

· 特邀专家方法 ·

植物基因组学中的流式细胞分析及分选技术

夏春皎, 李运广, 夏姝, 庞伟, 陈春丽*

华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070

摘要 流式细胞术是一种高通量技术, 可以同时快速检测单个颗粒物的多项物理及生物学特征。随着测序成本的大幅降低, 流式细胞术在植物基因组学高通量样品获取中的作用日益凸显。该文以水稻(*Oryza sativa*)和大豆(*Glycine max*)为例, 详细介绍了应用流式细胞术对植物细胞核进行精细分选以及后续的ATAC-seq和RNA-seq实验分析流程, 为农业生物育种中基因的高效挖掘提供了优选工具。同时针对实验操作中的关键技术和常见问题, 如细胞核制备注意事项、分选纯度与效率的平衡及单细胞分选调试方法进行分析并提出建议, 为植物科学工作者应用流式细胞术开展基因组学研究提供参考。

关键词 植物, 流式细胞术, 细胞核, 分选, ATAC-seq, RNA-seq

夏春皎, 李运广, 夏姝, 庞伟, 陈春丽 (2024). 植物基因组学中的流式细胞分析及分选技术. 植物学报 59, 774–782.

流式细胞术(flow cytometry, FCM)是应用流式细胞仪进行分析及分选的技术。传统的流式细胞仪根据其功能可分为分析型和分选型。分析型流式细胞仪由流体系统、光学系统和电子系统组成; 而分选型流式细胞仪则在此基础上增加了分选系统(图1)。自20世纪70年代以来, 流式细胞术在检测性能、多参数测量能力和分选能力方面得到显著提升, 流式分选仪从1个激光器、2个检测通道的简单设备, 发展至多激光器、多通道检测系统(Kamentsky et al., 1965; Shapiro, 2003; 杭海英等, 2019)。流式分析原理基于细胞或颗粒在流体中单个通过激光束时产生的光散射和荧光信号的测量(Büscher, 2019)。细胞或颗粒所带的荧光素被激发后发射出荧光, 被透镜收集, 通过二向色镜和滤光片分离并导向相应的检测器, 在检测器内转化为光电流信号, 并通过模数转换器转化为数字信号, 以散点图和直方图的形式呈现。在流式分析的基础上, 流式分选以物理手段分离出具有特定特征的细胞群体(Büscher, 2019)。当识别出目标细胞后, 这些细胞在通过喷嘴且即将被断点为液滴之前会被加电, 随后这些带电的液滴通过电场。根据液滴的电荷正负和大小, 它们在电场向不同方向偏转。通过这种电荷引导的偏转, 将这些目标细胞分离到收集管中, 用于后续

研究和应用。

与动物细胞相比, 植物细胞具有细胞壁和液泡等特殊结构, 细胞大小、形态和生理状态差异大, 这给植物样品的制备和分析带来了许多困难。1983年, Galbraith等(1983)成功地将流式细胞术应用于植物细胞周期的测定, 并于1984年通过调整流式细胞仪的喷嘴尺寸和优化压力设置, 成功分选出植物体细胞融合产生的异核体原生质体, 再通过培养使其再生为正常植株(Galbraith et al., 1984)。此后, 流式细胞术在植物基因组学、细胞生物学和发育生物学等领域得到广泛应用。

制备具有良好分散性的单颗粒悬浮样品是进行流式分析和分选的关键步骤(Reichard and Aso-singh, 2019)。通过特定的细胞核解离缓冲液(表1), 用刀片切碎组织(叶、茎、根、花及种子等)制成细胞核悬浮液, 结合碘化丙啶(propidium iodide, PI)或4,6-二脒基-2-苯基吲哚(4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色, 利用流式细胞术能够快速准确地进行植物基因组大小测定、细胞周期分析、倍性分析以及DNA含量变异研究(Galbraith et al., 1983; Doležel et al., 2007; Sliwinska et al., 2022)。通过温和的酶解法制备植物原生质体, 可实现对特定类型细胞的分选和

收稿日期: 2024-07-18; 接受日期: 2024-08-20

基金项目: 农业生物育种国家科技重大专项(No.2023ZD04073)和华中农业大学研究生培养条件建设(No.2024SC03)

* 通讯作者。E-mail: chenchunli@mail.hzau.edu.cn

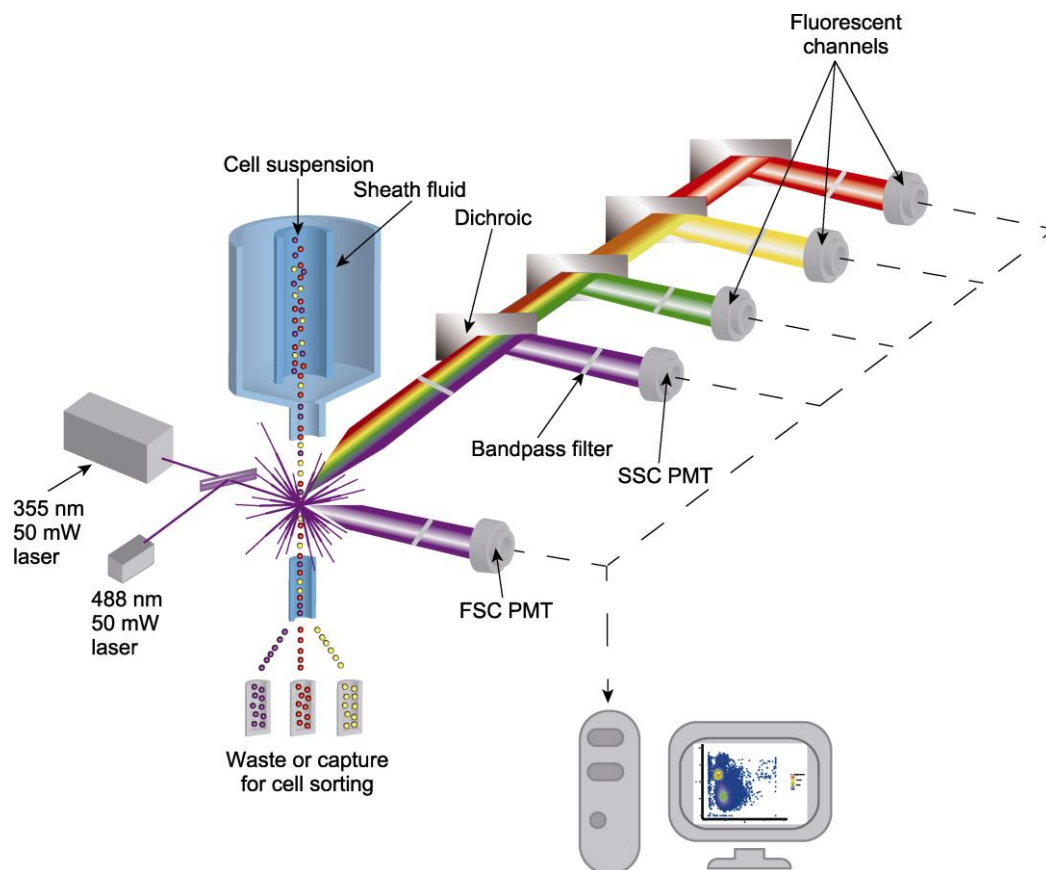


图1 流式细胞仪的基本结构

SSC: 侧向散射通道; FSC: 前向散射通道; PMT: 光电倍增管

Figure 1 Basic structure of flow cytometer

SSC: Side scatter channel; FSC: Forward scatter channel; PMT: Photomultiplier tube

表1 几种代表性的植物细胞核解离缓冲液

Table 1 Several representative plant cell nucleus dissociation buffers

Names	Components	Applications
Galbraith's (Galbraith et al., 1983)	45 mmol·L ⁻¹ MgCl ₂ , 30 mmol·L ⁻¹ sodium citrate, 20 mmol·L ⁻¹ MO-PS, 0.1% (v/v) TritonX-100, pH7.0	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Glycine max</i>
LB01 (Dpooležel et al., 1989)	15 mmol·L ⁻¹ Tris, 2 mmol·L ⁻¹ Na ₂ EDTA, 0.5 mmol·L ⁻¹ spermine, 80 mmol·L ⁻¹ KCl, 20 mmol·L ⁻¹ NaCl, 0.1% (v/v) TritonX-100, 15 mmol·L ⁻¹ β-mercaptoethanol, pH7.0–8.0	<i>Oryza sativa</i> , <i>Chrysanthemum indicum</i> , <i>Solanum lycopersicum</i>
Otto's (Otto, 1992; Dolezel and Gohde, 1995)	OTTO I: 100 mmol·L ⁻¹ citric acid, 0.5% (v/v) Tween-20, pH2.0–3.0; OTTO II: 400 mmol·L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O, pH8.0–9.0	<i>Ranunculus japonicus</i> , <i>O. sativa</i>
Tris-MgCl ₂ (Pfosser et al., 1995)	200 mmol·L ⁻¹ Tris, 4 mmol·L ⁻¹ MgCl ₂ ·6H ₂ O, 0.5% (v/v) TritonX-100, pH7.5	<i>Centaurea cyanus</i> , <i>Celtis australis</i>
GPB (Loureiro et al., 2007)	0.5 mmol·L ⁻¹ spermine, 30 mmol·L ⁻¹ sodium citrate, 20 mmol·L ⁻¹ MOPS, 80 mmol·L ⁻¹ KCl, 20 mmol·L ⁻¹ NaCl, 0.5% (v/v) TritonX-100, pH7.0	<i>O. sativa</i> , <i>Actinidia chinensis</i>
WPB (Loureiro et al., 2007)	0.2 mol·L ⁻¹ Tris-HCl, 4 mmol·L ⁻¹ MgCl ₂ ·6H ₂ O, 2 mmol·L ⁻¹ EDTA Na ₂ ·2H ₂ O, 86 mmol·L ⁻¹ NaCl, 10 mmol·L ⁻¹ sodium pyrosulfite, 1% PVP-10, 1% (v/v) TritonX-100, pH7.5	<i>Vitis vinifera</i> , <i>Quercus robur</i>
PVPK12-mGB2 (Zhang and Feng, 2023)	30 mmol·L ⁻¹ sodium citrate, 45 mmol·L ⁻¹ MgCl ₂ , 20 mmol·L ⁻¹ MO-PS, 20 mmol·L ⁻¹ NaCl, 20 mmol·L ⁻¹ EDTA Na ₂ ·2H ₂ O, 0.1% (v/v) TritonX-100, 0.5% (v/v) Tween-20, 10 μL·mL ⁻¹ β-mercaptoethanol, 1%–2% PVPK12, pH7.0	Silicone fast-drying plant materials

富集。例如,利用特异性荧光标记基因分选玉米(*Zea mays*)根尖内皮层细胞(Ortiz-Ramírez et al., 2018)及拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)根尖发育早期非根毛细胞(李斐等, 2010);利用特化细胞不同的自发荧光分选长春花(*Catharanthus roseus*)特化叶原生质体(Guedes et al., 2022)。通过瞬时转化植物原生质体可以分析评估基因表达、靶向突变、蛋白质互作、细胞周期以及启动子活性状态等(Taher, 2017; Lin et al., 2018; Decaestecker et al., 2022)。此外,通过羟基脲(hydroxyurea, HU)同步化制备植物根尖细胞染色体悬浮液,并成功应用于多种植物染色体的分选(Doležel et al., 1992, 2021; Cápál et al., 2023),为复杂基因组的结构解析和物理图谱构建奠定了基础。这对于多倍体作物如小麦(*Triticum aestivum*)和大麦(*Hordeum vulgare*)的基因定位及组学研究尤为关键(Šafař et al., 2004; Mayer et al., 2011; International Wheat Genome Sequencing Consortium, 2014; Said et al., 2019)。流式细胞术的发展体现了生物技术领域的重要进步,使得细胞水平的复杂生物过程得到更精细的分析和深入理解。在植物科学领域,随着高通量测序成本的降低以及组学研究手段的发展,通过流式分选植物原生质体或细胞核,已成为构建单细胞转录组、蛋白质组和表观遗传图谱的重要手段(Petrovská et al., 2014; Kawakatsu et al., 2016; Xu et al., 2021; Sun et al., 2022)。Xu等(2021)通过流式分选玉米穗原生质体构建了单细胞转录组图谱。而Sun等(2022)则通过分选单个细胞核进行RNA-seq,揭示了玉米表皮组织中气孔细胞的类型和发育路径。

尽管植物单颗粒悬浮样品的制备仍面临诸多困难,且专家曾对组学样品制备中使用细胞核还是原生质体展开过热烈讨论(Marx, 2016),但流式细胞术的应用优化策略和技术创新为研究人员铺平了道路。Grindberg等(2013)通过比较细胞和细胞核内转录组数据,发现细胞核转录组结果与细胞高度一致。Guillotín等(2023)对禾本科单细胞和单个细胞核转录组的联合和独立分析产生的细胞簇聚类呈现相同的基本生物学模式。这些结果显示流式细胞术在原生质体和细胞核分析中的可靠性。流式细胞术在植物基因组学中的应用不仅加深了人们对植物细胞生物学的理解,还为作物遗传改良、功能基因组研究和复杂性状解析提供了新的视角和策略。

本文以水稻(*Oryza sativa*)和大豆(*Glycine max*)为例,分别介绍水稻幼穗细胞核的制备、分选和下游ATAC-seq (assay for transposase accessible chromatin with high-throughput sequencing)实验,以及大豆根瘤细胞核的制备、分选和下游RNA-seq (RNA sequencing)实验的操作流程。

1 实验材料

水稻(*Oryza sativa* L.) 1–2 mm幼穗。大豆Williams 82 (*Glycine max* (L.) Merr.)接种高效固氮大豆慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110),取所需发育时期的根瘤(Fan et al., 2022)。

2 试剂与耗材

水稻细胞核解离缓冲液LB01和大豆细胞核解离缓冲液Galbraith's buffer (表1),过滤除菌之后分装,于–20°C冻存。若分选细胞核进行下游RNA-seq实验,需要在解离缓冲液中加入RNA酶抑制剂以及稀释50倍的Complete Protease Inhibitor Cocktail。不同植物材料适用的细胞核解离缓冲液可参考表1。

DAPI (Sigma, Cat No.D5942)储备溶液:用预冷的无菌超纯水溶解DAPI干粉至浓度为0.1 g·L⁻¹,分装保存于–20°C。

其它试剂与耗材包括双面剃须刀片(舒适牌)、CellTrics® 20和30 μm一次性过滤器(Sysmex Partec, Cat No.04-0042-2315/2316)、Falcon 35 μm尼龙网细胞过滤器帽(BD Biosciences, Cat No.352235)、无菌包装的60 mm一次性塑料培养皿、RNA酶抑制剂、RNA抽提试剂TRIzol (Life Technologies, Cat No.15596-026)、微量RNA抽提试剂盒(天根, Cat No.DP-420)及ATAC-seq建库试剂盒(诺唯赞, Cat No.TD501)。

3 实验仪器及相关耗材

BD Aria SORP分选型流式细胞仪、BD™ CS&T beads和BD™ AccuDrop Beads。

4 实验设计思路

采用流式分选获取植物基因组学高通量样品主要包括3种形式:细胞核、原生质体和染色体。根据实验

目的选择合适的样品形式。总体而言,细胞核适用于大部分常规的组学实验,如ATAC-seq、RNA-seq和WGBS (whole genome bisulfite sequencing)。制备具有优异分散性的单细胞核悬浮液是关键,针对不同植物及组织部位,需测试优化合适的细胞核解离缓冲液。在启动流式细胞仪进行样本分选之前,需确保仪器运行状态的准确性与稳定性,可通过使用标准微球进行系统校验及执行预分选来实现。此外,合适的分选参数设置可确保植物细胞核样品在经历分选后仍然保持活性和结构完整性,如低温上样、低温收集、合适的鞘液样品压力差,从而为下游的组学研究提供可靠的生物学材料。因此,维持细胞核的活性与完整性不仅是整个技术流程的核心,更是保障研究结果准确性和生物学意义的关键。

5 实验流程

5.1 样品制备

5.1.1 细胞核悬浮液制备

在冰上放1个直径60 mm的塑料平皿,在平皿下放平整磁铁板,以便切碎样品,在平皿中滴加少量细胞核解离缓冲液。将3–5个水稻幼穗放入冰冷的缓冲液中,用锋利的刀片快速切碎以释放细胞核,用30 μm 尼龙网过滤器过滤,收集滤液于流式管中。为保证细胞核的完整性,以上操作均在冰上进行。对于大豆根瘤样品,需用水清洗根部泥沙,并用纯净水漂洗,用无尘

纸吸干根瘤组织上的水,用镊子摘取根瘤,立即放入冰冷的细胞核解离缓冲液中,悬浮液制备方法同水稻。若后续进行RNA-seq,则所有器皿耗材及操作过程要确保无RNA酶污染。

5.1.2 染色

向0.5 mL过滤后的细胞核悬浮液中加入终浓度为4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ DAPI,轻柔混匀后避光冰上孵育染色5分钟,即可上机。

5.2 流式分析

染色后,将细胞核悬浮液样品用流式细胞仪进行倍性分析,所用激光器为355激光器,检测通道为450/50。根据FSC vs SSC、DAPI-W vs DAPI-A和DAPI-A直方图设定细胞核门,进行倍性分析并记录数据(图2)。每个样本收集记录20 000个颗粒(events, evts),并导出fcs 3.0格式文件,利用FlowJo软件进一步进行倍性批量分析。水稻幼穗样品为分生组织,有显著的2C和4C峰。

5.3 细胞核分选及下游ATAC-seq及RNA-seq

分选前对仪器状态进行调试,分选水稻细胞核用70 μm 喷嘴,分选大豆根瘤细胞核用85 μm 喷嘴,采用BD™ AccuDrop Beads进行自动液滴延迟计算。将进样仓温度设定为4°C,收集托架进行预冷,打开电压,调整收集通道的偏转角度,确保分选细胞核落入收集管中央。分选水稻和大豆细胞核均选择4路管式分选。

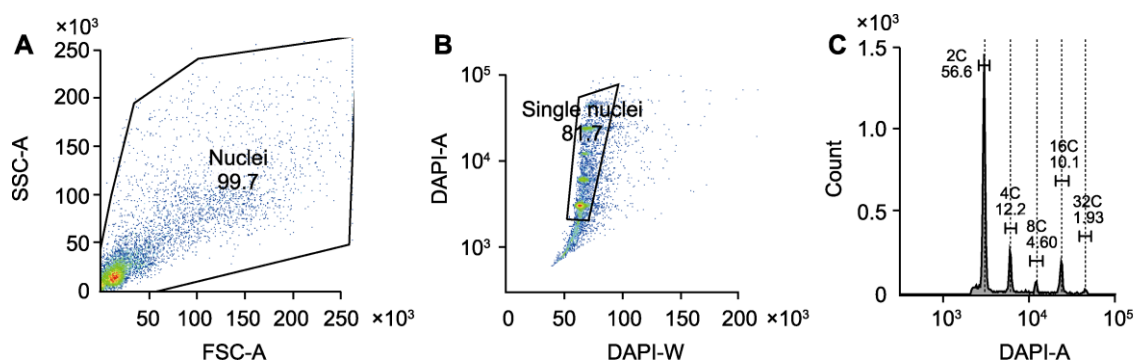


图2 大豆根瘤细胞核不同DNA倍性分析

(A) 通过FSC-A与SSC-A双参数设定总细胞核门; (B) 通过DAPI-W和DAPI-A设定单细胞核门; (C) 通过DAPI-A直方图设定不同DNA倍性的细胞核门。SSC和FSC同图1。DAPI: 4,6-二脒基-2-苯基吲哚

Figure 2 Analysis of different DNA ploidy levels in nuclei of soybean nodule cells

(A) Total nucleus gate was set by FSC-A and SSC-A dual parameters; (B) Single nuclei gate was set by DAPI-W and DAPI-A; (C) Nuclei gate for different DNA ploidy levels was set by DAPI-A histogram. SSC and FSC are the same as shown in Figure 1. DAPI: 4,6-diamidino-2-phenylindole

对于水稻常规ATAC-seq实验(Zhu et al., 2024), 所需细胞核约10万个, 用3–5个幼穗制备约0.5 mL样品可以在3分钟内分选获得10万个细胞核, 采用1.5 mL离心管收集, 4°C、500 ×g离心10分钟, 去上清, 保留约10 μL, 按照诺唯赞试剂盒(Cat No.TD501)实验流程进行酶切纯化和建库, 也可以用实验室自制的Tn5进行酶切建库(Zhu et al., 2020)。10万个细胞核建议扩增循环11次, 可减少PCR导致的重复, 提高数据质量。

对于大豆根瘤样品, 选择接种后12天和接种后20天的新鲜根瘤, 用DEPC水清洗数次, 置于冰上预先加入少许细胞核解离缓冲液(含蛋白酶抑制剂和RNA酶抑制剂)的平皿中, 制样方法同水稻。预先在收集管中加入800 μL TRIzol, 分别收集10万个2C、10万个4C、10万个8C和8万个16C倍性的细胞核。由于收集的细胞核需进行RNA提取, 因此样品分选时间控制在25分钟以内, 以减少细胞核内RNA降解。同一批材料每个倍性收集2管作为重复, 分2批材料, 共收集16管细胞核。随后进行RNA抽提, 向管中加入200 μL 氯仿, 轻柔混匀, 室温放置3分钟, 于4°C、12 000 ×g离心15分钟, 将液体转移至0.5倍体积的无水乙醇中, 离心后, 将RNA重悬并转移至迷你纯化柱(微量样品RNA抽提试剂盒, 天根), 后续按照试剂盒说明书进行提取。提取的细胞核总RNA直接送测序公司进行微量建库及双端150 bp (PE150)测序。一般二倍体测序3×10⁷条序列, 异源四倍体测序5×10⁷条序列。

5.4 ATAC-seq和RNA-seq数据分析

ATAC-seq数据分析流程包括6步。(1) 测序数据质控: 使用FastQC软件评估测序质量、接头污染及碱基组成, 采用Trimmomatic软件去除接头序列。(2) 基因组比对: 使用BWA将质控后的读段双端比对到水稻参考基因组, 用SAMtools去除PCR重复读段并过滤比对质量低于30的读段。(3) 鉴定染色质开放区: 用MACS2进行peak calling, 鉴定染色质开放区。(4) 样品文库质控: 为了检测ATAC-seq文库质量并保留高质量数据用于后续分析, 对样品读段数、比对率、重复率、TSS富集以及peak中读段的比例(FRiP)进行统计。(5) 数据可视化: 使用BEDTools或deepTools生成大规模信号轨迹文件, 并加载到IGV或UCSC基因组浏览器中, 进行可视化检查。(6) 下游分析: 使用

DiffBind或DESeq2进行样本间差异开放染色质分析; 使用HOMER或MEME Suite识别开放染色质区域中转录因子结合基序; 使用GREAT或Enrichr进行开放染色质区域相关基因的功能富集分析(Smith and Sheffield, 2020)。

RNA-seq数据分析流程包括4步。(1) 测序数据质控: 利用FastQC软件对大豆根瘤2个发育时期不同倍性细胞核16个RNA样本序列进行测序质量检测, 利用Trimmomatic软件去除接头及低质量的碱基。(2) 基因组比对: 将过滤后的数据利用hisat2软件比对到Williams 82参考基因组上。(3) 基因表达量化: 利用cufflinks中的cuffnorm软件对唯一比对的读段(reads)进行表达定量, 获得TPM值(transcripts per million)。使用R语言edgeR软件包中的TMM方法进行均一化处理, TPM+1后取以2为底的对数, 然后用sva软件包中的ComBat函数去除批次效应, 再还原为TPM值, 取2个生物学重复的平均值, 最终获得8种细胞核的RNA表达量数据。(4) 差异表达分析: 为获得无偏的差异表达基因, 同时考虑到离群值(outliers)和低表达量基因容易造成假阳性, 将TPM值加上一个小数s₀, 取以2为底的对数, 再计算每个基因的第二最大值和第二最小值之间的差异作为该基因的样本间差异, 根据目的取差异最大的1 000个或2 500个基因用于不同分析。本例中s₀的取值为所有样本中基因表达量的中位数。用Pheatmap函数进行基因表达趋势热图展示, 其中log₂(TPM)值通过Z-Score标准化。

6 注意事项和常见问题

6.1 细胞核制备注意事项

- (1) 所有操作尽可能在低温和无菌条件下进行, 以保持细胞核的完整性和活性。
- (2) 添加适量的蛋白酶抑制剂及维持适当的pH值以防止DNA降解。
- (3) 选择合适的DNA染料对于后续的流式分析至关重要。染料的选择取决于具体的分析目的和设备配置。对于基因组大小测定, 常使用非特异性荧光染料PI, 由于PI可以结合到双链RNA和DNA上, 大多数用于评估基因组大小的PI染色方案通常包括RNase处理。然而, 植物匀浆常含有内源性RNase, 可能抵消RNA对PI荧光的影响。在分析富含RNA的组织(如分

生组织和种子)时需要添加外源性RNase。使用叶片匀浆进行基因组大小测量的最佳PI浓度通常为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在此浓度下,核染色几乎达到饱和,双倍大小的细胞核显示出完全双倍的荧光,且峰值的变异系数(coefficient of variation, CV)最低。碱基特异性荧光染料(如DAPI和Horchest)常用于基因组大小初步评估、倍性检测和种内基因组大小变异的测量。如果AT和GC比例不均衡,可能会造成一定的偏差;如果分选的细胞核要进行RNA测序,则要对整个系统进行去RNA酶处理,包括鞘液和样品制备过程的试剂及器材。

6.2 在FSC/SSC散点图上细胞核和碎片无法区分

由于植物细胞有细胞壁,且不同组织部位大小各异、多倍体性以及不同细胞周期等因素也会导致细胞核大小不一,因此在FSC/SSC散点图上很难看到明显的聚团现象,建议不采用FSC参数设定阈值,而使用特定的DNA荧光染料(如DAPI)设定阈值。如将DAPI阈值设定为1 000,通过调节电压,可移动的是细胞核,聚集在左下角不能移动的是碎片,通常在散点图上画P1门时尽可能多的圈入evts,在DAPI-A/DAPI-W散点图上圈P2单细胞核门,之后在DAPI-A直方图上可以显示细胞核的峰图。

6.3 进行基因组大小评估或倍性检测时未出峰

在一系列测量开始之前,先检查仪器是否已正确设置并正常运行,如激光器是否开启、阈值是否设定正确。使用标准的校准微球确保设备配置无误。通过双向调整电压,排除电压过低导致峰被阈值掩盖,或者电压过高超出仪器的检测限。调整电压至合适值以使直方图上相对荧光最低的细胞核峰值清晰地与荧光较低的碎片区分开。

此外,要确保样品的正确制备,使用合适的细胞核解离缓冲液,优化组织匀浆条件,确保细胞核始终处于低温状态;采用刀切方式时要确保刀片的锋利度,并及时更换刀片。确保样品新鲜,避免细胞降解或损伤。通过相应的细胞核DNA染色,并在荧光显微镜下镜检,以确定样品的质量。细胞核荧光染料浓度不宜太高,否则会增加背景信号,降低信噪比。合适的染料浓度是在尽量降低背景信号的前提下获得理想的信号峰图。

测量基因组大小通常选择内标法,可选择1-2种与待测基因组大小比较接近的对照基因组样品,与目的样品同管制样上机,通过比较对照基因组的相对荧光强度值评估目的基因组大小。在混合样品之前先通过单独制样,保持染色条件一致,并在相同的电压下上样,以在流式峰图上能单独出1个峰、不相互重叠的材料作为内标。

6.4 分选细胞核纯度低及回收率不高

首先,样品制备是关键。选择合适的解离缓冲液可大大降低核碎片。合适的缓冲液还能提高细胞核的游离效果,增加样品中细胞核的浓度。

其次,优化分选参数,纯度和得率通常相互制约。根据实验目的选择合适的分选模式,主要包括3种: single cell模式所得纯度最高,但损失得率,而且分选速度慢,适用于单细胞基因表达分析和克隆培养; yield模式可最大程度地富集目的细胞,分选速度快,但损失纯度,适用于需要大量细胞的实验; purity模式适中,可获得较高纯度的分选细胞,用于要求相对较高的下游实验。喷嘴大小通常选择分选细胞直径的3倍以上,喷嘴孔径太小会造成液流不稳定、堵塞或者细胞机械损伤。采用恰当的逻辑关系设置分选门,逻辑关系太复杂会降低分选效率。确保液流稳定及上样流速适中,流速越快,检测CV越大,回收纯度降低。

最后,为确保正确分选,可将分选产物进行回测,以确定目的细胞分布正常,也可通过镜检验证分选效果。

6.5 单细胞分选漏孔或错位

首先,确保仪器状态正常,可以通过校准样品测试,对于单细胞分选,调整A1孔偏转角度至精确位置。测试分选时,确保细胞准确落在96孔或384孔板A1孔的中央,并通过显微镜检查确认。其次,通过分选50 evts微球测试不同位置的孔以验证分选角度的准确性。最后,将调整好的参数用于后续分选实验。

6.6 分选的植物原生质体不完整或碎片多

制备高质量的原生质体是关键。采用温和的细胞壁酶解条件,酶解后通过低速离心去除消化酶,使用合适的缓冲液维持原生质体的渗透压和pH值,并且尽快

上机分选。流式细胞仪分选参数设置要注意流速和压力都要低,选择较大口径的喷嘴进行植物原生质体分选,通常原生质体的大小要小于喷嘴直径的1/3,以减少机械损伤,提高分选细胞活性。

流式细胞术已成为现代植物科学研究中不可或缺的重要工具。然而,由于植物细胞结构和生理状态的特殊性,流式细胞术在植物研究中的应用仍面临着诸多困难,如植物细胞的自发荧光干扰、细胞大小和形态的异质性以及细胞壁的存在。此外,尽管流式细胞术能够实现植物细胞水平的高通量分析和分选,但在空间分辨率和形态信息方面仍存在局限性。未来,流式细胞术与显微成像和空间转录组等技术相结合,将有助于实现对植物组织和细胞的多维度、多尺度分析,为植物生命活动的精细解析提供更全面深入的信息(Nitta et al., 2018; Schraivogel et al., 2022; Bressan et al., 2023)。随着技术的不断进步和跨学科融合,流式细胞术在植物科学中的应用潜力将持续增大,并推动植物基因组学研究进入更精细化和系统化时代。

作者贡献声明

陈春丽:研究总体构思及设计;夏春皎:设计并完成实验,撰写论文;李运广,夏姝:提供流式技术支持;庞伟:作图。

参考文献

- Bressan D, Battistoni G, Hannon GJ (2023). The dawn of spatial omics. *Science* **381**, eabq4964.
- Büscher M (2019). Flow cytometry instrumentation—an overview. *Curr Protoc Cytom* doi: 10.1002/cpcy.52.
- Cápal P, Said M, Molnár I, Doležel J (2023). Flow cytometric analysis and sorting of plant chromosomes. In: Heitkam T, Garcia S, eds. *Plant Cytogenetics and Cytogenomics*. New York: Humana. pp. 177–200.
- Decaestecker W, Bollier N, Buono RA, Nowack MK, Jacobs TB (2022). Protoplast preparation and fluorescence-activated cell sorting for the evaluation of targeted mutagenesis in plant cells. In: Wang K, Zhang F, eds. *Protoplast Technology*. New York: Humana. pp. 205–221.
- Doležel J, Číhalíková J, Lucretti S (1992). A high-yield procedure for isolation of metaphase chromosomes from root tips of *Vicia faba* L. *Planta* **188**, 93–98.
- Doležel J, Göhde W (1995). Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry* **19**, 103–106.
- Doležel J, Greilhuber J, Suda J (2007). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nat Protoc* **2**, 2233–2244.
- Doležel J, Lucretti S, Molnár I, Cápal P, Giorgi D (2021). Chromosome analysis and sorting. *Cytometry A* **99**, 328–342.
- Dpooležel J, Binarová P, Lucretti S (1989). Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biol Plant* **31**, 113–120.
- Fan W, Xia CJ, Wang SX, Liu J, Deng LJ, Sun SY, Wang XL (2022). Rhizobial infection of 4C cells triggers their endoreduplication during symbiotic nodule development in soybean. *New Phytol* **234**, 1018–1030.
- Galbraith DW, Afonso CL, Harkins KR (1984). Flow sorting and culture of protoplasts: conditions for high-frequency recovery, growth and morphogenesis from sorted protoplasts of suspension cultures of nicotiana. *Plant Cell Rep* **3**, 151–155.
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, Firoozabady E (1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* **220**, 1049–1051.
- Grindberg RV, Yee-Greenbaum JL, McConnell MJ, Novotny M, O'Shaughnessy AL, Lambert GM, Araúzo-Bravo MJ, Lee J, Fishman M, Robbins GE, Lin XY, Venepally P, Badger JH, Galbraith DW, Gage FH, Lasken RS (2013). RNA-sequencing from single nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 19802–19807.
- Guedes JG, Guimaraes AL, Carqueijeiro I, Gardner R, Bispo C, Sottomayor M (2022). Isolation of specialized plant cells by fluorescence-activated cell sorting. In: Fett-Neto AG, ed. *Plant Secondary Metabolism Engineering*. New York: Humana. pp. 193–200.
- Guillot B, Rahni R, Passalacqua M, Mohammed MA, Xu XS, Raju SK, Ramírez CO, Jackson D, Groen SC, Gillis J, Birnbaum KD (2023). A pan-grass transcriptome reveals patterns of cellular divergence in crops. *Nature* **617**, 785–791.
- Hang HY, Liu CC, Ren DD (2019). Development, application and prospection of flow cytometry. *China Biotechnol* **39**(9), 68–83. (in Chinese)
- 杭海英, 刘春春, 任丹丹 (2019). 流式细胞术的发展、应用及前景. *中国生物工程杂志* **39**(9), 68–83.
- Kamentsky LA, Melamed MR, Derman H (1965). Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis. *Science* **150**, 630–631.
- Kawakatsu T, Stuart T, Valdes M, Breakfield N, Schmitz RJ, Nery JR, Urich MA, Han XW, Lister R, Benfey PN,

- Ecker JR** (2016). Unique cell-type-specific patterns of DNA methylation in the root meristem. *Nat Plants* **2**, 16058.
- 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. (in Chinese)
- 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.
- Lin CS, Hsu CT, Yang LH, Lee LY, Fu JY, Cheng QW, Wu FH, Hsiao HCW, Zhang YS, Zhang R, Chang WJ, Yu CT, Wang W, Liao LJ, Gelvin SB, Shih MC** (2018). Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: from single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. *Plant Biotechnol J* **16**, 1295–1310.
- Loureiro J, Rodriguez E, Doležel J, Santos C** (2007). Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. *Ann Bot* **100**, 875–888.
- Marx V** (2016). Plants: a tool box of cell-based assays. *Nat Methods* **13**, 551–554.
- Mayer KFX, Martis M, Hedley PE, Šimková H, Liu H, Morris JA, Steuernagel B, Taudien S, Roessner S, Gundlach H, Kubaláková M, Suchánková P, Murat F, Felder M, Nussbaumer T, Graner A, Salse J, Endo T, Sakai H, Tanaka T, Itoh T, Sato K, Platzer M, Matsumoto T, Scholz U, Doležel J, Waugh R, Stein N** (2011). Unlocking the barley genome by chromosomal and comparative genomics. *Plant Cell* **23**, 1249–1263.
- Nitta N, Sugimura T, Isozaki A, Mikami H, Hiraki K, Sakuma S, Iino T, Arai F, Endo T, Fujiwaki Y, Fukuzawa H, Hase M, Hayakawa T, Hiramatsu K, Hoshino Y, Inaba M, Ito T, Karakawa H, Kasai Y, Koizumi K, Lee S, Lei C, Li M, Maeno T, Matsusaka S, Murakami D, Nakagawa A, Oguchi Y, Oikawa M, Ota T, Shiba K, Shintaku H, Shirasaki Y, Suga K, Suzuki Y, Suzuki N, Tanaka Y, Tezuka H, Toyokawa C, Yalikun Y, Yamada M, Yamagishi M, Yamano T, Yasumoto A, Yatomi Y, Yazawa M, Di Carlo D, Hosokawa Y, Uemura S, Ozeki Y, Goda K** (2018). Intelligent image-activated cell sorting. *Cell* **175**, 266–276.
- Ortiz-Ramírez C, Arevalo ED, Xu XS, Jackson DP, Birnbaum KD** (2018). An efficient cell sorting protocol for maize protoplasts. *Curr Protoc Plant Biol* **3**, e20072.
- Otto FJ** (1992). Preparation and staining of cells for high-resolution DNA analysis. In: Radbruch A, ed. *Flow Cytometry and Cell Sorting*. Berlin: Springer. pp. 65–68.
- Petrovská B, Jeřábková H, Chamrád I, Vrána J, Lenobel R, Uřinová J, Šebela M, Doležel J** (2014). Proteomic analysis of barley cell nuclei purified by flow sorting. *Cytogenet Genome Res* **143**, 78–86.
- Pfossen M, Heberle-Bors E, Amon A, Lelley T** (1995). Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry* **21**, 387–393.
- Reichard A, Asosingh K** (2019). Best practices for preparing a single cell suspension from solid tissues for flow cytometry. *Cytometry A* **95**, 219–226.
- Šafář J, Bartoš J, Janda J, Bellec A, Kubaláková M, Valárik M, Pateyron S, Weiserová J, Tušková R, Číhalíková J, Vrána J, Šimková H, Faivre-Rampant P, Sourdille P, Caboche M, Bernard M, Doležel J, Chalhou B** (2004). Dissecting large and complex genomes: flow sorting and BAC cloning of individual chromosomes from bread wheat. *Plant J* **39**, 960–968.
- Said M, Kubaláková M, Karafiátová M, Molnár I, Doležel J, Vrána J** (2019). Dissecting the complex genome of crested wheatgrass by chromosome flow sorting. *Plant Genome* **12**, 180096.
- Schraivogel D, Kuhn TM, Rauscher B, Rodríguez-Martínez M, Paulsen M, Owsley K, Middlebrook A, Tischer C, Ramasz B, Ordoñez-Rueda D, Dees M, Cuylen-Haering S, Diebold E, Steinmetz LM** (2022). High-speed fluorescence image-enabled cell sorting. *Science* **375**, 315–320.
- Shapiro HM** (2003). *Practical Flow Cytometry*, 4th edn. New York: Wiley-Liss. pp. 73–100.
- Sliwiska E, Loureiro J, Leitch IJ, Šmarda P, Bainard J, Bureš P, Chumová Z, Horová L, Koutecký P, Lučanová M, Trávníček P, Galbraith DW** (2022). Application-based guidelines for best practices in plant flow cytometry. *Cytometry A* **101**, 749–781.
- Smith JP, Sheffield NC** (2020). Analytical approaches for ATAC-seq data analysis. *Curr Protoc Hum Genet* **106**, e101.
- Sun GL, Xia MZ, Li JP, Ma W, Li QZ, Xie JJ, Bai SL, Fang SS, Sun T, Feng XL, Guo GH, Niu YL, Hou JY, Ye WL, Ma JC, Guo SY, Wang HL, Long Y, Zhang XB, Zhang JL, Zhou H, Li BZ, Liu J, Zou CS, Wang H, Huang JL, Galbraith DW, Song CP** (2022). The maize single-nucleus transcriptome comprehensively describes signaling networks governing movement and development of grass stomata. *Plant Cell* **34**, 1890–1911.
- Taher TEI** (2017). Monitoring promoter activity by flow cytometry. In: Gould D, ed. *Mammalian Synthetic Promoters*. New York: Humana. pp. 65–73.
- The International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC)** (2014). A chromosome-based draft se-

quence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science* **345**, 1251788.

Xu XS, Crow M, Rice BR, Li F, Harris B, Liu L, Demesa-Arevalo E, Lu ZF, Wang LY, Fox N, Wang XF, Drenkow J, Luo AD, Char SN, Yang B, Sylvester AW, Gingeras TR, Schmitz RJ, Ware D, Lipka AE, Gillis J, Jackson D (2021). Single-cell RNA sequencing of developing maize ears facilitates functional analysis and trait candidate gene discovery. *Dev Cell* **56**, 557–568.

Zhang JD, Feng M (2023). A plant sample optimal pretreatment for flow cytometric analysis. *Chin Bull Bot* **58**,

285–297. (in Chinese)

张晋丹, 冯旻 (2023). 一种提升流式细胞术分析效果的前处理方法. *植物学报* **58**, 285–297.

Zhu T, Liao KY, Zhou RF, Xia CJ, Xie WB (2020). ATAC-seq with unique molecular identifiers improves quantification and footprinting. *Commun Biol* **3**, 675.

Zhu T, Xia CJ, Yu RR, Zhou XK, Xu XB, Wang L, Zong ZX, Yang JJ, Liu YM, Ming LC, You YX, Chen DJ, Xie WB (2024). Comprehensive mapping and modelling of the rice regulome landscape unveils the regulatory architecture underlying complex traits. *Nat Commun* **15**, 6562.

Flow Cytometric Analysis and Sorting in Plant Genomics

Chunjiao Xia, Yunguang Li, Shu Xia, Wei Pang, Chunli Chen*

College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Flow cytometry is a high-throughput technology that allows for the simultaneous and rapid detection of multiple physical and biological characteristics of individual particles. With the significant reduction in sequencing costs, flow cytometry is playing an increasingly prominent role in high-throughput sample acquisition for plant genomics. Taking rice and soybean as examples, this paper describes in detail the application of flow cytometry for fine sorting of plant cell nuclei and the subsequent ATAC-seq and RNA-seq experiments and analysis process, which provides a preferred tool for efficient mining of genes for agrobiological breeding. The key techniques and common problems in the experimental operation, such as the precautions for cell nuclei preparation, the balance between sorting purity and efficiency, and the debugging method for single-cell sorting, were also analyzed and suggested to provide references for the plant scientists in applying flow cytometry to carry out genomics research.

Key words plants, flow cytometry, nuclei, sorting, ATAC-seq, RNA-seq

Xia CJ, Li YG, Xia S, Pang W, Chen CL (2024). Flow cytometric analysis and sorting in plant genomics. *Chin Bull Bot* **59**, 774–782.

* Author for correspondence. E-mail: chenchunli@mail.hzau.edu.cn

(责任编辑: 白羽红)

通讯作者/团队简介

陈春丽, 华中农业大学生命科学技术学院, 教授, 博士生导师。从事植物干细胞生物学、植物染色体生物学研究以及本科生课程(植物学、植物学实验、植物学基础)和研究生课程(植物显微技术、高级植物学)的教学工作。先后主持国际科学青年基金、国家自然科学基金以及科技部“十四五”重点研发计划等项目, 在植物干细胞与再生以及植物染色体研究中取得系列成果。以第一作者或通讯作者身份在 *Nature Plants*、*Molecular Plant*、*New Phytologist* 和 *Journal Genetics and Genomics* 等国内外主流期刊发表论文 20 多篇。其研究团队聚焦国际前沿, 与英国和日本等国的知名大学及研究所长期合作, 发起成立植物干细胞国际学术联盟和植物干细胞国际联合实验室, 组织召开植物干细胞与再生国际研讨会(2022年)、首届全国植物干细胞生物学大会(2023年)及植物干细胞国际讲坛(2022年)。