

· 技术方法 ·

利用流式细胞仪分选拟南芥根尖发育早期非根毛细胞

李斐[†], 胡勇[†], 王帆, 张珍, 刘祥林*, 白素兰*, 何奕昆

首都师范大学生命科学学院, 北京 100048

摘要 建立了应用流式细胞仪分选植物特定类型细胞的方法。以拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *Wer::GFP*转基因株系为材料, 用激光共聚焦显微镜鉴定GFP的表达位置, 采用酶解法制备拟南芥根尖原生质体, 应用流式细胞仪荧光激活细胞分选技术(FACS)分选收集GFP阳性细胞, 并提取细胞的RNA。结果表明, *Wer::GFP*转基因株系仅在根表皮发育早期的非根毛细胞中表达GFP; 利用酶解法制备的根尖原生质体数目较多; 从FACS分选收集的细胞中提取的RNA质量较好, 可用于研究特定类型细胞的基因表达谱。应用流式细胞仪分选拟南芥非根毛细胞的方法为研究植物特定类型细胞的基因表达谱及基因功能奠定了技术基础。

关键词 拟南芥, 流式细胞仪, 荧光激活细胞分选, 非根毛细胞, 原生质体

李斐, 胡勇, 王帆, 张珍, 刘祥林, 白素兰, 何奕昆 (2010). 利用流式细胞仪分选拟南芥根尖发育早期非根毛细胞. 植物学报 45, 460–465.

流式细胞仪技术(flow cytometry)是一种对处在液流中的单个细胞或其它生物颗粒等进行快速定量分析和分选的技术。FACS Aria是BD公司2003年推出的世界上首款台式高速多荧光检测和分选的流式细胞仪, 其主要用途是从细胞群中高速分选出被指定的细胞, 以便作进一步鉴定、功能研究或细胞培养。目前, 流式细胞仪分选技术已广泛应用于医学研究, 但其在植物学领域的应用较少。

植物是由复杂的组织和器官构成, 构成植物组织或器官的细胞又可以分为多种不同类型(Scheres et al., 2002, 2004; Galbraith and Birnbaum, 2006)。植物的发育是通过调控基因表达及决定细胞命运而实现的, 因此建立不同类型细胞的基因表达谱对研究植物发育具有重要的意义(Birnbaum et al., 2003; Nawy et al., 2005; Galbraith and Birnbaum, 2006; Zhang et al., 2008)。要建立不同类型细胞的基因表达谱首先需要将不同类型的细胞分离开, 然后收集所需细胞类型并获得足够量的mRNA, 才能够进行表达谱分析。为了研究拟南芥根毛发生及发育的分子机理, 需要分别收集根尖发育早期的根毛细胞和非根毛细胞, 然后

通过基因表达谱分析, 寻找调控根毛发生与发育的候选基因, 研究它们在根毛发生与发育中的功能, 最终解析调控根毛发生及发育的分子机理。由于拟南芥根毛是隔行发生(Masucci et al., 1996; Wada et al., 1997; Lee and Schiefelbein, 1999), 需要将根毛细胞与非根毛细胞分别进行荧光标记, 才能够利用流式细胞仪收集。本研究以在根尖发育早期的非根毛细胞中表达 *WEREWOLF (Wer)::GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP)*绿色荧光蛋白的拟南芥转基因植物为材料, 利用流式细胞仪分选该类型细胞, 并获得足够量的mRNA, 为建立特定类型细胞的基因表达谱奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)为哥伦比亚生态型(Columbia-0), 由本实验室保存。拟南芥转基因植株*Wer::GFP*由美国密歇根大学John Schiefelbein教授馈赠。

收稿日期: 2010-01-18; 接受日期: 2010-03-22

基金项目: 国家自然科学基金(No.30771094)和北京市自然科学基金(No.5082003)

[†] 共同第一作者。

* 通讯作者。E-mail: xlliu@mail.cnu.edu.cn; sulanb@sina.com

1.2 主要试剂

MS盐(Sigma M5519)、纤维素酶(Sigma C1709)、果胶酶(Sigma P3026)、PI (propidium iodide)、BME (β -mercaptoethanol)购于Sigma公司。RNeasy Plant Mini Kit 购于Qiagen公司。cDNA第1链合成试剂盒、Taq酶购于Takara公司。

1.3 植物材料的培养

拟南芥种子用10%次氯酸钠消毒10分钟, 无菌水冲洗5次, 于4°C避光春化3天, 播种在1/2MS培养基上萌发, 22°C光照培养5天, 光照周期为16小时光照/8小时黑暗。

1.4 原生质体的制备

根据Birnbbaum等(2005)的方法制备原生质体。将70 μm 孔径的滤膜放入小培养皿中, 加入酶解缓冲液(1.5%纤维素酶, 0.1%果胶酶, 600 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇, 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 0.1% BSA, 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 , 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MES, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, pH 5.5), 用刀片切取根尖(长约1 mm)放入酶解缓冲液中, 在水平摇床上以每分钟85转的转速摇动, 25°C避光酶解60分钟。然后将酶解混合物转入离心管中, 在4°C下350 $\times g$ 离心5分钟收集细胞, 除去上清液, 加入1 mL的等渗缓冲液(600 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇, 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 0.1% BSA, 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 , 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MES, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, pH 5.5)重悬, 分别用40 μm 和70 μm 孔径的滤网各过滤1次, 镜检观察细胞的完整性。

1.5 细胞分选

用FACS Aria流式细胞仪(美国BD FACS Aria)分选原生质体中带GFP的细胞。100 μm 喷嘴, 488 nm蓝光激发, 鞘液压力为20 psi。

调节主液流: 选定100 μm 喷嘴, 超声清洗1分钟。开机后, 打开主液流断点窗口, 点击主液流, 调节液流振动幅度(Ampl), 使液滴间隔值(Gap值)稳定, 将调试参数尽量设置到最佳, 保持主液流的连续性和稳定性。

调节分选液流: 主液流稳定后, 打开侧液流窗口电压, 点击Test Sort, 调整参数, 使液流分束清晰。安装四路分选装置, 打开侧液流窗口电压, 点击Test

Sort, 收起废液抽屉, 调整侧液流窗的电压滚动条, 使偏转的分选液流入相应的收集管中。将主液流窗中实际调出的Dmpl值添到默认窗口中。

确定液滴延迟: 运行仪器配套的标准质控物Accrodop Beads, 调整Drop delay值。

确定分选门: 以野生型拟南芥根尖原生质体作为阴性对照建立分选门。分选门的确定基于以下几个原则: 完整的原生质体具有较高的前向角(forward scatter, FSC)和侧向角(side scatter, SSC)比值; 相对于阴性对照, GFP阳性细胞在绿光通道(530 nm)有强烈的发射光。

细胞直接分选至RNA buffer中(Qiagen RTL buffer), 混匀后立刻于-80°C冻存。

1.6 总RNA的提取及纯度和完整度检测

分选的细胞总RNA提取使用RNeasy Plant Mini Kit(Qiagen)试剂盒, 按照试剂盒上的说明进行操作, 并做以下修改: 将RTL的体积调整为细胞悬浮液的3.5倍, 每1 mL RTL中加入10 μL β -巯基乙醇。用微量分光光度计(NanoDrop)检查RNA的纯度, Agilent 2100生物分析仪检测其完整性。

1.7 RT-PCR检测

反转录使用cDNA第1链合成试剂盒(Takara), 20 μL 反应体系, 总RNA量约为300 ng, 按照试剂盒说明进行操作。PCR反应检测看家基因UBIQUITIN(UBQ)基因, 引物序列为正向引物5'-CAAGAGCGCG-ACTGTTTAAAG-3', 反向引物5'-CATTGTGCCA-TTGAATTGAAC-3', PCR产物长度为450 bp。

PCR扩增反应体系为(总体积25 μL): 10 \times PCR buffer 2.5 μL , 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs 4 μL , UBQ正向、反向引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各1 μL , cDNA模板 5 μL , ddH₂O 11 μL , Taq酶(5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0.5 μL 。

PCR扩增程序: 94°C变性2分钟; 94°C 20秒, 58°C 30秒, 72°C 45秒, 扩增30个循环; 72°C 延伸10分钟。取出PCR产物置于4°C冰箱保存, 用1%琼脂糖凝胶电泳检测并拍照。

1.8 激光共聚焦显微观察

拟南芥幼苗用10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的PI染色2分钟, 制成水封装片。在激光共聚焦扫描显微镜Leica SP2(德国

Leica)下观察。原生质体重悬过滤后制成装片,置于激光共聚焦扫描显微镜Leica SP2下观察。

2 结果与讨论

2.1 激光共聚焦显微扫描检测拟南芥转基因株系 *Wer::GFP* 基因的表达部位

*Wer*启动子具有组织专一性,仅在根表皮发育早期的非根毛细胞中具有活性(Lee and Schiefelbein, 1999)。因此,在拟南芥 *Wer::GFP* 转基因植株中, *GFP* 应该仅在根表皮发育早期的非根毛细胞中表达。由于受皮层细胞位置信号决定,根毛细胞和非根毛细胞彼此间隔排列, *Wer* 应该呈现间隔表达的模式。将生长5天的拟南芥幼苗经PI染色后在激光共聚焦扫描



图1 激光共聚焦显微镜观察生长5天的拟南芥幼苗初生根
(A) 转基因拟南芥 *Wer::GFP* 初生根激光共聚焦显微镜观察结果, 聚焦平面在根的静止中心层; (B) 转基因拟南芥 *Wer::GFP* 初生根激光共聚焦显微镜观察结果, 聚焦平面在根的表皮; (C) 野生型拟南芥初生根激光共聚焦显微镜观察结果。Bar=80 μm

Figure 1 Confocal images of primary roots of 5-day-old *Arabidopsis* plants

(A) Confocal image of the primary root of transgenic plant expressing *Wer::GFP*, focus on longitudinal section; (B) Confocal image of the primary root of transgenic plant expressing *Wer::GFP*, focus on epidermal cells; (C) Confocal image of the primary root of wild-type plant. Bar=80 μm

显微镜下观察,绿色荧光仅出现在转基因植株 *Wer::GFP* 的根表皮细胞中(图1A),且呈现间隔表达模式(图1B),而野生型拟南芥初生根无绿色荧光(图1C),与预期结果一致。

2.2 拟南芥根尖非根毛细胞原生质体的收集

收集长1 mm的拟南芥根尖,通过酶解法制备得到根尖原生质体,该原生质体呈圆球状,数目较多,细胞大小在10–30 μm 之间(图2 A, C)。图2 A和图2 B是同一视野下 *Wer::GFP* 根尖原生质体的激光共聚焦显微

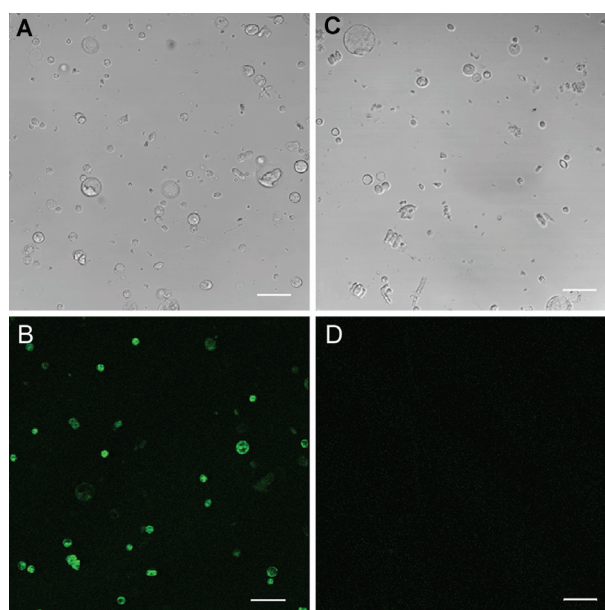


图2 拟南芥根尖细胞原生质体激光共聚焦显微观察结果

(A) 明场观察 *Wer::GFP* 根尖细胞原生质体; (B) 图(A)所示视野 *Wer::GFP* 植物根尖细胞原生质体在波长为488 nm蓝光激发下表达绿色荧光蛋白; (C) 明场观察野生型拟南芥根尖原生质体; (D) 图(C)所示视野中野生型拟南芥根尖原生质体在波长为488 nm蓝光激发下无绿色荧光。Bar=40 μm

Figure 2 Protoplasts isolated from root tips of *Arabidopsis thaliana*

(A) Image of protoplasts isolated from *Wer::GFP* plants under bright field; (B) Image of protoplasts isolated from *Wer::GFP* plants, the majority of cells express GFP; (C) Image of protoplasts isolated from wild-type plant under bright field; (D) Image of protoplasts isolated from wild-type plant expressing no GFP. Bar=40 μm

扫描图, 部分 *Wer::GFP* 原生质体带有绿色荧光, 表明原生质体的制备过程不会使荧光猝灭。野生型拟南芥根尖原生质体无绿色荧光(图2 C, D)。

2.3 FACS分选

以野生型拟南芥根尖原生质体作为阴性对照确定分选门, 采用绿色荧光通道(GFP channel)和橙色荧光通道(orange channel)双参数分析。如图3所示, 横轴表示绿色荧光强度, 纵轴表示橙色荧光强度。野生型拟南芥根尖原生质体不含GFP蛋白, 在波长为488 nm蓝光激发下调整电压参数使其自发绿色荧光和自发橙色荧光的强度近似相等, 整体图形沿对角线分布(图3A)。在相同的参数下, 表达GFP的细胞在488 nm激光激发下呈现绿色, 因此该细胞的绿色荧光明显强于橙色荧光, 即分选门P1所选细胞(图3B), 这些细胞为GFP阳性细胞。不表达GFP的野生型拟南芥根尖原生质体在分选门P1里也有少量阳性点, 可能属于自发荧光的细胞, 但它的细胞数不足 *Wer::GFP* 植物根尖原生质体阳性细胞数的0.1%, 不会对后期的分析造成影响。

2.4 总RNA纯度、完整度的检测及RT-PCR

采用RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) 提取分选细胞的总RNA, 用超微量分光光度计(NanoDrop)测得总RNA的吸光值 A_{260}/A_{280} 比值在1.8–2.1之间、 A_{260}/A_{230} 比值在1.2–1.5之间, 总RNA纯度较高。

为保证实验结果的可靠性, 又采用Agilent 2100生物分析仪检测总RNA的完整度, 检测到28S rRNA、18S rRNA、5S rRNA 3条带, 且28S rRNA带长约为18S rRNA的2倍(图4A), 表明RNA样品完整性较好。

为进一步确定总RNA的质量, 将上述提取的RNA反转录成cDNA, 扩增看家基因 *UBIQUITIN* (*UBQ*)基因片段。扩增产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果如图4B所示, 获得了一条对应于 *UBQ* 的RT-PCR产物(450 bp), 测序结果表明扩增产物正确。

2.5 讨论

我们利用流式细胞仪成功收集到了拟南芥根尖发育早期的非根毛细胞, 并且从中分离出高质量的RNA, 可用于后续基因表达谱及特异基因表达的研究。

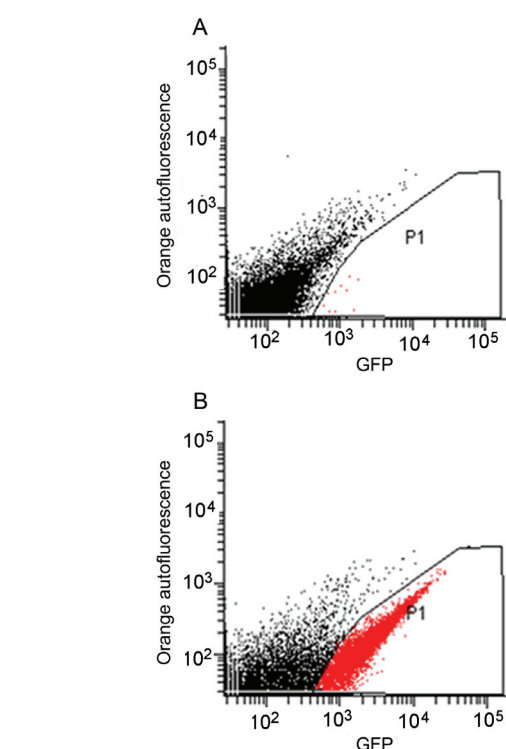


图3 FACS分选散点图

(A) 野生型拟南芥原生质体双参数分析, 说明野生型拟南芥细胞自发荧光, 在绿色荧光通道和橙色荧光通道有近似相等的荧光强度; (B) *Wer::GFP* 原生质体双参数分析, 说明 *Wer::GFP* 转基因植物分选门P1中的细胞散射出的绿色荧光远大于橙色荧光, 这些细胞即是GFP阳性细胞。

Figure 3 Fluorescence-activated cell sorter acquisition dot plots

(A) Biparametric analysis of protoplasts of the wild-type plants, cells have a typical autofluorescence pattern of approximately equal fluorescence in the two channels; (B) Biparametric analysis of protoplasts of the *Wer::GFP* plants. The dense clusters of target protoplasts, which are delimited by the sorting gate, emit more intensely in green than in orange wavelengths, indicating GFP-positive target cells.

利用这种方法能够快速、大量富集所研究的目标细胞, 整个过程仅需要2–3个小时, 大大减少了收集细胞所花费的时间, 提高了实验效率, 并且利用该方法获得的总RNA的完整性较好, 能够保证实验的准确性。

目前分选特定细胞的技术还有激光捕获技术, 但利用该技术时必须杀死所研究的组织或器官, 然后固

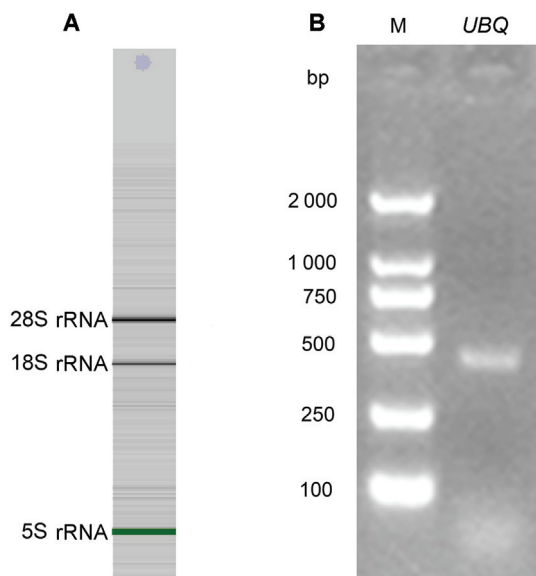


图4 总RNA的质量检测

(A) 总RNA在Agilent 2100生物分析仪中的检测结果; (B) 看家基因UBQ的RT-PCR扩增产物电泳图。M: DNA分子量标准; UBQ: UBIQUITIN

Figure 4 Total RNA quality analysis

(A) Image of total RNA detected by Agilent 2100 bioanalyzer; (B) RT-PCR for housekeeping gene *UBQ*. M: DL2000 DNA marker; UBQ: UBIQUITIN

定、包埋和切片, 暴露出所研究的目标细胞, 并通过激光捕获仪进行切割, 分离该目标细胞(Kerk et al., 2003)。由于分离细胞花费的时间很长, 大约需要4–5天, 并且实验过程复杂, 细胞经过切片, 分离出的RNA完整度大大降低, 影响实验结果的准确性(未发表资料)。

利用流式细胞仪技术分选特定细胞已经用于动物、植物、微生物及细胞生物学方面的研究, 并且取得了很好的研究成果(Birnbaum et al., 2005; Zhang et al., 2008; 李璐等, 2009)。但是流式细胞仪技术分选的细胞中常常混有其它细胞, 还需要研究出信号更特异的标记物, 减少假阳性细胞的出现。我们相信流式细胞仪技术在今后的研究工作中将会有更广泛的应用。

参考文献

- 李璐, 刘向宇, 李德山 (2009). 应用流式细胞仪分选中性粒细胞的研究. *东北农业大学学报* **4**, 52–59.
- Birnbaum K, Jung JW, Wang JY, Lambert GM, Hirst JA, Galbraith DW, Benfey PN (2005). Cell type-specific expression profiling in plants via cell sorting of protoplasts from fluorescent reporter lines. *Nat Methods* **2**, 615–619.
- Birnbaum K, Shasha DE, Wang JY, Jung JW, Lambert GM, Galbraith DW, Benfey PN (2003). A gene expression map of the Arabidopsis root. *Science* **302**, 1956–1960.
- Galbraith DW, Birnbaum K (2006). Global studies of cell type-specific gene expression in plants. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 451–475.
- Kerk NM, Ceserani T, Tausta SL, Sussex IM, Nelson TM (2003). Laser capture microdissection of cells from plant tissues. *Plant Physiol* **132**, 27–35.
- Lee MM, Schiefelbein J (1999). *WEREWOLF*, a MYB-related protein in Arabidopsis, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell* **99**, 473–483.
- Masucci JD, Rerie WG, Foreman DR, Zhang M, Galway ME, Marks MD, Schiefelbein JW (1996). The homeobox gene *GLABRA2* is required for position-dependent cell differentiation in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **122**, 1253–1260.
- Nawy T, Lee JY, Colinas J, Wang JY, Thongrod SC, Malamy JE, Birnbaum K, Benfey PN (2005). Transcriptional profile of the Arabidopsis root quiescent center. *Plant Cell* **17**, 1908–1925.
- Scheres B, Benfey P, Dolan L (2002). Root development. *The Arabidopsis Book*. doi: 10.1199/tab.0101.
- Scheres B, van den Toorn H, Heidstra R (2004). Root genomics: towards digital *in situ* hybridization. *Genome Biol* **5**, 227–227.
- Wada T, Tachibana T, Shimura Y, Okada K (1997). Epidermal cell differentiation in Arabidopsis determined by a Myb-homolog, CPC. *Science* **277**, 1113–1116.
- Zhang C, Barthelson RA, Lambert GM, Galbraith DW (2008). Global characterization of cell-specific gene expression through fluorescence-activated sorting of nuclei. *Plant Physiol* **147**, 30–40.

Flow Cytometry Sorting of Early Developmental Non-hair Cells in Roots of *Arabidopsis thaliana*

Fei Li[†], Yong Hu[†], Fan Wang, Zhen Zhang, Xianglin Liu^{*}, Sulan Bai^{*}, Yikun He

College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048, China

Abstract We developed a method for sorting specific cells from *Arabidopsis thaliana*. We used *Wer::GFP* transgenic lines as the experimental material; laser scanning confocal microscopy was used to identify the green fluorescent protein (GFP) location; enzymatic digestion was used to prepare root tip protoplasts; fluorescence-activated cell sorting (FACS) was used to collect GFP-positive cells; and total RNA was extracted from these cells. Only the early developmental non-root hair cells in the root epidermis expressing GFP in *Wer::GFP* transgenic lines. A large number of root-tip protoplasts were obtained by enzymatic digestion, and GFP-positive cells were successfully collected by FACS. The RNA extracted from these specific cells could be used for gene expression profiling. We have established a successful method for sorting specific cells by flow cytometry.

Key words *Arabidopsis thaliana*, flow cytometry, fluorescent-activated cell sorting, non-hair cell, protoplast

Li F, Hu Y, Wang F, Zhang Z, Liu XL, Bai SL, He YK (2010). Flow cytometry sorting of early developmental non-hair cells in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Chin Bull Bot* **45**, 460–465.

[†] These authors contributed equally to this work.

^{*} Authors for correspondence. E-mail: xliu@mail.cnu.edu.cn; sulanb@sina.com