

# 果蝇肠上皮干细胞谱系示踪

## Lineage Tracing in *Drosophila* Intestinal Stem Cells

郭兴庭, 裘荣文\*

北京生命科学研究所, 北京

\*通讯作者邮箱: [xirongwen@nibs.ac.cn](mailto:xirongwen@nibs.ac.cn)

引用格式: 郭兴庭, 裘荣文. (2019). 果蝇肠上皮干细胞谱系示踪. *Bio-101* e1010264. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010264.

How to cite: Guo, X. T. and Xi, R. W. (2019). Lineage tracing in *Drosophila* intestinal stem cells. *Bio-101* e1010264. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010264. (in Chinese)

**摘要:** MARCM 系统进行克隆分析的局限性在于当组织中存在多类分裂细胞时, 无法区分克隆是由哪类细胞产生。而果蝇谱系追踪系统, 可以细胞特异性的表达转座酶, 通过 Flp-out 系统, 只在该类细胞及其所有子代细胞中, 诱导产生持续表达的标记 (通常为 lacZ 或 GFP), 进而追踪相应细胞的谱系。结合对特定细胞类型标志物的免疫荧光染色, 该技术广泛应用于前体细胞子代细胞命运分析以及终末分化细胞转分化/去分化等过程的研究。本方案以肠道前体细胞 (enteroblast) 为例, 用 lacZ 标记其子代细胞, 并通过两种细胞特异性的标志物, 分析 Tramtrack 基因对前体细胞分化的影响。

**关键词:** 果蝇肠道上皮, 谱系示踪, 命运决定

### 材料与试剂

1. 耗材
  - 1) 1.5 ml 离心管
  - 2) 移液枪头
2. 果蝇品系
  - 1) *Su(H)-Gal4* (from Steven Hou lab)
  - 2) *u-Flp* (BDSC: #4540)
  - 3) *Tub-gal80<sup>ts</sup>* (BDSC: #7017)
  - 4) *ttk-RNAi (v10855)/CyO*
  - 5) *Act [lacZ /MRS* (BDSC: #6355)

### 3. 试剂

- 1) NaCl
- 2) KCl
- 3) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 4) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 5) 37%甲醛 (Sigma-Aldrich, catalog number: F1635)
- 6) 正庚烷 (国药集团化学试剂有限公司, 80066992)
- 7) 甲醇 (Sigma-Aldrich, catalog number: 061495)
- 8) Triton X-100 (Sigma-Aldrich, catalog number: T9248)
- 9) NGS (Cell Signaling Technology, catalog number: 5425)
- 10) 甘油 (Sigma-Aldrich, catalog number: T9248)
- 11) DAPI (Molecular Probe)
- 12) 一抗: 小鼠源抗 DI (1:300, DSHB), 小鼠源抗 Pros (1:300, DSHB), 兔源抗 LacZ (1:300, DSHB)
- 13) 二抗: 山羊抗兔 Alexa488 (1:300, Molecular Probe), 山羊抗小鼠 Alexa56 (1:300, Molecular Probe)
- 14) 1× PBS 缓冲液 (见溶液配方)
- 15) PBT 缓冲液 (见溶液配方)
- 16) Mounting Medium (见溶液配方)

### 仪器设备

1. 体式显微镜 (Leica S6E)
2. 移液枪 (吉尔森公司)
3. 精细解剖镊 (WPI, Dumoxel 合金镊子, #5 14098)
4. 摇床 (杭州米欧仪器有限公司)
5. 激光共聚焦显微镜 (尼康公司, Nikon A1-R)
6. 恒温培养箱 (上海一恒科技有限公司)

### 实验步骤

本实验方法实验原理图 (见图 1)。

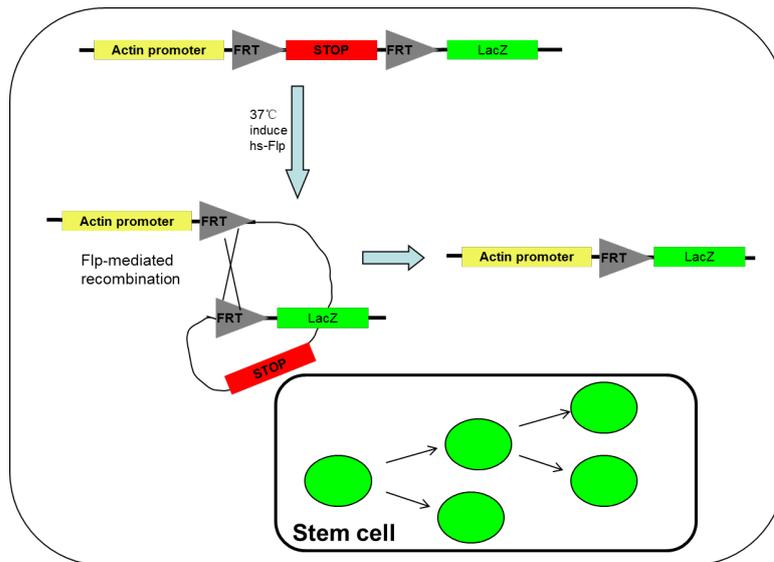


图 1. 细胞谱系追踪系统. 特定细胞中表达的 Gal4 驱动转座酶 (Flippase, Flp) 的表达,进而诱导终止子两端 FRT 序列进行同源重组, 除去终止子, 启动 lacZ 报告基因表达, 标记相应细胞及其子代细胞 (改变自 Evans 等, 2009)。

1. 分别取 10 只基因型为 *ttk-RNAi(v10855)/CyO; Act[<<]lacZ, Tub-gal80<sup>ts</sup>/MRS* (实验组) 和 *Act[<<]lacZ, Tub-gal80<sup>ts</sup>/MRS* (对照组) 的雄果蝇, 与 40 只基因型为 *Su(H)-Gal4; u-Flp, Tub-gal80<sup>ts</sup>* 的处女雌果蝇, 于 18 °C 培养箱中进行杂交。
2. 约 25 天后, 收取无平衡染色体表型的 F1 代雌果蝇, 每个 cross 收取 10~15 只, 转移至 29 °C 温箱中培养, 每隔两天传一次 (温度敏感性 Gal80, 在 18 °C 时可以有效抑制 Gal4 的活性, 阻止转座酶(Flp)的表达; 29 °C 下, Gal80 失活, 转座酶表达并激活同源重组)。
3. 29 °C 培养 7 天后, 体视显微镜下, 在预冷的 1× PBS 中剖出果蝇中肠, 并将其转入装有 500 μl 预冷 1× PBS 的 1.5 ml 离心管内。
4. 对解剖出来的果蝇肠道进行固定, 脱水, 免疫荧光染色及制片, 详细步骤参见“果蝇肠上皮的免疫荧光染色” (金真和裘荣文, 2019)。
5. 激光共聚焦显微镜 40 倍镜下观察, 拍摄图像, 分析带有 LacZ 谱系标记的细胞类型。

## 结果与分析

DAPI 作为一种常用的 DNA 染料,可以标记出肠上皮细胞核的形态。其中,肠道干细胞,肠道前体细胞以及内分泌细胞都是二倍体的小核细胞,而肠吸收型细胞是多倍体的大核细胞。*Delta* 是 Notch 信号通路的配体,特异性的表达于干细胞表面;而 *Pros* 是肠内分泌细胞特异性表达的一种转录因子,分布于细胞核中。*LacZ* 作为谱系追踪的标记物,标记出前体细胞所产生的所有子代细胞。

在正常情况下,Notch 信号激活的前体细胞,其最终将分化成为肠吸收型细胞,而不会产生分泌型细胞。因此,对照组中,*LacZ* 标记的细胞绝大多数是单个的大核细胞,而 *Pros*<sup>+</sup>的肠内分泌细胞则都不带有 *LacZ* 标记(图 2A)。而在实验组中,产生了大量带有谱系标记的小细胞聚集,染色结果显示这些小细胞绝大部分是 *Pros*<sup>+</sup>的(图 2B)。因此,在前体细胞中敲低 *ttk*,可以有效的改变前体细胞终末分化的方向,由分化为肠吸收细胞变为肠内分泌细胞。

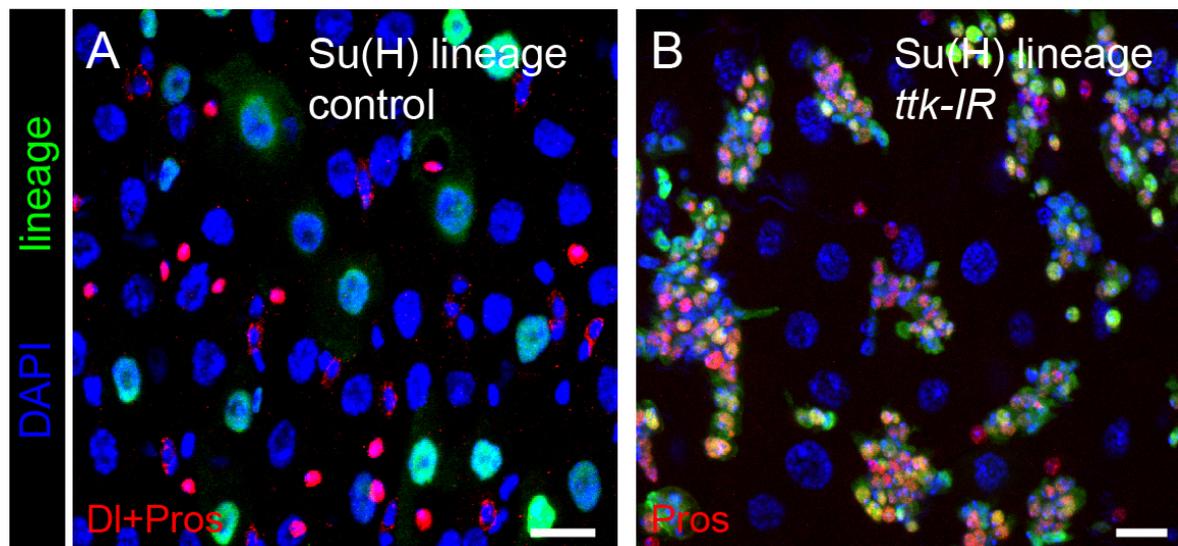


图 2. 野生型及 *ttk* 敲低状态下,前体细胞的谱系追踪. A. 野生型肠道中,带有谱系标记的绝大多数是大核细胞. B. 敲低 *ttk* 后,带有谱系标记的绝大多数是 *Pros*<sup>+</sup>的小核细胞。标尺: 20  $\mu$ m。

## 注意事项

1. 成功的谱系追踪,其前提是高度特异性在特定某一细胞类型中表达的 *Gal4*, 否则很容易产生 leaky。

2. 谱系追踪系统非常敏感，18 °C 培养时即使有低水平的 Gal4 活性也能诱导 lineage 标记产生，因此最好有多个 Gal80 元件，抑制其在发育时期的表达。

### 溶液配方

1. 1× PBS 缓冲液

称取 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.42 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.27 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 加水定容至 1L, 调节 pH 至 7.4

2. PBT 缓冲液

向 1 L 1× PBS 缓冲液中加入 1 ml Triton X-100, 充分搅拌摇匀

3. Mounting Medium

向 70 ml 100%甘油中加入 1× PBS 缓冲液, 至终体积为 100 ml, 充分混匀

### 致谢

本实验室的工作得到北京生命科学研究所及国家“973”项目的支持。该实验方案改编自本实验室已发表的文章(Wang 等, 2015)。

### 参考文献

1. 金真, 裘荣文. (2019). [果蝇肠上皮的免疫荧光染色](#). *Bio-101* e1010270. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010270.
2. Evans, C. J., Olson, J. M., Ngo, K. T., Kim, E., Lee, N. E., Kuoy, E., Patananan, A. N., Sitz, D., Tran, P., Do, M. T., Yackle, K., Cespedes, A., Hartenstein, V., Call, G. B. and Banerjee, U. (2009). [G-TRACE: rapid Gal4-based cell lineage analysis in \*Drosophila\*](#). *Nat Methods* 6(8): 603-605.
3. Wang, C. H., Guo, X. T., Dou, K., Chen, H. Y., and Xi, R. W. (2015). [Ttk69 acts as a master repressor of enteroendocrine cell specification in \*Drosophila\* intestinal stem cell lineages](#). *Development*: 142(19): 3321-3331.