10 <sup>6</sup> 个细胞)
Antibody	Clone	Fluorophores	Dosage of antibody (ng/1×10 <sup>6</sup> cells)
Lineage mix	—	APC780	600
CD117 (c-Kit)	2B8	BV421	100
Sca-1 (Ly6a)	E13-161.7	PerCP-cy5.5	200
CD48	HM48-1	APC	100
CD150 (SLAM)	TC15-12F12.2	Biotin	200
Streptavidin	None	BV650	50

“—”表示多种抗体的混合液，详细信息见表3。

“—” represents the mixture of multiple antibodies, and the detailed information is shown in Table 3.

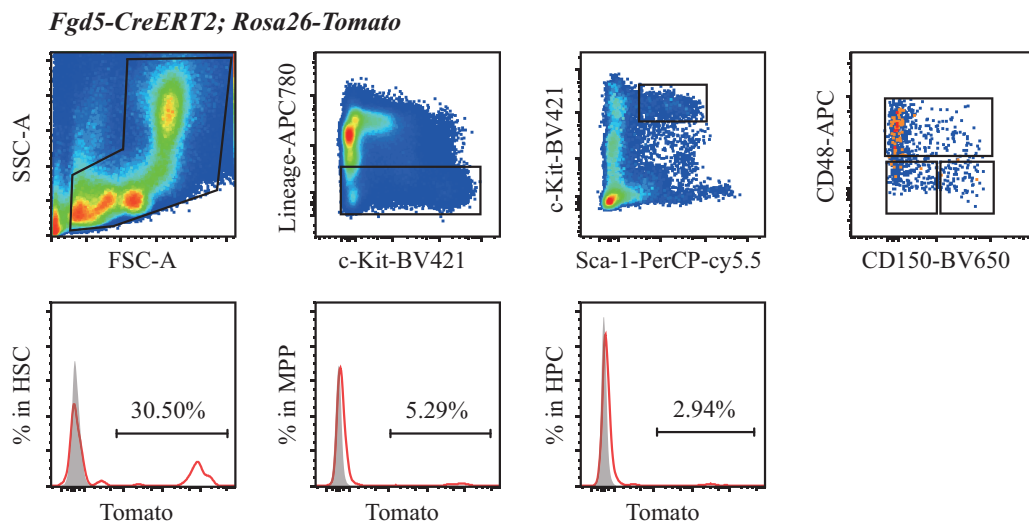


图3 *Fgd5-CreERT2; Rosa26-Tomato*小鼠荧光蛋白表达情况

Fig.3 Fluorescent protein expression of *Fgd5-CreERT2; Rosa26-Tomato* mice

表6 含Tomato时SLAM家族分离策略

Table 6 SLAM family isolation protocol with Tomato

抗体	克隆号	荧光标记	抗体用量(ng/1×10 <sup>6</sup> 个细胞)
Antibody	Clone	Fluorophores	Dosage of antibody (ng/1×10 <sup>6</sup> cells)
Lineage mix	—	APC780	600
CD117 (c-Kit)	2B8	BV421	100
Sca-1 (Ly6a)	E13-161.7	PerCP-cy5.5	200
CD48	HM48-1	APC	100
CD150 (SLAM)	TC15-12F12.2	BV605	200

“—”表示多种抗体的混合液, 详细信息见表3。

“—” represents the mixture of multiple antibodies, and the detailed information is shown in Table 3.

不会和FITC通道发生干扰, 在电压较高时, 可以像 $\alpha$ -catulin<sup>GFP</sup>一样作为HSC的指示信号(reporter)使用。

### 3 讨论

#### 3.1 单细胞悬液的制备

流式细胞分析和分选的基础就是单细胞悬液的制备, 利用骨髓细胞制备单细胞悬液相对而言比较简单, 但仍然要注意振摇和过滤, 避免细胞死亡结团。一只成体小鼠两根股骨加两根胫骨完全吹出的细胞量约为10<sup>8</sup>个, 因为HSC的稀少性, 每组实验管至少需要10<sup>6</sup>个骨髓细胞, 最后获得大约100个HSC。

#### 3.2 抗体染色

FACS缓冲液需要添加FBS, 来维持细胞活性, 这样既可以减少非特异性的染色, 同时也方便进行后续实验。抗体孵育时间不能过长也不能过短, 孵育时间过长, 非特异性染色增多, 抗体染色时间过短, 染色不充分, 荧光基团信号弱。值得注意的是, 抗体孵育时间和温度相关。我们一般采用冰上孵育30 min。在室温下, 一般可以缩短至15 min, 但是非特异性信号会增多。选择一个合适的孵育温度和时间可以使后续流式分析信号清晰稳定。染色过程中振摇也十分关键, 既可以有效避免细胞死亡结团, 也可以避免染色不充分。

#### 3.3 抗体选择

实验室常用的荧光有FITC、PE、APC、PE-cy7、APC-cy7、PerCP-cy5.5等。我们这里针对不同情况: 无荧光、有绿色荧光蛋白、有红色荧光蛋白, 分别给出了推荐的抗体染色策略。使用同抗体同克隆号的其他荧光基团的荧光抗体也会有相同的结果。在抗体选择中尽量使用非串联染料, 若要使用串联染料如PE-cy5、PE-cy7、PerCP-cy5.5和APC-

cy7等, 应做好对照, 并注意抗体染料状态, 避免抗体质量不稳定或操作不当导致串联染料脱落。

#### 3.4 流式补偿调节

在流式细胞仪中, 常使用带通滤光片来确定适宜范围的激发和发射波长。但是, 当发射光谱重叠时, 会检测到来自多种荧光染料发射的荧光。因此, 为修正这类光谱重叠, 需要进行荧光补偿。每次流式细胞分析或分选实验都需要带上同型抗体对照以确定荧光信号的背景值。这一过程可确保从特定通道检测到的荧光仅来自目标荧光染料。SLAM染色策略中使用了多种抗体, 因此对于流式补偿应谨慎对待。对实验中用到的所有荧光都要做单标, 不仅是抗体荧光, 细胞中自带的荧光蛋白也应留出单标。条件不允许时, 可使用单标微珠。实际调节时每个通道的PMT实验组应与对照组保持一致。

### 参考文献 (References)

- [1] MORRISON S J, WEISSMAN I L. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype [J]. *Immunity*, 1994, 1(8): 661-73.
- [2] OKADA S, NAKAUCHI H, NAGAYOSHI K, et al. *In vivo* and *in vitro* stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells [J]. *Blood*, 1992, 80(12): 3044-50.
- [3] OSAWA M, HANADA K, HAMADA H, et al. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell [J]. *Science*, 1996, 273(5272): 242-5.
- [4] ARAI F, HIRAO A, OHMURA M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche [J]. *Cell*, 2004, 118(2): 149-61.
- [5] BALAZS A B, FABIAN A J, ESMON C T, et al. Endothelial protein C receptor (CD201) explicitly identifies hematopoietic stem cells in murine bone marrow [J]. *Blood*, 2006, 107(6): 2317-21.
- [6] KIEL M J, YILMAZ O H, IWASHITA T, et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells [J]. *Cell*, 2005, 121(7): 1109-21.
- [7] GOODELL M A, BROSE K, PARADIS G, et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are

- replicating *in vivo* [J]. *J Exp Med*, 1996, 183(4): 1797-806.
- [8] LI C L, JOHNSON G R. Rhodamine123 reveals heterogeneity within murine Lin<sup>-</sup>, Sca-1<sup>+</sup> hemopoietic stem cells [J]. *J Exp Med*, 1992, 175(6): 1443-7.
- [9] HOFER T, BUSCH K, KLAPPROTH K, et al. Fate mapping and quantitation of hematopoiesis *in vivo* [J]. *Annu Rev Immunol*, 2016, 34: 449-78.
- [10] BENVENISTE P, CANTIN C, HYAM D, et al. Hematopoietic stem cells engraft in mice with absolute efficiency [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(7): 708-13.
- [11] JENSEN P, DYMECKI S M. Essentials of recombinase-based genetic fate mapping in mice [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1092: 437-54.
- [12] FEIL R, WAGNER J, METZGER D, et al. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 237(3): 752-7.
- [13] ACAR M, KOCHERLAKOTA K S, MURPHY M M, et al. Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal [J]. *Nature*, 2015, 526(7571): 126-30.
- [14] CHEN J Y, MIYANISHI M, WANG S K, et al. Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche [J]. *Nature*, 2016, 530(7589): 223-7.
- [15] BUSCH K, KLAPPROTH K, BARILE M, et al. Fundamental properties of unperturbed haematopoiesis from stem cells *in vivo* [J]. *Nature*, 2015, 518(7540): 542-6.
- [16] ITO K, TURCOTTE R, CUI J, et al. Self-renewal of a purified Tie2<sup>+</sup> hematopoietic stem cell population relies on mitochondrial clearance [J]. *Science*, 2016, 354(6316): 1156-60.
- [17] CARRELHA J, MENG Y, KETTYLE L M, et al. Hierarchically related lineage-restricted fates of multipotent haematopoietic stem cells [J]. *Nature*, 2018, 554(7690): 106-11.
- [18] GAZIT R, MANDAL P K, EBINA W, et al. Fgd5 identifies hematopoietic stem cells in the murine bone marrow [J]. *J Exp Med*, 2014, 211(7): 1315-31.
- [19] SAWAI C M, BABOVIC S, UPADHAYA S, et al. Hematopoietic stem cells are the major source of multilineage hematopoiesis in adult animals [J]. *Immunity*, 2016, 45(3): 597-609.
- [20] CHRISTODOULOU C, SPENCER J A, YEH S A, et al. Live-animal imaging of native haematopoietic stem and progenitor cells [J]. *Nature*, 2020, 578(7794): 278-83.
- [21] SANJUAN-PLA A, MACAULAY I C, JENSEN C T, et al. Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy [J]. *Nature*, 2013, 502(7470): 232-6.
- [22] CABEZAS-WALLSCHEID N, BUETTNER F, SOMMERKAMP P, et al. Vitamin A-retinoic acid signaling regulates hematopoietic stem cell dormancy [J]. *Cell*, 2017, 169(5): 807-23, e19.
- [23] KEBSCHULL J M, ZADOR A M. Cellular barcoding: lineage tracing, screening and beyond [J]. *Nat Methods*, 2018, 15(11): 871-9.
- [24] KESTER L, VAN OUDENAARDEN A. Single-cell transcriptomics meets lineage tracing [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(2): 166-79.