

【Nature Protocols】深度解读DeaLT谱系示踪技术

2018年9月24日，Nature Protocols发表了中科院生物化学与细胞生物学研究所周斌研究员课题组的文章“Genetic lineage tracing of resident stem cells by DeaLT”，详细描述了如何利用DeaLT这种新型谱系示踪系统来进行细胞命运与组织发育的研究。

2018年9月24日，Nature Protocols发表了中科院生物化学与细胞生物学研究所周斌研究员课题组的文章“Genetic lineage tracing of resident stem cells by DeaLT”，详细描述了如何利用DeaLT这种新型谱系示踪系统来进行细胞命运与组织发育的研究。

关注谱系示踪领域研究或经常看我们公众号文章的读者应该对谱系示踪这个概念并不陌生了。在器官发育、疾病进展和组织再生的过程中，细胞经常通过感知环境变化并经过分化或转分化而走上不同的命运。**通过谱系示踪技术，我们可以更好地解开细胞的起源问题、认识细胞的可塑性。**

目前在体内追踪细胞命运转化的技术中，最被广泛使用的就是Cre-loxP介导的谱系示踪。利用表达Cre的细胞中的Cre-loxP重组可以去除插入到小鼠Rosa26位点中的loxP侧翼的转录终止结构，使随后的报告基因表达（如GFP和tdTomato）。这种方法通常能够揭示不同细胞类型之间的关系。

Cre还可以被解构成两部分，分别由两种不同的启动子控制，达到加强遗传靶向特异性的目的。方法是：Cre重组酶的编码序列被分成两个互补的片段：NCre和CCre。NCre表达在一种启动子下控制，CCre在另一种启动子的控制下。仅在这两种不同的启动子均激活的细胞中，NCre和CCre表达构成完整的Cre，随后行使Cre-loxP重组功能，驱动报告基因表达，进行谱系示踪。因为Cre重组酶表达受两个启动子的控制，所以这种谱系追踪的特异性较最简单的单一启动子系统要强一些。

尽管如此，传统的Cre-loxP介导的遗传谱系追踪仍不能解决许多争议性科学问题。例如，内源性c-Kit⁺心脏干细胞（CSCs）是否具有肌源性潜力？乳腺干细胞是单能干细胞还是双能干细胞？Sox9⁺导管细胞是否是兼性肝细胞祖细胞？β-细胞是来自于内分泌祖细胞还是通过自我扩张再生而来？等等等等。

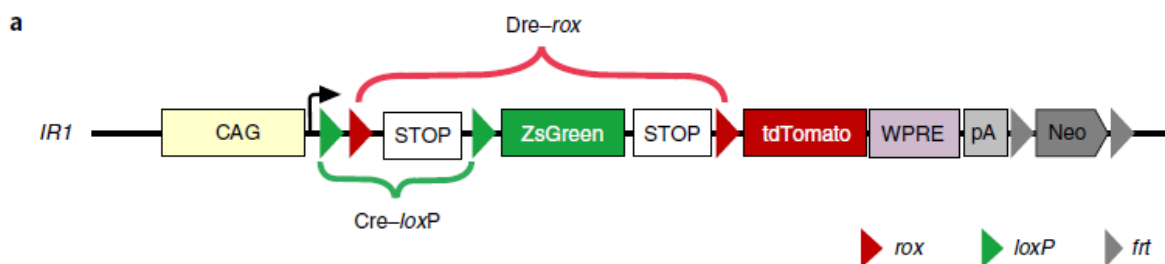
瓶颈在于：在干细胞和组织再生领域，许多已发现的干细胞标记物对干细胞群而言并不是特异的，它们也可能由一些子细胞亚群表达。而传统技术的准确性主要依赖于Cre表达的特异性，如果有微量的Cre表达在了非靶向细胞中即为所谓的异位表达，那么最终被标记的后代细胞既有可能是靶向细胞来源，也有可能是非靶向细胞来源，从而干扰对两种不同细胞类型命运和起源的追踪，使谱系示踪结果的可靠性大大降低。

如何突破这个瓶颈呢？

目标就是消除异位表达。由于Cre-loxP重组需要两个loxP位点同时存在才会发生，那么如果能够在非靶向细胞中去除其中一个loxP位点，不就可以阻止非靶标细胞中的重组反应，防止非特异性标记的发生了吗？

DeaLT (Dual-recombinase-activated lineage tracing) 谱系示踪技术就是利用这个思路，将 Dre-rox 重组系统引入到传统的 Cre-loxP 重组系统中来，用一个重组系统 (Dre-rox) 来控制另一个系统 (Cre-loxP)。 Dre-rox 介导的重组反应在可能引起 Cre 异位表达的细胞中将loxP 位点切除掉，有效阻止Cre-loxP 的异位重组，增加Cre-loxP 介导的谱系示踪结果的准确性。

通过基因打靶技术，可以建立一种两套系统交错的报告基因小鼠品系 (IR1)：在Rosa26位点中，两个loxP 位点和两个 rox 位点以交错形式存在 (loxP-rox-loxP-rox)，如下图1a所示：



使用组成型 Dre工具鼠品系与诱导型 CreER工具鼠品系与IR1交配，使得先发生Dre-rox重组，而诱导型重组仅在他莫昔芬诱导后在CreER+Dre-的细胞中起作用。换句话说，在表达Dre的细胞中阻止Cre-loxP重组 (图1b)。

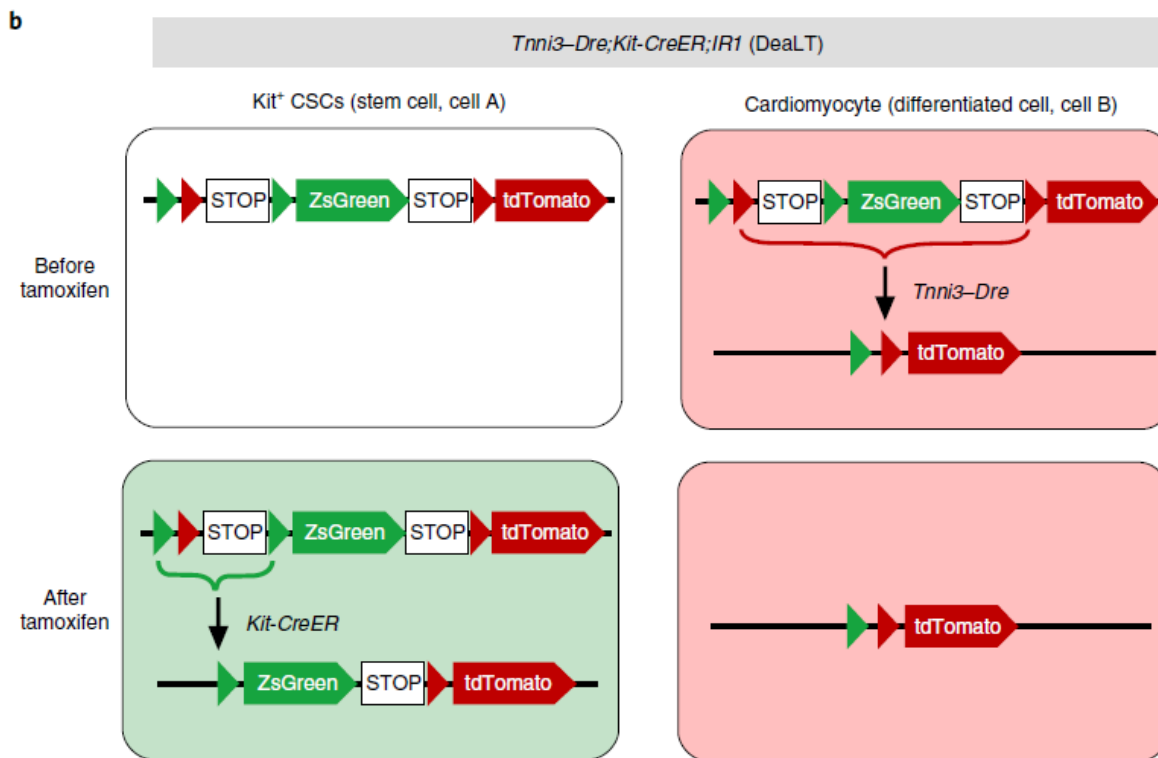


Fig. 1 | a, Construction of interleaved reporter 1 (IR1).b, In *Tnni3-Dre;Kit-CreER;IR1 (DeaLT)* mice, *Tnni3-Dre-rox* recombination labels cardiomyocytes (cell B) with tdTomato. After tamoxifen treatment, *Kit-CreER-loxP* recombination labels Kit⁺ CSCs (cell A) with ZsGreen, whereas cardiomyocytes remain labeled with tdTomato⁺. CAG, CAG promoter, hybrid construct consisting of the cytomegalovirus (CMV) enhancer fused to the chicken beta-actin promoter; frt, flippase recognition target site; Neo, neomycin; pA, poly(A) tail; STOP, transcriptional stop codon; WPRE, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element.

DeaLT的优点

提供了同时追踪两种细胞类型的方法，可在体内同时追踪不同的细胞群。

更精准的谱系示踪。

DeaLT的缺点

与传统Cre-loxP单系统相比，DeaLT系统需要用到3种基因工程小鼠(Dre;Cre;IR1)。

小鼠的构建、饲养和繁育工作更为复杂、漫长。

DeaLT的关键点：Dre的特异性和效率：

驱动Dre的启动子的特异性以及Dre的工作效率对于确保精确控制靶细胞中Cre-loxP重组至关重要。并不是所有分化细胞类型的启动子（图1中的细胞B）都适合，因此，在建立DeaLT三基因阳性小鼠之前，必须根据现有文献和数据来选择合适的启动子，并先通过与IR1杂交来对Dre品系进行表型分析与验证。

B-Dre的效率必须很高（接近100%），因此需要选择强而特异的启动子来驱动Dre重组酶表达。B-Dre小鼠必须与R26-rox-stop-rox-tdTomato报告基因小鼠交配来测试Dre的效率。只有在验证Dre足够高效以后，才能与Cre; IR1双阳性小鼠杂交，用于DeaLT系统的建立并进行谱系示踪。

Dre的表达必须是B细胞特异的。DeaLT只能标记A+B-细胞群并鉴定B细胞群中的干细胞。如果A+干细胞也表达B，B-Dre-rox重组将阻止A+群体中的Cre-loxP重组，因此DeaLT不能使这种特异性干细胞群（A+B+细胞）被标记。

如何利用DeaLT技术来追踪某种潜在干细胞呢？

以c-Kit+心脏干细胞（CSCs）为例，我们来看看用DeaLT系统使如何回答这类细胞是否具有肌源性潜力的问题的。

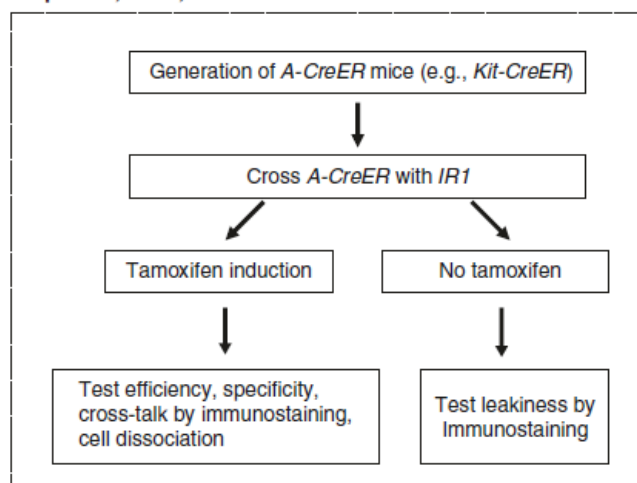
A类细胞（标志物为gene A）表示c-Kit+干细胞，细胞B（标志物为geneB）表示心肌细胞。Kit基因（gene A）在c-Kit+干细胞中高表达，但在心肌细胞中也有少量表达。因此要排除由于Kit-CreER在心肌细胞中的表达而对c-Kit+心肌细胞进行的非靶向性标记。

要追踪一种潜在干细胞，一共需要建立3种基因工程小鼠品系：B-Dre (Tnni3-Dre)、A-CreER (Kit-CreER) 和 IR1，经过3个阶段的实验：

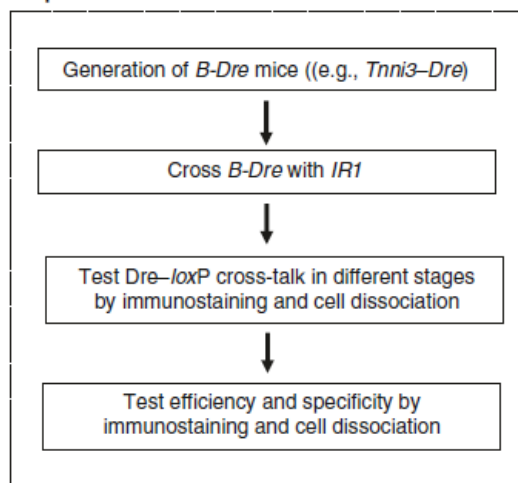
第一阶段：工具鼠的建立与验证

首先，针对两种新的重组酶工具鼠B-Dre (Tnni3-Dre) 和A-CreER (Kit-CreER)，我们需要分别进行重组酶活性和特异性的验证，并排除Dre-loxP 和Cre-rox交叉识别的可能性，排除CreER的漏表达。

Steps 1-4; 7-11; 24-32



Steps 5-23



重组酶工具鼠的建立

- 推荐采用周期更短的CRISPR基因编辑技术来制备B-Dre重组酶工具鼠，一般仅需6个月。而传统ES细胞打靶途径可能需要1-2年。
- 在设计基因工程小鼠时，建议在Dre cDNA之后加上WPRE元件来增加mRNA表达的稳定性，提高Dre蛋白的表达效率和重组效率。

Dre 和 CreER 工具鼠的验证

- **重组效率：>99%**

分别与IR1小鼠交配，检测报告基因表达情况。在A-CreER;IR1中，如果他莫昔芬诱导一次效果不佳，可进行多次反复诱导，以明确能实现高效标记的诱导次数，方法是：最好有一种特异性c-Kit (gene A) 抗体，首先检测内源性c-Kit蛋白表达，然后在最后一剂他莫昔芬后（在一至五次他莫昔芬处理后）1-2天采集Kit-CreER; IR1小鼠的心脏，并用Kit抗体和ZsGreen抗体对心脏切片进行免疫荧光染色，检测Kit +细胞中ZsGreen +细胞的百分比。对于Kit-CreER; IR1小鼠，有效的诱导方式是：每2天经口给予小鼠他莫昔芬，共5次。如果没有好用的Kit抗体，那么就需要阅读相关文献，找到由Kit-CreER标记的报告的细胞类型（例如，内皮细胞）。选择好的一抗进行免疫染色至关重要，建议购买并使用已在已发表研究中使用的相同抗体，并在不同稀释度的样品上进行测试，以确定最佳条件。

- **特异性重组**

分别与IR1小鼠交配，通过marker分子和荧光蛋白进行免疫染色评估，确定Tnni3-Dre (B-Dre) 是否仅在TNNI3+心肌细胞中激活报告基因表达，而Kit-CreER (A-CreER) 仅在c-Kit+中激活报告基因表达。

值得注意的是，在对Tnni3-Dre进行表型分析时，心脏中存在的其他细胞类型（例如，内皮细胞，平滑肌细胞和成纤维细胞）或其他器官（例如，肝，肺和脑）应当用作内部对照。实验结果应证实Tnni3-Dre标记心肌细胞但不标记其他细胞谱系。在对Kit-CreER进行表型分析时，应查阅文献以确定c-Kit是否在其他细胞类型中表达。例如，c-Kit在肺内皮细胞中表达但在上皮细胞中不表达，因此可以收集肺组织用于对照。

• Dre-loxP 或 Cre-rox交叉识别排查

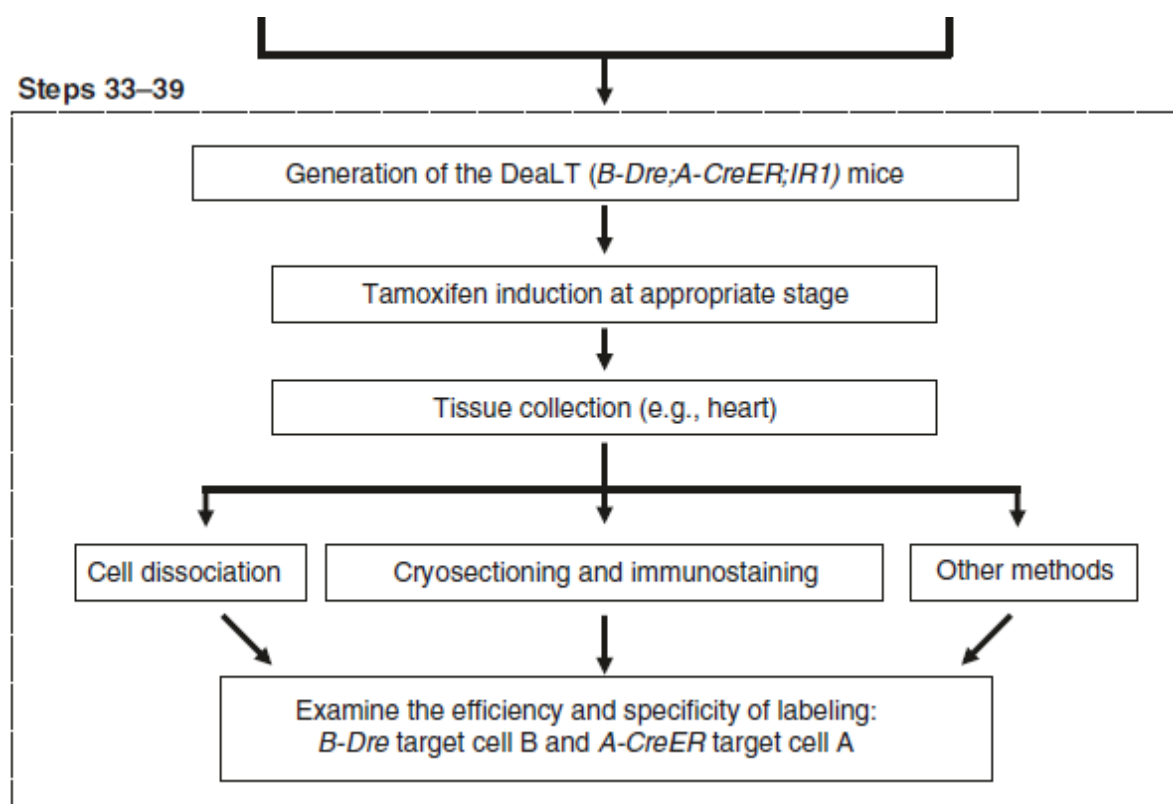
例如，Tnni3-Dre;IR1小鼠中，如果在心肌细胞中有tdTomato红色荧光信号说明Dre-rox重组，如果有ZsGreen绿色荧光信号说明发生了Dre-loxP交叉串扰重。

• 诱导型CreER的漏表达排查

Cre漏表达是指在没有他莫昔芬诱导的情况下发生CreER-loxP重组。主要需要考察在早期胚胎阶段Kit-CreER是否存在泄漏。如果Kit-CreER在早期胚胎阶段在心肌细胞中漏表达，那么在Tnni3-Dre发挥作用去除这些细胞中的loxP位点之前，就会观察到CreER的漏表达重组作用。对于所有CreER工具鼠，都需要一组未接受他莫昔芬的对照组来检查CreER漏表达的情况。

第二阶段：DeaLT系统的建立

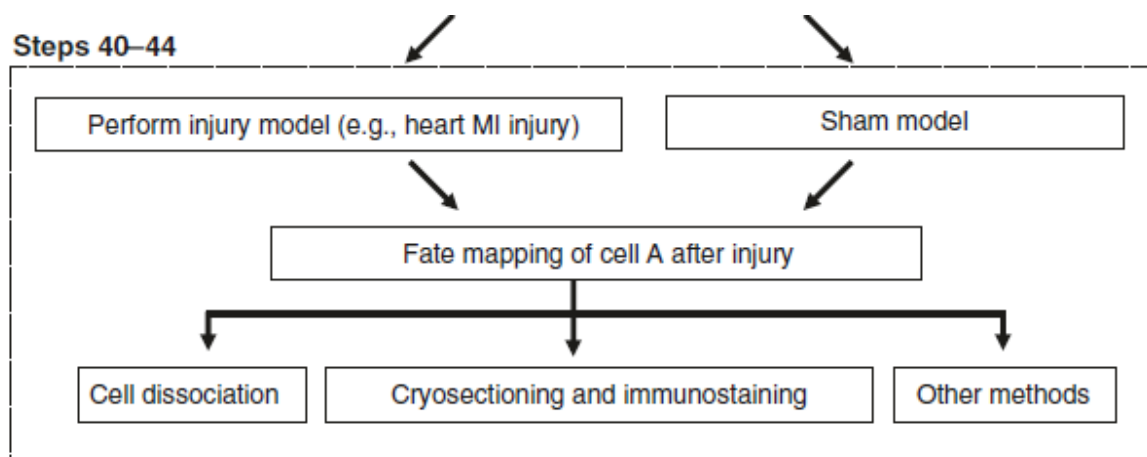
随后，将B-Dre (Tnni3-Dre)、A-CreER (Kit-CreER) 和 IR1交配到一起，获得Tnni3-Dre;Kit-CreER;IR1三基因敲入小鼠。在适当的时间诱导Cre重组，通过IR1中的不同荧光报告基因标记不同的细胞类型：ZsGreen 荧光蛋白标记c-Kit +干细胞，tdTomato荧光蛋白标记小鼠心脏中的心肌细胞。



- 要获得DeaLT 三基因敲入小鼠 (Tnni3-Dre;Kit-CreER;IR1 mice) 可以先获得Tnni3-Dre;Kit-CreER 双阳性, 再与IR1小鼠交配; 也可以先将一种重组酶工具鼠与IR1小鼠交配, 再与另一种工具鼠交配。整个交配过程大约需要6个月左右。
- 在DeaLT小鼠出生后, 几乎所有的心肌细胞都被Dre-rox系统标记。
- DeaLT和对照小鼠的年龄, 体重和性别应该相匹配, 每组至少需要3只或更多小鼠。
- 给予最后一剂他莫昔芬至少1周以后, 收集DeaLT和对照小鼠的心脏进行冷冻切片和免疫染色。使用针对ZsGreen, tdTomato和TNNI3或VE-CAD的抗体。
- 在DeaLT小鼠心脏中, 心肌细胞应该是tdTomato+ TNNI3+而不是ZsGreen +。在对照小鼠心脏中可以检测ZsGreen+TNNI3+心肌细胞。
- 此外, DeaLT和对照小鼠心脏之间ZsGreen + VE-CAD+内皮细胞的百分比应该没有实质性差异。可以使用肺组织作为额外的对照, 因为c-Kit也在肺内皮细胞中表达, 并且TNNI3不在肺组织中表达。

第三阶段：组织损伤和再生场景下的谱系示踪

利用由冠状动脉结扎引起的心肌梗塞 (MI) (与假手术一起作为实验对照) 诱导细胞命运转变。通过检测c-Kit+ CSC (ZsGreen+) 是否在MI后损伤的心肌中产生新的心肌细胞, DeaLT系统, 相较常规策略 (使用Kit-CreER; IR1), 能够更精确地追踪c-Kit+干细胞。



- 在任何实验中，DeaLT和同窝对照小鼠都应在一起进行比较。
- 在成年阶段多次给予他莫昔芬诱导，在最后一剂他莫昔芬诱导后2周，对小鼠进行MI或假手术。
- 在假手术中，所有手术都与MI病例相同，只是在假手术中不进行永久性动脉结扎。
- 对于损伤模型，建议每组有五只或更多的小鼠作为样本。
- 一般来说，1-2周足以使他莫昔芬代谢，不过不同组织的他莫昔芬代谢时间不尽相同，建议在最后一剂他莫昔芬诱导后，留出2周或更长时间再进行损伤或疾病诱导。

疑难排查

疑难问题	可能的原因	解决方法
PCR 失败, 或者 PCR 产物大小不对	PCR 引物或退火温度不佳	在设计引物时, 软件会提供多个合适的引物对。尝试使用不同的引物对进行基因组 PCR 或改变退火温度, 例如将其增加 1 或 2°C。
小鼠没有怀孕或没有配上	小鼠不够强壮或有疾病。 动物房空气湿度和温度不合适。	替换雄性或雌性小鼠。 联系动物设施工作人员, 监控和调整动物房的温度和湿度。
组织切片不理想。	低温恒温器温度不合适。 刀片磨损。 玻璃防卷板插片位置不当。	虽然对于大多数组织, -20 至 -23°C 的温度范围适合进行实验操作, 但为了找到某些特定组织的最佳温度, 需要参阅低温恒温器产品手册。 更换新的切片刀片。 调整玻璃插片位置使其边缘从刀片的边缘突出。
在免疫染色切片中检测不到荧光信号	组织切片储存时间过长, 蛋白质已降解。 一抗稀释浓度不合适。 组织样本过度固定, 抑制了一抗与抗原的结合。	用新的组织样本。 测试从 1:50 到 1:1,000 之间的不同稀释浓度, 最终确定最有效的浓度。 用新鲜的 4% (wt/vol) PFA 固定组织样品不超过 2 小时。
获得的活心肌细胞很少	消化时间太长或太短: 消化不充分使得难以从组织中获得细胞, 而且产生更多的细胞碎片: 过度消化会导致心肌细胞死亡。 针尖尖端在心脏中的位置不正确: 如果针的钝端低于主动脉瓣, 则会阻止心室的正常消化。	当心脏变得苍白和松弛时, 立即停止组织消化。最佳消化时间通常为 15-20 分钟。 确保针的钝端尖端正好位于主动脉瓣上方。
经他莫昔芬处理的小鼠不健康	小鼠本身不够健康或不够强壮。 他莫昔芬的剂量过量。	换用更强壮的小鼠。 确保他莫昔芬剂量不超过 0.2 mg/g 体重。如果需要多次给药, 给药间隔应大于 2 天。

