

FACSAria 流式细胞仪无菌操作分选高纯度细胞亚群

刘锡娟, 丁慧荣, 田志华, 韩海勃, 张 宏

摘要 BGC823 细胞瞬时转染绿色荧光蛋白(GFP)质粒 2 d 后,用 FACSAria 流式细胞仪分选 GFP 阳性和阴性 BGC823 细胞亚群,检测其分选纯度并培养分选后细胞,观察其无菌生长状态;商品化 FITC 直标抗体孵育 SMMC7721 细胞后, FACSAria 流式细胞仪分选 FITC 阳性和阴性细胞亚群。将所有分选的细胞进行培养检测无菌状态,并观察细胞生长情况。FACSAria 流式细胞仪分选得到的 GFP 阳性细胞群的分选纯度达 99.6%,GFP 阴性细胞群的分选纯度达 98.8%,同时激光共聚焦荧光显微镜显示分选后的 GFP 阳性细胞明显富集;分选后的 BGC823 细胞和 SMMC7721 细胞常规培养,细胞均无污染且生长状态良好。

关键词 流式细胞仪; 无菌分选; 高纯度

中图分类号 R 331

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)12-1811-05

流式细胞技术普遍应用于免疫学、血液学、肿瘤学、细胞生物学、细胞遗传学等临床和研究领域^[1-3]。分选型流式细胞仪可将样本中的亚群分开,可同时对其中 1~4 种特定细胞进行超高速分选。分选后的细胞可直接用于培养、移植、核酸提取、单细胞 PCR 扩增或原位杂交等实验,也可进行细胞基因、蛋白、功能水平的研究和不同细胞之间的差异化研究^[4]。分选型流式细胞仪构造和操作都比较复杂,日常维护很严格。如果维护不当,无法实现无菌分选,进而影响后续实验^[4-5]。目前国内外对于无菌分选实验的研究报道并不多见。该研究通过分选两种带有荧光标记的细胞系完成了高纯度无菌分选,分选后的细胞实现无菌培养,这对流式无菌分选做了一些探索和研究。

1 材料与方法

1.1 材料 BGC823、SMMC7721 细胞系为本所保存;0.25%胰酶、1640 培养基购自美国 Gibco 公司;Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司;流式细

胞仪 FACSAriaII、分选质控试剂微球、FACSAriaII 质控试剂 CST 微球均购自美国 Becton Dickinson 公司;荧光显微镜激光共聚焦 TCSSP5 购自德国莱卡公司。

1.2 方法

1.2.1 BGC823 细胞转染绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP) 接种 BGC823 细胞至 10 cm 细胞培养皿中, 1×10^6 细胞/孔,24 h 后,根据 Lipofectamine 2000 说明书步骤,将 pEGF-C1 质粒转入细胞,24 h 后换液,48 h 将转染了 GFP 的 BGC823 细胞用 0.25%胰酶消化成单个细胞,并悬浮于 500 μ l $1 \times$ PBS 溶液中,上流式细胞仪检测 GFP 表达阳性率及分选,分选后将 GFP 表达阳性细胞及阴性细胞收集于装有培养液的流式管中,再次流式分析检测分选纯度。

1.2.2 带有 FITC 标记的抗体孵育 SMMC7721 细胞 复苏 SMMC7721 细胞至 10 cm 细胞培养皿中,12 h 后换液,24 h 后传代继续培养,待生长状态良好时用 0.25%胰酶消化成单个细胞并收集,37 $^{\circ}$ C 孵育标记了 FITC 的抗体 1 h,PBS 洗 3 次,悬浮于 500 μ l PBS 溶液中,待流式检测并分选。

1.2.3 FACSAriaII 流式细胞仪无菌分选前处理 无菌管路的制备和管路中气泡的排除:①高压鞘液:120 $^{\circ}$ C、30 min^[6]。②鞘液桶和液面感应器无菌处理:加入 2~3 L 75%乙醇溶液,密闭后摇晃鞘液桶,使内壁与乙醇溶液充分接触 1 h,后用无菌去离子水冲洗 15~20 次,并充满无菌鞘液;蒸馏水桶和液面感应器无菌处理方法同上,并充满经 0.2 μ m 级别的 minipore 纯水仪过滤的去离子水。③电偏转板先用无菌水棉签擦拭,后用干燥的棉签擦拭,再用 75%乙醇溶液棉签擦净;实验开始前更换进样针上的滤器,在操作界面上执行滤器更换程序即可;分选前半小时,75%乙醇溶液喷洒分选仓内部。④拧开液流车上滤器的圆形小旋钮,流出一些鞘液,可排除滤器中的气泡;将实验用的喷嘴超声,排出喷嘴里的气泡;连续开关液流 2~3 次,排出喷嘴安装区域附近的气泡;用手指弹出液流车连接桶透明管中的气泡。⑤打开机器电源,再打开电脑电源,进入 Diva 软件,执行开机程序;在操作界面上执行无菌清

2014-06-27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81201964)

作者单位:北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所中心实验室,恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室,北京 100142

作者简介:刘锡娟,女,助理研究员,责任作者,E-mail: liuxj-2003@163.com

洗程序,按照提示信息一步步完成;每周做一次流动室冲洗,主要是对流动池的清洗,按照程序执行后等待 2~3 min 后,打开液流,高流速冲洗 10 min,然后用无菌水上样冲洗 10 min。上样前,可用 75% 乙醇溶液冲洗进样管路 10 min^[4]。

1.2.4 FACS Aria II 流式细胞仪质控 CST 进入 CST 界面,由专业工程师调试仪器至最佳状态,做 Baseline,然后再做 work performance,执行 CST 程序,进行当日质控。

1.2.5 分选液流调试 打开液流断点窗口的主液流 stream,待液流稳定后调节液滴振动振幅 Ampl,使 Gap 值尽量稳定,液流断点位置位于窗口中上部,Ampl 的调整不超过 70;打开侧液流窗口的偏转电压板电压,激活分选测试 Test Sort,通过调整主液流窗口中的振幅,使液流分束清楚,直至看到清晰的四路状态^[4]。

1.2.6 分选质控调试 使用分选质控微球 Accudrop beads,上样速度为 500~1 500 events/s,点击 AUTO,开始调试,直至最佳值。

1.2.7 样本检测及分选 对表达 GFP 蛋白的 BGC823 细胞以及带有 FITC 荧光标记抗体的 SMMC7721 细胞进行检测,并且建立分选阳性门及阴性门。分选后对样品进行分选纯度检测。

1.2.8 分选后无菌培养 分选后的 BGC823 和 SMMC7721 细胞进行无菌培养,显微镜连续观察细胞贴壁生长 1~6 d 情况,激光共聚焦显微镜对其分选前后进行观察。

2 结果

2.1 CST 质控 执行 CST 程序,结果显示“passed”状态,表格中显示各激光 CV 值均为黑色字样(如有异常,会以红色字样显示),表明其处于质控要求范围之内,同时机器的各项指标均在正常范围内,见图 1。

2.2 分选液流调试 使用 Accudrop beads 调试至出现清晰四路,见图 2。

2.3 分选质控调试 使用自动模式进行分选质控调试,直至出现最佳值,见图 3。

2.4 检测及分选纯度 将表达 GFP 蛋白的 BGC823 细胞进行分选,检测 GFP 表达细胞比例,阳性率为 73.6%,见图 4,图中 P3 门为 GFP(+) 细胞群, P2 门为 GFP(-) 细胞群, P4 为 GFP(+) 细胞群分选门, P5 为 GFP(-) 细胞群分选门。分别收集 GFP(+) 和 GFP(-) 细胞,并进行培养。分选后的

细胞进行再分析,检测分选纯度。GFP(+) 细胞群的分选纯度达 99.6%, GFP(-) 细胞群分选纯度达 98.8%,见图 5。激光共聚焦荧光显微显示 GFP 阳性细胞分选后比分选前增多,见图 6。

Cytometer Performance Report

Cytometer:	FACS Aria II	User:	Administrator
Cytometer Name:	FACS Aria II	Institution:	NJA
Serial Number:	1	Software:	BD FACSDiva 6.1.3
Input Device:	Manual	Date:	03/02/2012 12:57 PM
Cytometer Configuration:	100um_3HeNe, 9-color (5-2-2) UV	Cytometer Baseline:	03/02/2012 12:54 PM
		Run:	

Setup Beads

Bead Product: CST Setup Beads, Part #: 980723
Lot ID: 1890, Expiration Date: 07/31/2013
Bead Lot Information: Available

Detector Settings

Laser	Detector	Parameter	Target Value	Actual Target Value	% Difference	Bright Bead %	Red Bead %	Red Bead %
						Reflected CV	Marker Channel	Reflected CV
Blue	PSC	PSC	125000	124711	-1	4.21	124644	4.13
Blue	P	SSC	125000	124702	-1	5.16	124677	4.19
Blue	E	Area Plot 400	7541	7413	-2	2.13	351	7.37
Blue	D	PE	7229	6997	-4	1.63	270	6.13
Blue	C	PE-Texas Red	4608	4572	-2	1.93	248	8.35
Blue	B	PE-Cy5	14194	13539	-5	2.67	487	12.96
Blue	A	PE-Cy7	17082	16579	-3	4.21	345	16.81
Red	B	APC	20946	19856	-5	2.97	1310	7.71
Red	A	APC-Cy7	16956	16514	-3	3.40	499	8.42
365 UV	B	UV2	13002	13296	2	4.98	367	5.35
365 UV	A	UV1	38139	37239	-3	6.68	1002	12.62

图 1 FACS Aria II 流式细胞仪质控 CST 结果图

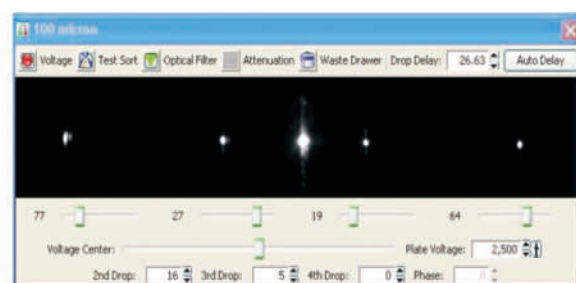


图 2 FACS Aria II 流式细胞仪分选调试清晰四路

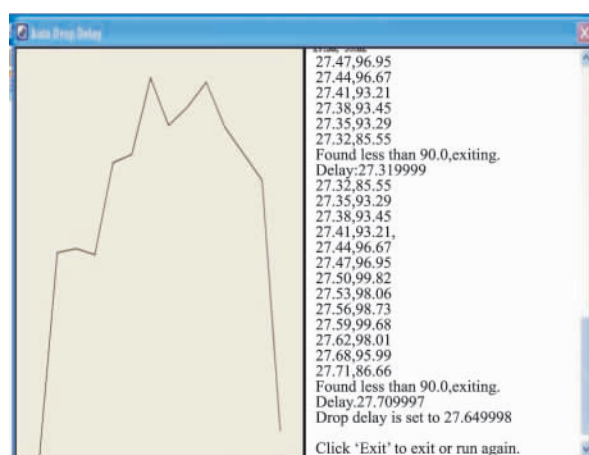


图 3 FACS Aria II 流式细胞仪分选质控调试结果

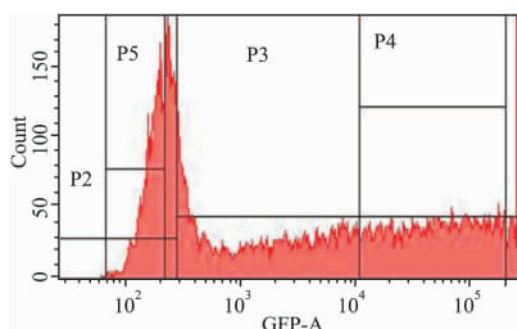


图4 FACS Aria II 流式细胞仪检测分选前 BGC823 细胞表达 GFP 阳性率

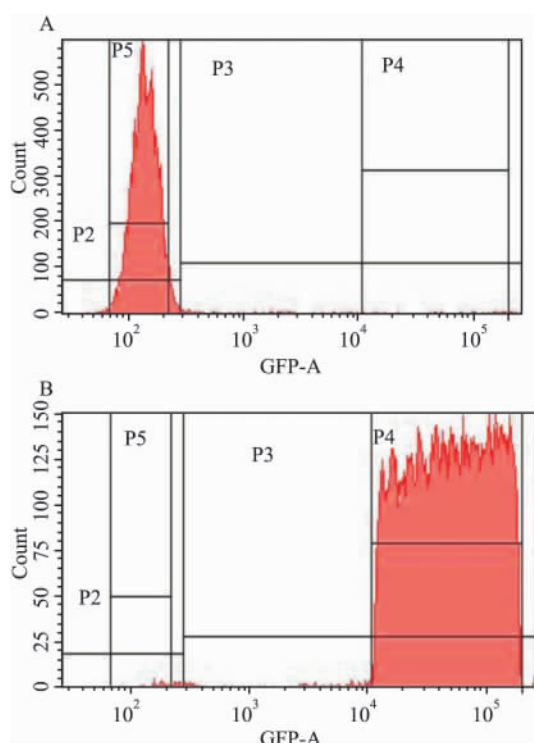


图5 FACS Aria II 流式细胞仪检测分选后 BGC823 细胞分选纯度
A: GFP- 细胞群; B: GFP+ 细胞群

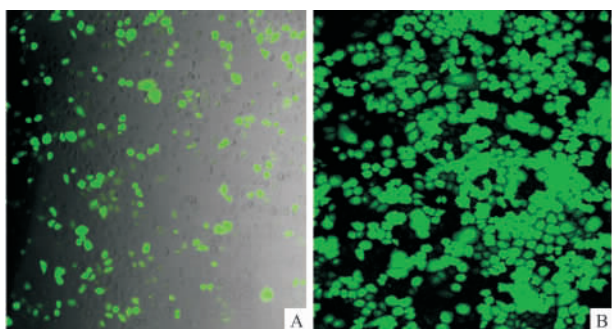


图6 激光共聚焦显微镜检测分选前后 BGC823 细胞 GFP 表达 $\times 10$
A: 分选前; B: 分选后

2.5 分选后无菌培养 将分选后的 BGC823 细胞培养 7 d, 可见细胞生长旺盛, 状态良好, 见图 7。将

分选后的 SMMC7721 细胞培养 6 d, 可见细胞生长旺盛, 状态良好, 见图 8。

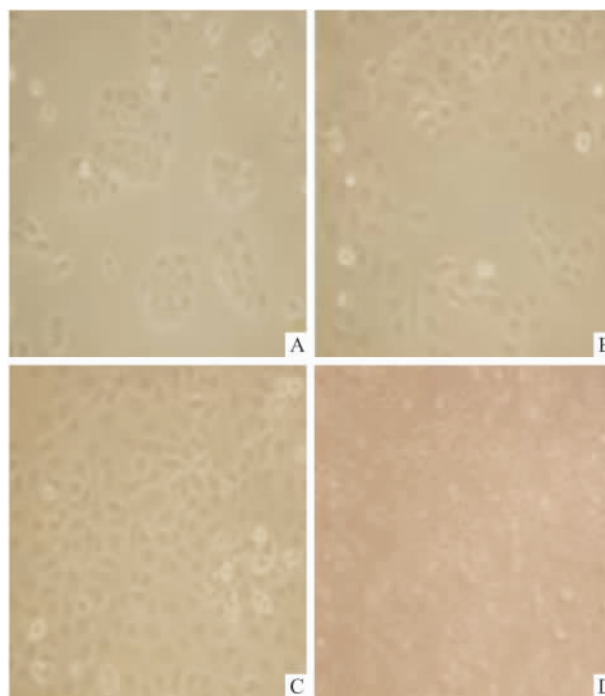


图7 FACS Aria II 流式细胞仪分选后的 BGC823 细胞
无菌培养 1~7 d 生长情况 $\times 10$
A: 1 d; B: 3 d; C: 5 d; D: 7 d

3 讨论

利用流式细胞仪进行无菌分选, 需将仪器置于洁净的空间, 且要对仪器严格维护, 方可达到长期无菌分选的目的^[8]。仪器的维护体现在两个方面, 一是液路、进样针、分选仓及收集仓的无菌维护, 本文对此做了很详细的描述(见 1.2.1 FACS Aria 流式细胞仪分选前处理); 二是避免使用黏性过大的染料(如 PI) 及检测有污染的样品(如已经有细菌或真菌污染的样品)。

利用流式细胞仪进行分选, 其分选的纯度会受很多因素影响^[8]。可能的影响因素如下: ① 仪器的状态(包括激光的稳定性、液流的稳定性及激光激发的有效性) 是保证分选纯度的前提条件; ② 样品的处理方式、样品浓度、样品质量也会影响分选纯度, 比如细胞分离不彻底, 产生粘连细胞, 在分选的过程中就会被随机分配, 即可能进入阳性组, 也可能进入阴性组, 这样阳性组中就会混有阴性细胞, 阴性组中会出现阳性细胞, 从而影响分选的纯度。可通过圈门去掉粘连细胞再进行分选, 以提高分选纯度^[8]; ③ 在做分选实验时, 有 purity、yield、single cell 三种模式可选择, 为了保证纯度往往会选择 purity

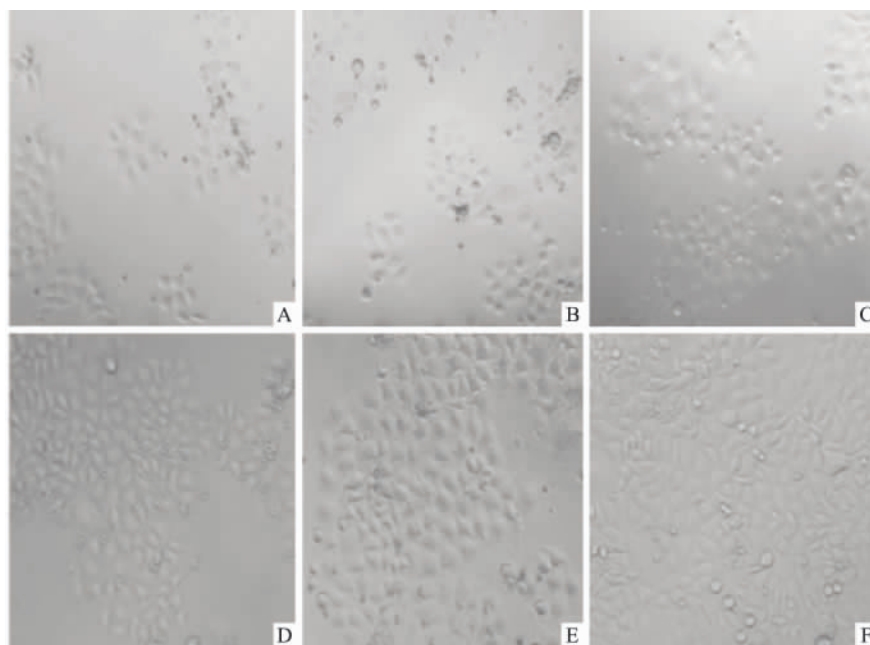


图8 FACS Aria II 流式细胞仪分选后的 SMMC7721 细胞无菌培养 1~6 d 生长情况 $\times 10$
A: 1 d; B: 2 d; C: 3 d; D: 4 d; E: 5 d; F: 6 d

模式,但由于还有其它的制约因素,纯度不会达到 100%;为了保证得率往往会选择 yield 模式,但纯度会下降;为了保证分选到的细胞是单个细胞往往选择 single 模式,但得率又会下降很多。一般孔板分选并且对细胞数量要求极少的情况下会用此模式^[10-11]。因此,分选模式的选择需根据实验目的和要求来确定。另外,抗体阳性表达比例的大小,分选门的设置,喷嘴的大小,分选速度的大小等也会影响分选纯度。可见,分选纯度是受多种因素制约的,需要平衡以上各项因素,才能保证一个高的分选纯度。

本次实验使用的仪器进行了严格的无菌维护,并且设置了分选门(P4 和 P5 门)^[12],使 GFP(+) 和 GFP(-) 细胞群分选纯度分别达到 99.6% 和 98.8%,此分选纯度基本可以满足大多数细胞分选实验的要求。实验中无菌维护流程在保证 FACS Aria 流式细胞仪完成高纯度无菌分选实验中起了非常重要的作用,为以后无菌分选实验的研究进行了初步的探索。

参考文献

- [1] Krupnick A S, Kreisel D, Szeto W Y, et al. Multiparameter flow cytometric approach for simultaneous evaluation of T lymphocyte-endothelial cell interactions [J]. *Cytometry*, 2001, 46(5): 271-80.
- [2] 申 泉, 张 丽, 朱 镛. 流式细胞术的应用及发展 [J]. *临床医药实践杂志*, 2004, 13(2): 83-5.
- [3] Georgiou G, Stathopoulos C, Daugherty P S, et al. Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines [J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(1): 29-34.
- [4] Lekkerkerker A, Logtenberg T. Phage antibodies against human dendritic cell subpopulations obtained by flow cytometry-based selection on freshly isolated cells [J]. *J Immunol Methods*, 1999, 231(1-2): 53-63.
- [5] Francisco J A, Campbell R, Iverson B L, et al. Production and fluorescence-activated cell sorting of *Escherichia coli* expressing a functional antibody fragment on the external surface [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(22): 10444-8.
- [6] Tirouvanziam R, Davidson C J, Lipsick J S, et al. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) of *Drosophila* hemocytes reveals important functional similarities to mammalian leukocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(9): 2912-7.
- [7] 刘锡娟, 丁慧荣, 张 宏. FACS Aria 流式细胞仪 96 孔微孔板单个细胞分选方法的优化和应用 [J]. *生物学通报*, 2010, 45(3): 51-4.
- [8] Marion R E, Gardner G E, Parks L D. Multiweek cell culture project for use in upper-level biology laboratories [J]. *Adv Physiol Educ*, 2012, 36(2): 154-7.
- [9] 吴后男. 流式细胞术原理与应用程序 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2008.
- [10] 刘艳荣. 实用流式细胞术 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2010.
- [11] 王建中. 临床流式细胞分析 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005.
- [12] Birbrair A, Wang Z M, Messi M L, et al. Nestin-GFP transgene reveals neural precursor cells in adult skeletal muscle [J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e16816.

组织块法体外分离培养大鼠脊髓成体神经干细胞

张 辉¹, 张 硕², 江 正¹, 余 涛¹, 钟 林¹, 尹宗生¹

摘要 取 8 月龄 SD 大鼠脊髓, 分组织块法和细胞悬液法培养, 测量神经干细胞球出现的时间、数量、直径。MTT 法鉴定增殖能力及免疫荧光染色鉴定分化神经元和星型胶质细胞的比例。组织块组在神经干细胞球出现的时间、数量及增殖能力上与细胞悬液组比较差异有统计学意义, 两组在分化细胞比例上差异无统计学意义。

关键词 组织块培养; 成体神经干细胞; 脊髓; 大鼠

中图分类号 R 681.54

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)12-1815-04

成体神经干细胞指的是在成体动物神经组织中存在的具有增殖及多向分化能力的神经干细胞, 在胚胎神经干细胞受到广泛关注及研究的同时, 由于

神经损伤更多发于成年人, 对于成体神经干细胞的研究更具有临床意义^[1]。成体脊髓中存在有神经干细胞, 但由于不是神经生发区, 在体的脊髓成体神经干细胞的神经生发能力非常有限, 体外分离培养的效率不高, 限制了进一步细胞移植及基因工程的供体细胞的来源, 经典的神经干细胞培养方法是采用组织悬液法, 该研究设计使用组织块法来培养获得脊髓成体神经干细胞, 并与组织悬液法进行多方面的比较。

1 材料与方法

1.1 材料 8 月龄 SD 大鼠, 雄性, 体重 550 ~ 650 g, SPF 级; 由安徽医科大学实验动物中心提供。DMEM/F12(1:1) 培养基、B27 添加剂均购自美国 Gibco 公司; 重组大鼠表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 购自美国 Peprotech 公司; 抗巢蛋白 (Nestin)、抗胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP)、抗微管相关蛋白-2 (microtubule associated protein, MAP-2) 均购自美国 Santa Cruz 公司; 小鼠抗大鼠多克隆抗体, 异硫氰酸荧光

2014-08-11 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81171173); 安徽省自然科学基金 (编号: 11040606Q25)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院骨科, 合肥 230022

² 安徽医科大学第四附属医院骨科, 合肥 230022

作者简介: 张 辉, 男, 副主任医师;

尹宗生, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yinzongsheng1961@sina.com

Sorting sterile cell subpopulation with high purity on FACS Aria

Liu Xijuan, Ding Huirong, Tian Zhihua, et al

[Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research (Ministry of Education), Center Lab, Peking University Cancer Hospital & Institute, Beijing 100142]

Abstract BGC823 cells were transiently transfected with green fluorescent protein (GFP) plasmids. Two days later, GFP positive and negative cells were sorted by FACS Aria. Separated cells were tested by FACS Aria for purity analysis and also cultured for sterile analysis. SMMC7721 cells were incubated with FITC-labeled commercial antibody and then sorted on FACS Aria for FITC positive and negative cells. All separated cells were cultured to sterile analysis. The purity for GFP positive and negative subpopulation sorted from GFP transfected BGC823 cells were 99.6% and 98.8% respectively. Detected by laser scanning confocal microscopy, the separated GFP positive cells were significantly enriched after sorting compared to parent cells. Sorted BGC823 cells and SMMC7721 cells were cultured conventionally and cells were all free from contamination with a good growth. FACS Aria flow cytometry is suitable to preparation of sterile cell subpopulation with high purity both from fluorescence plasmids transfected cells and fluorescence antibody labeled cells.

Key words FACS; sterile sorting; high-purity