

小鼠骨髓红细胞分化阶段分析

Flow Cytometry Analysis of Stages of Mouse Erythroid Differentiation in Bone Marrow

谢嘉怡, 王璿, 赵萌*

中山医学院, 中山大学, 广州, 广东

*通讯作者邮箱: zhaom38@mail.sysu.edu.cn

引用格式: 谢嘉怡, 王璿, 赵萌. (2019). 小鼠骨髓红细胞分化阶段分析. *Bio-101* e1010337. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010337.

How to cite: Xie, J. Y. Wang, J. and Zhao, M. (2019). Flow Cytometry Analysis of Stages of Mouse Erythroid Differentiation in Bone Marrow. *Bio-101* e1010337. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010337. (in Chinese)

摘要: 红细胞是血液中数量最多的血细胞, 是脊椎动物体内通过血液运送氧气最主要的媒介。红细胞成熟过程主要发生在骨髓内, 原始红细胞是有核细胞, 在成熟过程中, 其细胞核逐渐消失, 细胞骨架发生改变, 逐渐形成双凹圆盘状的成熟红细胞并释放到外周血中。研究发现, Ter-119、CD71、CD44 等细胞表面分子标记可反映红细胞发育不同阶段, 故本文以小鼠骨髓组织为例, 使用 3 种带不同荧光标记对的抗体, 结合细胞大小, 对骨髓细胞中 5 个阶段的红细胞进行标记。

关键词: 小鼠, 造血祖细胞, 红系分化, 流式细胞术

材料与试剂

1. 15 ml 离心管
2. 50 ml 离心管
3. 1.5 ml EP 管
4. 70 μ m 滤膜 (Fisherbrand, catalog number: 22363548)
5. 小鼠 (C57BL/6J, 6~8 周龄, 雄雌各半)
6. 胎牛血清 (FBS, Gibco, catalog number: 10100147)
7. 流式抗体如表 1

表 1. 流式抗体

| 抗体 | 荧光 | 品牌 | 货号 | 克隆号 | 浓度 |
|---------|----------|-----------|--------|---------|-----------|
| CD16/32 | purified | Biologend | 101302 | 93 | 0.5 mg/ml |
| Ter-119 | APC | Biologend | 116212 | Ter-119 | 0.2 mg/ml |
| CD71 | FITC | Biologend | 113806 | R17217 | 0.5 mg/ml |
| CD44 | PE | Biologend | 103007 | IM-7 | 0.2 mg/ml |

8. 磷酸缓冲液 (10x PBS, Sangon biotech, catalog number: E607016-0500)
9. 磷酸缓冲液 (1x PBS) (见溶液配方)
10. 红细胞形成抗体混合液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 离心机 (Eppendorf, catalog numbers: 5804R, 5424R)
2. 移液器
3. 水浴锅
4. 摇床
5. 流式细胞仪 (Thermo Fisher Scientific, Attune NxT)

实验步骤

1. 颈椎脱臼处死小鼠，从下腹部剪开小鼠腿部皮肤，小心剪开髋关节与踝关节，将小鼠腿部完整取出，分离肌肉，取出股骨与胫骨，置于 6 孔板中，浸泡在预冷的 PBS + 2% FBS 中，置于冰上。
2. 沿骨髓剪开骨头两端松质骨部分，用 1 ml 注射器吸取预冷的 PBS + 2% FBS，从一端开口将骨髓从另一端开口吹出，并将两端松质骨部分剪开，将所有骨髓组织吹至预冷的 PBS + 2% FBS 中。
3. 将含有骨髓组织的 PBS + 2% FBS 转移至 15 ml 离心管中，并用注射器反复吹吸打散细胞至无明显骨髓组织团块。用 70 μ m 滤器过滤至新的离心管内。4 $^{\circ}$ C 500 x g 离心 5 min。
4. 弃去上清，用 1 ml 预冷的 PBS + 2% FBS 重悬沉淀 (若细胞总数过少，如少于 10^7 个，则降低重悬体积)，用 PBS 稀释 10~100 倍后用细胞计数板或流式细胞仪

(Attune NxT 流式细胞仪中选择 **Statistic - Events/μl**, 得到细胞数后乘回稀释倍数即可) 进行有核细胞计数。

5. 取 1×10^6 细胞, 调整至 100 μl 体积, 加入 5 μl (0.5 mg/ml) Purified CD16/32, 4°C 封闭 15 min。
6. 加入 1 ml 预冷的 PBS +2% FBS 终止, 500 x g 离心 5 min。
7. 弃去上清, 用 100 μl 预冷的 2% FBS PBS 重悬细胞, 加入红细胞形成抗体混合液 (配制方法及抗体用量见文末“溶液配方”部分), 置于摇床、冰上、避光染色 1 h。
8. 分别加入 1 ml 预冷的 PBS + 2% FBS 终止染色, 500 x g 离心 5 min, 弃去上清, 用 400 μl 预冷的 PBS + 2% FBS 重悬细胞, 使用流式细胞仪收集数据。

结果与分析

红细胞形成是骨髓内有核红细胞向成熟红细胞分化的过程, 进行红细胞形成分析, 可研究红系祖细胞成熟的过程。骨髓中最早能被形态学辨别的红系祖细胞是原红细胞, 经过 3~4 次有丝分裂后依次产生嗜碱性红细胞、嗜多色性红细胞、正染性成红细胞, 最后正染性成红细胞的细胞核逐渐退化, 形成网织红细胞。这一系列有序分化过程伴随着细胞体积减小、染色质凝聚、细胞骨架变化等现象。研究发现, Ter-119、CD71、CD44 等细胞表面分子标记可反映红细胞发育不同阶段。本文研究的小鼠骨髓红细胞分化主要根据上述分子标记的表达情况和细胞大小分为 5 个阶段, 并与形态学分期相对应。

首先以 FSC-A 和 SSC-A 为轴, 画出主要细胞群, 然后以 FSC-A 和 FSC-H 去除粘连细胞, 画出单个细胞群。然后利用 Ter-119、CD71 和 CD44 标记各期红细胞 (I~V 期红细胞)。首先 CD71 阳性、Ter-119 弱阳性为原始红细胞 (I 期红细胞), Ter-119 强阳性包括 II~V 期红细胞, 再利用 CD44 和 FSC 即可分出 II~IV 红细胞, 其中 II 期红细胞形态学上为嗜碱性红细胞, III 期红细胞形态学上为嗜多色性红细胞, IV 期红细胞为正染性成红细胞和不成熟网织红细胞, 最后 V 期红细胞是成熟红细胞 (Pan 和 Johnstone, 1983; Chen 等, 2009), 流式结果如图 1 所示。

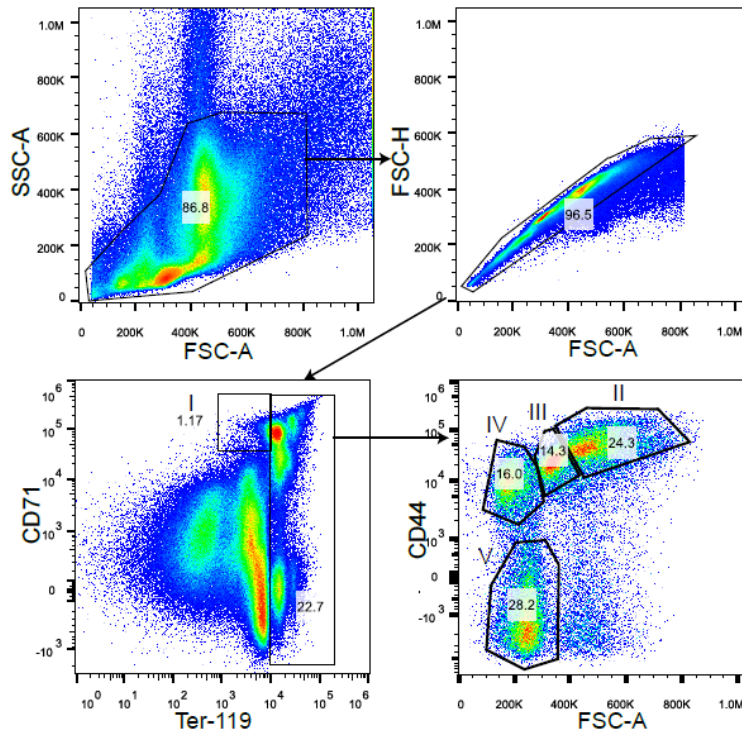


图 1. 小鼠红细胞分化阶段分析流式图

失败经验

各群细胞过少，分群不明显：

1. 染色前进行了红细胞裂解。
*红细胞形成实验不需进行红细胞裂解过程。
2. 画门时把小细胞群去除了。
*以 FSC-A 和 SSC-A 画门时需把小细胞群也画进主要细胞群。
3. 进行染色的细胞数过少。
*计数时红细胞干扰视野，可适当加大稀释倍数进行计数。
4. 未进行 CD16/32 封闭。
*染色前需使用 CD16/32 进行封闭。
5. CD16/32 封闭不足。
*可适当增加 CD16/32 用量和封闭时间。
6. 抗体浓度过低。
*适当提高抗体浓度。
*抗体需保存在 2-8 °C，避免冷冻。

7. 抗体孵育时间过短。

*适当延长抗体孵育时间。

溶液配方

1. 磷酸缓冲液 (1x PBS)

使用去离子水稀释 PBS (10x) (去除钙、镁离子) 至 1x

2. 红细胞形成抗体混合液

Ter-119, CD71, CD44 等质量混合, 抗体克隆号及荧光标记如表 2 所示:

表 2. 红细胞形成抗体混合液组成

| 抗体 | 克隆号 | 荧光标记 | 抗体用量 (ng/test) |
|---------|---------|------|----------------|
| Ter-119 | Ter-119 | APC | 50 |
| CD71 | R17217 | FITC | 50 |
| CD44 | IM-7 | PE | 50 |

参考文献

1. Chen, K., Liu, J., Heck, S., Chasis, J. A., An, X. and Mohandas, N. (2009). [Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis.](#) *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(41): 17413-17418.
2. Pan, B. T. and Johnstone, R. M. (1983). [Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes *in vitro*: selective externalization of the receptor.](#) *Cell* 33(3): 967-978.