

胞囊形成初期细胞分裂周期特性初探

欧阳华聪

2013.6

目录

摘要	1
前言	
上皮组织简述	4
胞囊作为上皮形态建成的体外模型	5
基于荧光泛素化的细胞周期指示物(Fucci)系统	6
材料与amp;方法	
材料	8
方法	10
结果	
胞囊形成过程时序成像	21
统计结果	22
结论	22
讨论	23
参考文献	27
致谢	29

摘要

上皮细胞分布于体表。上皮形态建成涉及一系列生物学事件包括上皮细胞的分裂、极化、迁移、死亡。单个上皮细胞进行三维培养而形成的胞囊（cyst）结构已成为研究中有用的体外模型，这是由于在细胞外基质中，由单层上皮细胞围绕组成的中空、充满液体的胞囊的形成与上皮形态建成的生理过程存在共同特性。然而，对于胞囊形成过程本身的特征的讨论仍十分有限，比如一个胞囊中细胞数量变化的时间进程。

本课题对表达 **Fucci**（基于泛素化的荧光细胞周期指示物）的活细胞 **MDCK** 胞囊形成进行时序成像，从而持续监控细胞 **DNA** 复制是否发生，通过图像分析，得到胞囊中细胞数量随时间变化的数据；同时，追踪各个细胞分裂情况，了解胞囊形成过程中细胞动态。

根据本实验结果可以初步得出，在 **MDCK** 胞囊形成过程中，前三天经历的四次细胞周期即从一个细胞分裂为二、二个细胞分裂为四、四个细胞分裂为八、八个细胞分裂为十六个细胞的阶段中，细胞周期 **S/G2/M** 期减短，而 **G0/G1** 期（除第一次分裂后与第二次分裂后比较无差别外）增长。

关键词：胞囊形成，细胞增殖，细胞周期

Abstract

Epithelial tissue is distributed throughout the body surface. Epithelial morphogenesis involves several biological events, including cell division, polarization, migration and death. The formation of a hollow fluid-filled cyst by a single layer of cells in extracellular matrix shares some characteristics with physiological processes of epithelial morphogenesis. Madin Darby Canine Kidney(MDCK) cells can make cysts and have the most robust cystogenesis.

While three-dimensional cultured cysts have become useful research models in vitro, there are only a limited number of discussions about features observed during cysts development such as the course of quantity of cells in one cyst, the length of cell cycle during cystogenesis, etc..

Using the Fucci-expressing MDCK cell to observe cystogenesis could monitor cell cycle continuously. Fucci is a fluorescent ubiquitin-based cell cycle indicator, and it has become a convenient tool to show spatiotemporal dynamics of cell proliferation.

According my results,we can make the preliminary conclusion that the time of G2/S/M phase during early phase of cystogenesis becomes shorter,and the time of G0/G1 phase during early time of cystogenesis becomes longer.

Key words: cystogenesis, cell proliferation, cell cycle

1.1 上皮组织概述

1.1.1 上皮组织特性

上皮组织是动物体包括肌肉、结缔、神经组织的四种基本组织之一。其中，被覆上皮指被覆于体表、空腔器官腔面、管道表面的紧密排列的上皮细胞，具有保护、吸收、分泌等功能。

上皮细胞侧面的细胞连接十分丰富，相邻上皮细胞间结合十分紧密，如紧密连接(tight junction)可封闭相邻上皮细胞顶部的间隙而形成屏障；粘着链接(adhesion junction)中膜面与微丝骨架相连，可以传递细胞间信号如收缩力等；间隙连接(gap junction)可通过跨膜离子通道介导细胞间信号传递。

上皮组织的基底面具有基底膜(basement membrane/basal lamina)，使其与底部的结缔组织（胞外介质）相隔离。细胞底面与基底膜间有跨膜的整联蛋白 integrin 介导的胞内细胞骨架即微丝蛋白与胞外介质(extracellular matrix, ECM)的连接，通常通过黏着斑(focal adhesion)复合体。胞外介质由细胞合成，分泌聚集于胞外，主要含有多种纤维蛋白如胶原蛋白(collagen)、弹性蛋白(elastin)、基膜粘连蛋白(laminin)、纤维糖连蛋白 (fibronectin)等，含糖胺多糖或硫酸肝素的蛋白多糖及透明质酸。其中基膜粘连蛋白、纤维糖连蛋白等均为整联蛋白的受体。胞外介质是上皮组织不可缺少的成分，在支持细胞、传递细胞间信号、调节生理活动等方面发挥功能。

MDCK (Madin-Darby Canine Kidney)细胞来源于狗的肾脏上皮，是被广泛应用于研究上皮的模型。其顶底极性明显，细胞连接界限分明，生长速度快。其中 MDCK II 细胞株较为常用¹。

1.1.2 上皮形态建成

上皮形态建成(epithelial morphogenesis)包括上皮细胞增殖、极化、分化、迁移、凋亡等生物学过程，是组织器官发育与功能分化的基础，参与了对器官大小、形状、极性的调控。上皮形态建成涉及内在遗传机制，也与上皮细胞增殖分化的微环境有关，特别是细胞感受胞外信号及相邻细胞间的相互作用。调节的失序会导致一系列疾病发生，包括常染色体显性多囊肾(autosomal dominant polycystic kidney disease)。而大部分恶性肿瘤亦起源于上皮组织，即上皮细胞失去极性，失去与周围细胞胞间连接，成为侵袭性细胞，突破基底膜，实现转移。

1.2 胞囊作为上皮形态建成的体外模型

1.2.1 胞囊的特征及形成条件

在三维培养的环境中，单个上皮细胞如 MDCK、Caco2 细胞能形成胞囊。胞囊是由单层细胞围成的、空心、充满液体的球状结构。

胞囊中的上皮细胞细胞同体内情况类似，细胞极化，形成顶面作为细胞与空腔的界面，形成底面与 ECM 相接触。细胞侧面与其他细胞接触，形成紧密连接、粘着链接、间隙连接等结构²。因此胞囊中的每个细胞既是独立的个体，也是有相互作用的、可作为一个整体的结构。

早期使用 collagen I 模拟体内细胞外基质，现在一般使用 Matrigel (BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix)。其主要成分为基膜粘连蛋白(laminin), 其次为 IV 型胶原蛋白、硫酸肝素蛋白多糖及巢蛋白(entactin)。在室温下, Matrigel 能聚集生成具生物活性的基质材料, 以形成基底膜。研究显示胞囊后期管腔的生成可能与三维培养使用的胞外介质分化程度有关, 适当的介质中细胞极化快, 形成管腔死亡细胞少³。

另有研究表明。胞囊与 ECM 的部分接触足以起始其形成, 而毋需胞囊底面 (basal surface) 与 ECM 的全面接触⁴。

1.2.2 胞囊的研究应用情况

有以胞囊为模型, 对其发育过程或成熟后的特征研究对象, 针对关键因素的研究。

如使用 MDCK 胞囊, 发现在上皮形态建成过程中, 纺锤体指向是一关键因素, 而 LGN 对两个分裂中的 MDCK 细胞的纺锤体指向起了决定作用⁵。最近的研究显示 Ras 蛋白与胞囊的形成与形态维持有关: 活化的 Ras 蛋白使细胞周期加速, 干扰了 MDCK 胞囊的生成。而因为 Ras 蛋白在肿瘤生成中的独特角色, 该系统可被开发、应用于多种起始于上皮细胞的癌症的药物筛选⁶。使用人乳腺细胞形成的胞囊研究, 发现在正常胞囊形成中, 存在连续角旋转(coherent angular motion, CAMo), 且角速度随时间延续而增快, 其在组织结构形成中为一基本步骤, 而在侵染性细胞中 CAMo 则不存在⁷。

1.2.3 胞囊发育过程特征

虽然三维培养的胞囊已经成为广泛使用的体外模型用于研究, 对其本身发育过程中的诸多特征仍讨论较少, 如胞囊中细胞数目的时间进程。

尽管这些特征的明确十分有必要, 只有很少的文献有所涉及。胞囊中细胞数目的时间进程只被粗略地描述⁸。最近的研究, 基于免疫染色及计算模拟的方法, 得到胞囊形成依次历经起始、囊腔形成、囊腔延伸、稳定四个阶段的结论⁹。然而其时间尺度以天 (24h) 为单位仍较粗略, 且未针对细胞周期时长及可能的变

化进行观察、计算。同时其体外实验中免疫染色的实验方法不能实现活细胞动态的追踪，而本课题实验可以做到这点。

另外，十分特别的，有研究发现，在 MDCK 胞囊形成过程中，细胞底面会形成伪足样的小突起，在电镜下显示为微绒毛样的结构¹⁰，是一值得注意的现象。

1.3 基于荧光泛素化的细胞周期指示物(Fucci)系统

Fucci (a fluorescent cell cycle indicator), 即基于泛素化的荧光细胞周期指示物¹¹。利用表达 Fucci 的 MDCK 细胞来观测胞囊形成，可以达到对活细胞 DNA 复制是否发生的持续监控,进而追踪胞囊中单个细胞细胞周期动态。在活细胞状态下，显微镜亮场能通过观察细胞一分为二记录细胞周期中 M 期到 G1 期的转变，Fucci 则可实现追踪亮场下不能观察到明显形态变化的细胞周期中 G1 期到 S 期转变，并能达到较高时间分辨率。

1.3.1 Fucci 系统设计原则

在细胞周期中，有 DNA 复制“执照”因子 Cdt1 (chromatin licensing and DNA replication factor 1)。Cdt1 参与复制前复合体的形成，是 DNA 复制的必要条件。当 Cdt1 与 Geminin 蛋白结合，能阻止复制——可能可作为阻止 Geminin 于不适当处起始复制发挥功能，保证细胞每分裂一次 DNA 复制只发生一次。

在细胞中，Cdt1 与 Geminin 受多泛素化降解途径调节，SCF^{Skp2} 及 APC^{Cdh1} 泛素连接复合体分别介导 Cdt1 与 Geminin 泛素化后至蛋白酶体降解¹²。由于 SCF^{Skp2} 是 APC^{Cdh1} 的直接底物，并能反馈抑制 APC^{Cdh1} 的功能，因此在细胞周期中二者活性此消彼长^{13,14}。由此，在一个细胞周期中 Cdt1 与 Geminin 蛋白量也相应变化，此消彼长，即 Cdt1 于 G1 期聚集，而 Geminin 聚集于 S/G2/M 期¹⁵。

由于上述原因，过表达细胞中 hCdt1 会引起 DNA 重复复制，细胞不能进入下一分裂期，细胞周期停滞¹⁶。因此，Fucci 系统将表达 hCdt1 或 hGeminin 的基因的截短体与表达荧光蛋白的基因与相融合，表达该基因的细胞在不同时期表达对应的荧光蛋白，聚集于细胞核中，且细胞可以正常分裂，于是获得了指示细胞分裂时空动态的有力工具。Fucci 质粒通过使用 CSII 序列，能在慢病毒表达包装系统中包装成慢病毒，可以感染分裂及非分裂状况的目的细胞，整合外源基因到细胞染色体上，实现在细胞内的持久稳定表达。而在目的基因前使用 EF-1alpha 启动子起始转录，可以使目的蛋白稳定表达¹⁷。

表达 Fucci 的细胞在 S/G2/M 期发绿色荧光(mAG)，在 G0/G1 期发红色荧光(mKO2)，使跟踪活细胞分裂动态成为可能。

1.3.2 荧光蛋白置换

本课题需要追踪细胞的分裂，让细胞在 S/G2/M 期发荧光可使得锁定正经历

DNA 复制或经历分裂的细胞成为可能。发表的已有的 Fucci 系统中，聚集于 S/G2/M 期的 hGeminin(1/110)与绿色荧光蛋白融合，因此处于 S/G2/M 期的细胞带绿色荧光。然而，从实践中获得的经验提示，蓝光激发条件下（特别是波长 488nm 时），细胞中其他组分如 NADPH、黄素(flavin group)也有一定程度自发荧光¹⁸。因此，在观察绿色荧光蛋白时，本底荧光(background fluorescence)较强，可能会对目的荧光蛋白动态的分析造成干扰。故应置换 hGeminin(1/110)所连荧光蛋白为红色荧光蛋白。

Fucci 系统中已使用了若干荧光蛋白与 hGeminin(1/110)相连，如 mCherry、mVenus 等¹⁹，其中 mKO2 是 mKO((monomeric version of Kusabira Orange)蛋白的突变体，具有快速折叠的特性。因此 mKO2 与 hGeminin(1/110)相连构建的克隆具有优越的性能，可迅速起到指示进入 S 期的细胞的作用。

2 材料与amp;方法

2.1.1 材料试剂

菌株:

E.coli SURE2(Stop Unwanted Rearrangement Events) competent cell

细胞株:

MDCK

293FT

质粒:

mKO2-hCdt1(30/120)/pCSII-EF-MCS

mAG-hGem(1/110) /pCSII-EF-MCS

其他:

NEB 限制性内切酶及缓冲液

NEB T4 DNA 连接酶及缓冲液

Axygen DNA 凝胶回收试剂盒

Axygen 质粒小抽试剂盒

LB 培养基(1% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 1% NaCl)

LB/Amp 平板培养基(1% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 1% NaCl, 1.5% Agar, 终浓度 100ug/mlAmp)

500×氨苄青霉素贮存液

50×TAE 电泳缓冲液(2M Tris-醋酸, 100mM EDTA), 使用时稀释至 1/50

1%琼脂糖胶配制: Agrose 0.6g, 60 ml 1×TAE 溶液

溴化乙锭 (EB 10mg/ml)

DNA 分子 marker (DL100bp)

细胞培养皿 (100mm, 60mm)

细胞三维培养腔 chamber slide

抗生素 PS (终浓度 100 单位盘尼西林和每毫升 100 ug 链霉素)

MDCK 细胞培养液 (MEM + 5% FBS + 1X PS+2.2g/L NaHCO₃+ 2 mM L-谷氨酰胺)

293FT 细胞培养液 (DMEM + 10% FBS + 1X PS+3.7g/L NaHCO₃+ 2 mM L-谷氨酰胺)

BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix

胰酶 (500ml PBS+0.125 g 胰酶粉末+ 5ml stock 100 mM EDTA)

FISHER 公司 MATRIGEL MATRIX 10*5ML CB40234B cat# 354234 lot#

2229979

FuGENE® 6 转染试剂

聚凝胺(Polybrene)病毒感染试剂

2.1.2 主要仪器

超低温冰箱

电热恒温培养箱

可调速摇床

冷冻台式离心机

台式离心机

全自动蒸汽灭菌器

电热鼓风干燥箱

雪花机

电泳仪

电泳槽

凝胶成像系统

移液器

水浴锅

磁力搅拌器

纯水仪

电子天平

PH 计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司

紫外分光光度计

超净工作台

生物安全柜

细胞计数板

荧光倒置显微镜

CO₂ 培养箱

液氮罐

2.2 方法

2.2.1 分子克隆（酶切，连接，感受态制备，转化，抽质粒，菌株的冻存与复苏）

A) 酶切 Fucci 质粒:

用 EcoRI、NotI 双酶切质粒 mKO2-hCdt1(30/120) /pCSII-EF-MCS、
mAG-hGem(1/110) /pCSII-EF-MCS。

建立用于回收的 20ul 酶切体系

Component:	Volume (ul):
Plasmid	16
10X Buffer	2
10X BSA	2
ddH2O	1.6
Enzyme	each 0.2

37℃ 孵育 3h.

B) 琼脂糖凝胶电泳

使用 TAE 制胶。

配胶 0.6g Agarose + 60 ml TAE，盛于 500 ml 配胶专用加热瓶中；

微波加热至完全溶解（加热过程中瓶盖拧松盖在瓶口，以减少水分蒸发）；

将胶槽两侧橡胶处沾上少许水，将胶槽卡在电泳槽中，待胶冷却至 60 度左右时，
开始做胶：10 ul EB（避光保存）滴于板中间，将胶从中央倒入板中，用梳子轻
梳使 EB 均匀同时将胶内气泡赶至四周；

冷却至胶完全凝固（约 20 min）；

调整好胶的方向，用 TAE 没过胶面，拔出梳子，确保没有气体残留在孔内。

上样。

需要混入 6x 的 loading dye（OG 适合割胶回收 >600 的片段，BB 适合割胶回收
小片段）；

点上已加好 loading dye 的分子量的标记。

电泳。

使用 100 V，注意电泳的方向，正负极不要接反，DNA 由负极向正极移动；

电泳 60min 左右。

C) 割胶回收

使用长波长紫外灯观察，可见酶切产物有约 700bp 左右条带一条、大于 1517bp

条带一条。切割 mKO2、带载体的 hGem(1/110)条带，胶回收试剂盒回收，终体积 30ul。之后整块胶用短波长成像。

D) 连接

设立 10 ul 的连接反应体系

Component:	Volume (ul):
10X T4 Buffer	1
T4 DNA Ligase	0.2
Cut insert (mKO2) /H₂O	7
Cut vector (hGem(1/110))	1.8

混匀，短暂离心，于 16℃连接过夜。

E) SURE2 感受态的制备

- 1) SURE2 在 LB 平板上划线培养，37 度过夜，得到单克隆。
- 2) 次日早晨，在 LB 培养液中接种单克隆。接种两管，每管接一个单菌落于 6 ml LB，于 37 度摇床培养。挑单菌落时使用灭菌的接种环（过火灭菌）。
- 3) 选择生长良好的一管，将 5 ml 菌液接种于 500 ml SOB 培养液（分装于 2 个 1000-ml 三角瓶，每瓶 250 ml），22 度摇床中过夜培养，至 OD599 为 0.5-0.6（以 1:100 比例接种时需要在 22 度培养 13h）。从晚上开始 500-ml 培养，次日早晨检查 OD599。接种前先留出参比，可将培养液加入比色皿用 parafilm 封口备用。
- 4) 将 500 ml 培养液分装于 2 个 250-ml 已预冷离心瓶中。（4 度冰箱预冷，下同；如果时间来不及，可放入 -20 度片刻。）
- 5) 冰浴 10 min。
- 6) 3000 rpm，4 度离心 10 min。
- 7) 弃上清，用总体积约 160 ml 的已预冷 transformation buffer 重悬细胞。
- 8) 冰浴 10 min。
- 9) 3000 rpm，4 度离心 10 min。
- 10) 弃上清，用总体积 10 ml 的已预冷 transformation buffer 重悬细胞。
- 11) 加 DMSO 使终浓度为 7%（10 ml 重悬液中加 0.7 ml）。
- 12) 冰浴 10-20 min。
- 13) 标记无菌试管并置于冰上预冷。每个 1.5-ml 试管分装 250 ul 或 400 ul。
- 14) 在干冰或液氮上冷冻 5 min。储存于 -80 度冰箱。每个转化用 50-100 ul。

F) 连接产物转化

- 1) 在 37 度培养箱预热平板。
- 2) 在冰上融化感受态细胞。
- 3) 取 100 ul 感受态并置于转化试管中。
- 4) 加 4 ng DNA (2 ul of 2 ng/ul home-made)
- 5) 冰浴 30 min, 避免震动。
- 6) 42 度水浴精确热激 30 sec, 轻拿轻放。
- 7) 冰浴数分钟, 避免震动。
- 8) 加 SOC 培养液至 1 ml。
- 9) 37 度摇床培养, 250 rpm 1 h, 帮助细胞复苏的。
- 10) 加入来自 1ml 培养液的 100-200 ul。
- 11) 37 度培养箱过夜。

G) 重组质粒的筛选

牙签挑取单菌落, 接种于含 Amp 的 2 ml TB 培养液 (盛在蓝盖试管中, lab stock Amp 是 500x)

37 度振荡培养, 而后抽提质粒

H) 质粒小抽

用灭菌牙签取单菌落, 接于 2~3 ml LB 培养液, LB 培养液培养需要 >16 小时。

37 度摇菌, 摇好后若非立即使用, 可置于 -4 度冰箱保存。

Axygen 质粒小抽试剂盒, 碱裂解法结合硅胶柱纯化技术抽提质粒, 参照试剂盒内说明操作, 注意加入 RNase 的 Buffer P1 应置 4 度存放。

I) 菌株的冻存与复苏

2.2.2 细胞培养

A) 从 -80 度或者液氮复苏细胞及细胞冻存

- 1) 从 -80 度或液氮中取出细胞并快速解冻; 取时注意保护, 防止冻伤或者试管爆裂; 同时, 注意快速, 尽量减少其他样品暴露在空气中的时间。
- 2) 将化开的细胞加入到 5 ml 培养液中, 1000 rpm 离心 5 min, 离心后小心地移去上清。
- 3) 取 10 ml 细胞培养液, 将位于管底的细胞重悬, 转移到 10 cm 的培养皿中, 做好标记, 放入细胞培养箱中培养 (培养箱的条件设为 37 度、5% CO₂)
- 4) 注意观察细胞贴附到培养皿底部的状态, 并根据细胞死亡情况, 及时更换细胞培养液。

5) 细胞冻存时，用 **trypsin** 把细胞悬浮，重悬于含 **10% DMSO** 的细胞培养液（对于比较敏感的细胞，可以采用相对高血清的培养液冻存/复苏）。对于一个长满的 **10 cm** 皿，重悬在 **1.5 ml** 中，而后取 **0.5 ml** 放入冻存管。在冻存管外标明编号、细胞的名称、冻存时间、操作者，录入相关数据到数据库。

B) 细胞传代培养

- 1) 取出 **37 度** 培养的细胞，加入 **PBS + 2mM EDTA**，通过螯合钙离子破坏细胞间相互作用实现悬浮，润洗一遍（**10 cm** 培养板使用 **5 ml**）。
- 2) 加入 **2-3 ml 0.25% Trypsin**（含 **1 mM EDTA** 的 **PBS** 溶液），使用胰酶消化细胞外基质和细胞间相互作用，一般使用的 **Trypsin** 浓度为 **0.25%**。**37 度** 温育，直到轻敲培养皿边缘，可看到细胞浮起（**MDCK** 需要时间在 **5-10** 分钟或者使用 **PBS+EDTA** 两次润洗，一般成纤维细胞如 **293FT** 所需时间较短）。
- 3) 加入含血清的细胞培养液，中和 **Trypsin**，轻轻吹打将贴壁细胞冲下，收集到离心管，**1000 rpm** 离心 **3-5 min**，弃上清（如果做 **1:10** 传代或者细胞比较能耐受残余的 **Trypsin**，可以不离心，直接把需要的细胞和新培养液混合）。
- 4) 使用新的细胞培养液重悬，**37 度** 培养（同一个培养皿可以使用 **3** 次左右，在皿盖上标记清楚）。
- 5) 细胞长到密度在 **95%** 左右时，必须进行传代；过密生长的细胞很容易发生遗传突变；一般两到三天需要更换一次细胞培养液。
- 6) 养细胞，传代超过 **1** 个月，要小心是否老化；除了形态变化外，老化的细胞的，转染、感染效率都会下降。发现细胞老化，要重新复苏；尤其是大量的包装病毒、感染等实验时，应用新近复苏的 **293FT** 细胞和目标细胞。

C) 细胞的三维培养：胞囊形成

- 1) 从 **-80 度** 冰箱取出 **Matrigel**（升温到 **37 度** 就将固化，保持其低温状态；一旦固化，放置 **4 度** 至少 **1** 天，可能重新液化），在冰上使之融成为液态。取细胞培养玻璃皿 **chamber slide/chambered coverglass**，在冰上充分预冷。
- 2) 吸尽玻璃表面的冷凝水，用 **200 ul** 枪头尖在 **chamber slide** 底部均匀地涂上 **Matrigel** 原液 **4 ul/室**，四个角都要涂到，置于 **37 度** 培养箱待其固化（至少 **10** 分钟）。
- 3) 在 **1.5 ml** 离心管中加入培养液 **250ul/室**，并加入终浓度为 **2% Matrigel**。
- 4) 取已终止消化的单细胞悬浮液适量（需要数细胞浓度，最终每室 **4500** 细胞

用于单细胞起始的 clonal cyst 的培养，2 倍的量用于多细胞起始的 mosaic cyst 的培养)，与上步中所得培养液充分混匀（一般要充分吹打 10 次），至吹打出气泡，以保证细胞充分分散为单细胞状态。

- 5) 种于 chamber slide 中，37 度培养（24 小时 cyst 已经极化；3 天应该可以看到 lumen，充分混匀的 MDCK T23 clonal 培养应该是大于 95% 的 cyst 是 single lumen 的；6-7 天的 cyst 彻底成熟）。
- 6) 整个过程注意防止“冰”的污染，冰盒置于安全柜靠外边，用移液枪取 Matrigel 时应擦干净离心管盖边。
- 7) 培养前一天，使用 1/10~1/5 的传代细胞有助于源自单细胞的 clonal cyst 生长。

2.2.3 细胞转染

使用 FuGENE® 6 转染试剂 (12-well plate)

- 1) 转染的 6-8 h 前，于 12 孔板中，每孔悬浮 5×10^5 to 1×10^6 293FT 细胞于 1 ml。
- 2) 将 3 ul FuGene6 加入 100 ul 预热的无血清 DMEM，立即混匀。直接加 FuGene6 到培养液，不要接触管壁。
- 3) 室温孵育 5min。
- 4) 加入总量为 1ug DNA 混液到 FuGene6/medium 的混液,即 3 FuGENE 6 转染试剂:1 DNA，立即混匀。
- 5) 室温孵育 15-30 min。
- 6) 动作轻柔地吸尽旧培养液，每孔加入 500 ul 新培养液
- 7) 将 FuGene6/DNA 混液加入细胞
- 8) 将细胞放回培养箱。避免震动。

2.2.4 转染后的操作

- 1) Fugene6 转染后 12 小时，更换 293FT 培养液为目标细胞的细胞培养液。
- 2) 等待 48-72 小时。
- 3) 收病毒之前，要荧光检测：

视野中 >60% 的细胞是有荧光的，最好是 >90%；同时 293FT 细胞应该是满满的（如果因为操作不够轻，细胞都浮起来了没法估计，肉眼要能够看到明显的漂浮的细胞片）。

要看到细胞融合的现象：如果是细胞质内的荧光，可以看到荧光跨越了几

个细胞；融合的细胞边界很不清楚；融合的细胞不像 293FT 原来的形态，类似“一滩烂泥”。

4) 收病毒

如果保存，只需要小心收取培养液，尽量避免漂浮的细胞片，1.5ml EP 管上写好日期、制备人、病毒类型，直接放入-80 度（冻融会影响病毒活力）。如果马上用，小心收取培养液，尽量避免漂浮的细胞片，收到 1.5ml EP，4 度离心 5 分钟（转速 3500rpm）。

5) 用病毒转细胞，需要目标细胞已经贴壁（铺了细胞，默认 12 小时贴壁，但要看细胞，MDCK 估计 2-4 小时就够了），密度在 70%，最好有明显的 cell-cell contact

一个 12-well 的孔的含病毒细胞培养液给一个 6-well 孔的目标细胞。吸尽原有细胞培养液，加入离心后的含病毒的培养液（避免加入 293FT 细胞残片）

6) 加入 polybrene，终浓度为 1x，小心混匀。

37 度放置 24 小时，补充适量的细胞培养液。

按照细胞生长的速度，需要及时转移细胞到大的培养皿，保持细胞在活跃生长状态。

转细胞后，至少 48 小时，才有可能看到被染细胞发出荧光，很多时候需要 72 小时；好的情况，使用没有浓缩的含病毒的细胞培养液，>20%的细胞有荧光。

7) 此时可以冻存一管转好的细胞。

2.2.5 目的细胞分选

1) 开始前确认待分选细胞的已经被冻存。

2) 分选前把 $>10^7$ 的细胞收集在 15ml 管中（如设备需要，可转入 1.5ml EP 管用于分选）。若 MDCK 10cm 的皿长满，最终悬浮在 750ul 的培养液，未长满依细胞数按比例递减；如从 6cm 皿或 6 孔板中获取，细胞要尽可能多，悬浮体积要尽可能的底。

3) 一般的，分选一个细胞需要另外准备 2 个 15ml 的收集管，内含 1ml 的加了双抗的培养液。额外准备 1~2 个含培养液的收集管以防万一。

4) 如果时间有限，收集到 2×10^4 个细胞即可停止。

5) 所有细胞和培养液（用 parafilm 封口防止冰水污染）放在冰上转运。

6) 分选好的细胞小心转移到 12 孔板中，待细胞贴壁后及时更换新的培养液。

- 7) 默认所有的细胞在分选过程中都可能被污染，操作的时候要避免彼此的隔离：单孔吸取废液后要过火而不能连续多孔操作，盖子要轻拿轻放减少孔间的空气流动等。

2.2.6 活细胞时序成像

A) 成像前细胞处理：MDCK 细胞 3 维培养，并通过两步沉降的方法使细胞尽量靠底部

B) 显微镜预热

- 1) 打开系统总电源，确保包括 CO₂、温度、Shutter 10-3 等正常运行。
- 2) 打开荧光，在成像前 lamp on: 掀 keypad 上 Local 键，表示通过本地键盘控制，根据屏幕上的菜单，按 1 开启光源并根据需要调节荧光强度；光源打开，右手侧应有亮光散出，强度变化也会反映在散出光强；记得调整后切换为 Online。
- 3) 等待条件稳定，如 CO₂ 稳定在 5%，底部温度达到 42 度且盖子温度达到 49 度【按经验，培养液温度为 37 度】，才可开始实验。

C) 放置样品

- 1) 选择 20X 物镜；切换镜头前，确保物镜已经在最低位。如果可能，推荐手动切换。60 或 100 倍的油镜，拿下并保存好。
- 2) 将培养腔的底部槽放到显微镜载物台上（侧面滑入并卡住）。向凹槽中加入 DI 水（加水前确保出水管是闭塞的），水量以没过出水口为宜。超过 24 小时的实验，需要及时关注并通过水管往培养腔凹槽内加水，减少样品的水分损失；建议加入 37 度预热的水，减少由于温度波动对成像的影响。把细胞放入并将皿的盖子换成玻璃质地金属外圈的盖子并固定好。如果需要实时测量培养液的温度，需要将温度探头浸入培养液。通常使用时，该探头及数据线并没有安装。因为不需要监控温度，且光路中允许出现塑料，可以直接使用原来培养皿的盖子（吻合的更好）。最后，将培养腔的盖子合上。
- 3) 因观察使用 chambered coverslip 培养细胞（即容器为长方形），应当使其四角都有所依托并用夹子固定，按照成像区域来确定是左侧全靠还是右侧全靠。
- 4) 使用 XY 操纵杆，调整视野到样品中间，方便观察。
- 5) 小心地放下光源臂，不要撞到培养腔或者样品。
- 6) 对于荧光光源，需要正确设置 Arc Illumination TIRF Set:

- a) 一般情况（非 TIRF 成像）：Field Iris Diaphragm 推进（open），Slit 拉出（out），Wedge Prism 置于空位（out）

- b) 白光 TIRF: Field Iris Diaphragm 推进 (open), Slit 推进 (in), Wedge Prism 置于中间能听到轻微的咔哒一声的位置
- c) Field Iris Diaphragm 拉出 (close) 仅仅是在调节光路时。

2.2.7 Köhler illumination

- 1) 从侧面观察物镜，用 Z drive 粗旋升到最高（即将顶到样品，可以通过物镜的反光程度来确定物镜的相对高度）的位置，切换到 Z drive 细旋。
- 2) 确保亮场光源已经打开（光源臂的上端有光通过孔隙散出），不然按 scope 右下的按钮；按需要调节光强（DIC 需要入射较多的光）。
- 3) 确保光路是通向眼睛的。
- 4) 打开 Micro-Manager，选择所需的 configuration 文件，切换到 BF，点击 live，打开亮场光源的 shutter。也可，通过将 10-3 切换到 Local 模式，手动打开 shutter B。
- 5) 通过 Z drive 从上而下降低物镜，使样品在焦平面。
- 6) 将聚光器（condensor，由光源臂上的旋钮控制）降下，降至底部（正好贴住培养腔盖子的塑料条）。不要在眼睛通过目镜观察样品时，下调聚光器。将视场光阑调到最小状态，向上调节聚光器，直到可以看到一个清楚的六边形（或者其边缘）。调节聚光器的左右螺丝，将六边形居中。展开光阑，将六边形调至恰好看不到。

2.2.8 使用 Micro-Manager

- 1) 将光路切换至相机，应当能在软件中获取图像，细调 Z drive，使想观察的细胞在屏幕上最清晰。
- 2) 调整曝光时间
 - a) 在 configuration set，选择合适的滤片设置（如 BF,GFP 等）
 - b) 调节荧光滤块转盘到相应位置（目前 4 号位可以观察荧光，2 或者 5 号位）
 - c) live 观察图像中曝光强度，根据 histogram: 若较弱，可延长曝光时间；若较强，可缩短曝光时间、降低荧光强度或换用深色的 ND filter。
- 3) 打开 Multi-dimensional Acquisition，输入拍摄的数目和间隔（计算得到的总时间显示在窗口的右中部）
 - a) 对于拍摄文件的命名，以
year-month-day_cell_features_magnification_interval
 - b) 采用 separate image files 的存储方式
 - c) 如果只是单通道成像，可以点击 Acquire 开始成像

d) 对于多位点成像，点击 **edit position list**；点选"**prior_XYstage**"和"**Z drive**" **Axis**，记录三维坐标；首先通过目镜找到要观察的细胞，**mark**，再找下一个目标细胞；等到所有的细胞找到后，切换光路给相机，通过 **live** 的方式对找到的细胞进行细调；注意及时将位点保存。

2.2.9 低倍镜的多点、多日成像

- 1) 设置每 **24h** 拍摄；注意在新 **24h** 开始时检查水槽水量（添加预先加热的 **DI H₂O** 可以减少水温波动导致的焦平面漂移）。
- 2) 无需采用基于软件的 **autofocus**，无法使用 **ZDC**；在温度稳定之后，**20** 倍镜头可 **2** 个小时以上拍摄而不跑焦。
- 3) 成像中，需实时注意；根据画面 **Z** 轴漂移情况，使用 **MDA** 窗口中 **pause** 键暂停拍摄，使用主窗口的 **live** 键结合 **MDA** 窗口的 **goto** 和 **replace** 键调整漂移的焦平面。调整后，继续拍摄之前，需要用 **MDA** 窗口的 **goto** 键回到位置列表中第一个 **position**；因为多点成像时，一轮拍摄好，是预定位到第一个 **position** 准备下一轮的拍摄。
- 4) **24h** 后可根据细胞的状态调整成像计划，如使用 **MDA** 窗口 **remove** 无用的位点或降低拍摄频次，并修改保存文件的名称，之后再开始 **acquire**。拍摄期间，可使用软件 **TeamViewer** 远程观察成像的电脑。

2.2.10 数据获取

- 1) 对于每个 **position**，使用软件 **Fiji** 打开原始 **tiff** 文件。
- 2) 框取目的细胞、复制每一帧，形成 **stack**。选取的目的细胞满足以下条件：
 - a) 开始第一帧时细胞为带/不带荧光的单细胞；
 - b) 在整个拍摄过程中细胞至少在若干帧有拍摄到的荧光，且带荧光细胞个数适于计数；
 - c) 细胞形态正常，胞囊形态正常。
- 3) 在拍摄后期，由于分辨率不能区分极多数量的带荧光细胞等原因，未计其变化。

4) 读数

读数原则：单细胞产生的胞囊中细胞周期相近，即先完成一个细胞周期的细胞先进入下一细胞周期；且在细胞周期中，先进入 **S/G₂/M** 期的细胞先出 **S/G₂/M** 期并进入 **G₀/G₁** 期。表现为照片中先出现荧光的细胞，随时间延续先暗去，后再先出现荧光。

由此，可通过观察每一帧，统计细胞荧光亮起和暗下的帧序数，转换为对应时刻。

胞囊中不同时期各个细胞带荧光的时间，即为其 **S/G2/M** 期的时间。

根据先完成一个细胞周期的细胞较其他细胞先进入下一细胞周期的原则，推出下次有细胞荧光亮起时，该细胞对应上次荧光暗去的时刻。这段时间即为上个分裂期结束后各个细胞对应的 **G0/G1** 期时间。

为防在连续拍摄过程中细胞位置轻微改变使照片失焦，拍摄时间隔一段时间会暂停并调整 **Z** 轴位置。计算每帧对应的时间时，将该部分时间平均计入每帧。

部分图像读数参考了明场的成像。

2.2.11 数据处理及分析

A) 读出的数据部分胞囊全部数据未采用：

- 1) 在胞囊形成过程中，理论上以细胞个数划分的时期中，出现的带荧光细胞少于理论值。
- 2) 在胞囊形成过程中，结合亮场观察，在有四个/八个带荧光的细胞时，这些细胞均非胞囊中细胞的全部，即可能有未表达荧光蛋白的其他细胞参与胞囊形成。

B) 读出的数据胞囊中部分细胞数据未采用：

- 1) 在第一次拍摄后期，**chamber** 中培养液减少，环境条件与开始拍摄时差异大，且影响细胞正常生长。故数据分析时未取用最后 **12h** 的数据。
- 2) 调整 **Z** 轴时停顿造成调整前后曝光亮度不同，照片上细胞亮度不同。有前一帧亮起的细胞后一帧暗去，实则只是曝光亮度变低（对此可从背景即前后照片整体亮度看出）的情况。但此类数据，对随后的数据仍有效用，因为相对随后曝光亮度一致。
- 3) 在胞囊形成过程中，特别是八个细胞时期，因分辨率较低或其他原因，只记录到一部分细胞的荧光亮起的时间，因此，无法与之前细胞分裂后荧光暗去的时刻一一对应。

C) 由推理判断而得出的数据：

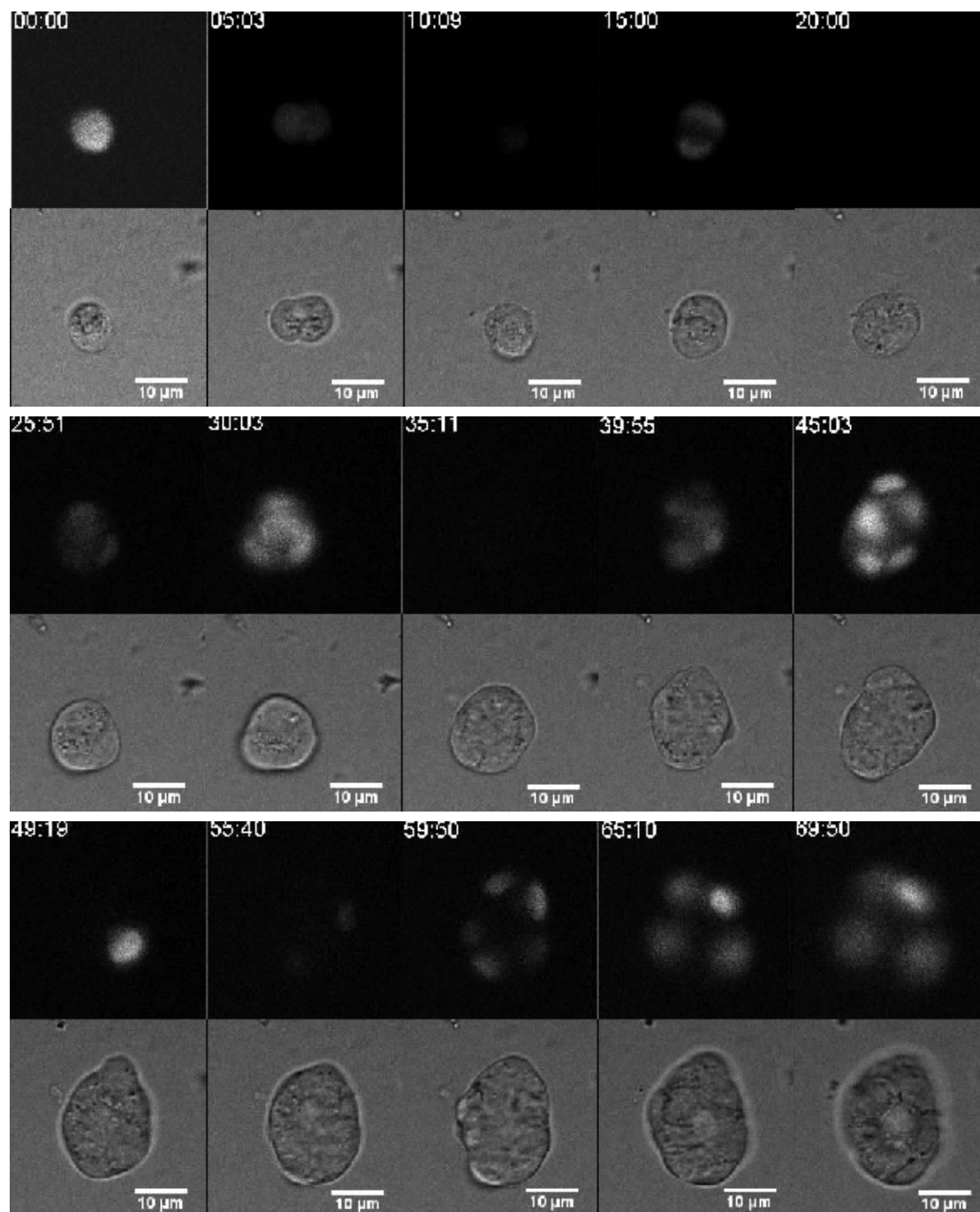
- 1) 第二次拍摄时，由于拍摄开始 **24h** 后有 **6h** 数据未采集，故 **360** 帧与 **361** 帧间间隔 **6h**，这段时间细胞多处于一个细胞分裂为两个细胞后或两个细胞分裂为四个细胞时。有部分细胞 **360** 帧细胞未完全消失(仍较亮)，推理出实际上该细胞消失于 **360** 帧-**361** 帧间，便以 **360** 帧计。有部分细胞二细胞时期一/二细胞亮起出现于 **360-361** 帧之间，根据亮度判断以 **360/361**

帧计。

- 2) 由于时间分辨率不够,前一帧细胞分裂为二后,后数帧仍有一细胞带荧光,故不能确定是此前分裂的细胞因不正常荧光未暗还是有细胞紧接亮起。根据其后表现(分裂正常),可判断应为是细胞紧接亮起。
 - 3) 由于第二次拍摄开始时距 MDCK 开始三维培养已有大于 12h,有细胞在第 1 帧为两个无荧光细胞/一个带荧光一个无荧光细胞,形态看类似一细胞分裂为二细胞后。其后无荧光细胞陆续亮起。推断该而细胞由一个单细胞分裂一次而来。
- D) 可使用的数据用 Office Excel 做图。得出随时间变化,胞囊从单细胞分裂五次,细胞 S/G2/M 期与 G0/G1 期时长的变化。
- E) 两次拍摄数据合并,使用 Graghpad Prism 进行 One-way ANOVA 分析及 Newman-Keuls 前测试。

3 结果

3.1 胞囊形成过程时序成像



1

图 1

如图 1 所示为一个胞囊形成过程的时序成像。可见红色荧光表达于细胞核中。将胞囊按应有细胞数划分为 1、2、4、8、16 细胞时期。上图各时刻对应为 1、1、2、2、4、4、4、8、8、8、16、16、16、16、16 细胞期。

¹ 勘误：图中 scale bar 显示长度应为 20um。

3.2 统计结果

A)

S/G2/M 期时间					
number of cells	1~2	2~4	4~8	8~16	16~32
mean	898.25	545.60	442.25	391.96	361.19
standard deviation	310.45	193.64	115.22	115.76	79.66
variation	96377.72	37497.51	13275.43	13400.72	6346.49
n	11	65	120	175	48
SEM	28.22	2.98	0.96	0.66	1.66

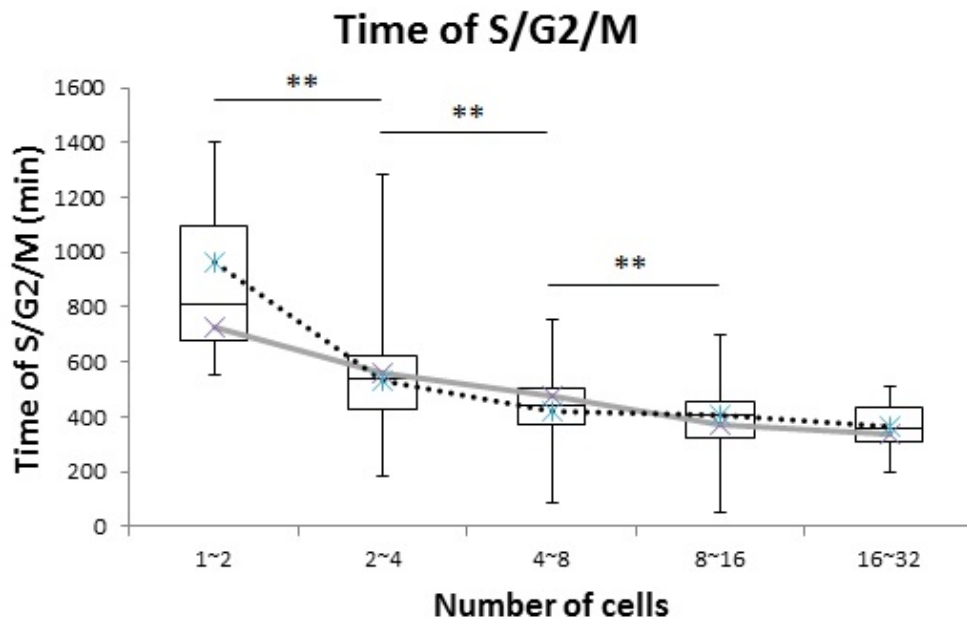


图 2

如图 2 所示，将胞囊按应有细胞数划分为 1、2、4、8、16 细胞时期。当一细胞分裂为二细胞时 x 轴记为“1~2”，依此类推。框图表示的 y 轴的数值自上至下依次为该组数据的 1/4 点、中值、3/4 点。上方的 whisker 表示该组数据的最大值，下方的 whisker 表示该组数据的最小值。数据由两次拍摄数据合并。实线折线表示第一次拍摄所得数据的平均值。虚线折线表示第二次拍摄所得数据的平均值。

**表示 $p < 0.01$ 。

B)

G0/G1 期时间				
number of cells	2	4	8	16
mean	398.60	368.32	416.58	510.71
standard deviation	161.10	150.31	179.18	161.68
variation	25952.62	22591.79	32105.42	26139.22
count	57.00	124.00	213.00	133.00
SEM	2.83	1.21	0.84	1.22

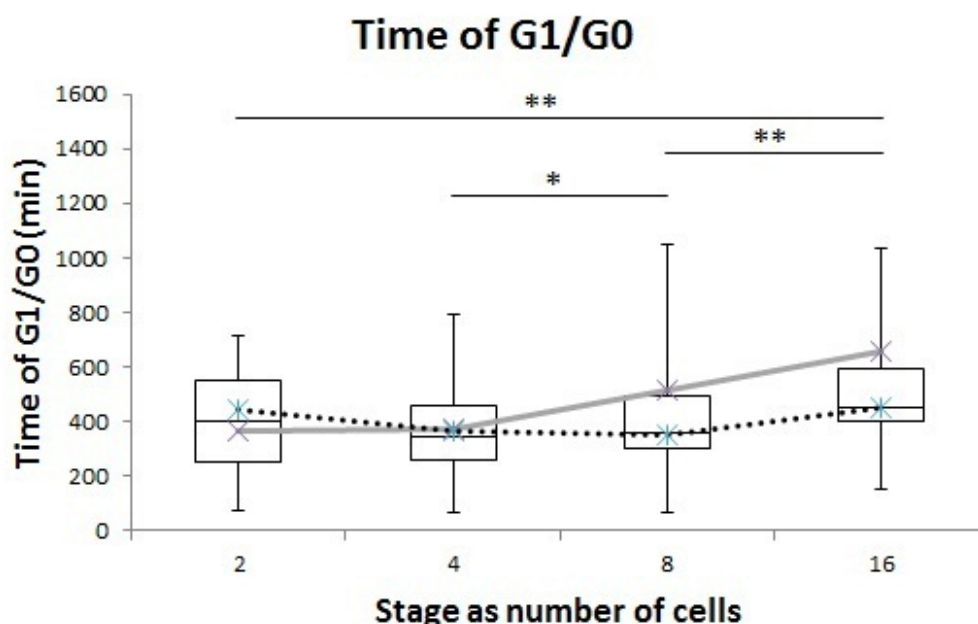


图 3

如图 3 所示，将胞囊按应有细胞数划分为 1、2、4、8、16 细胞时期。框图表示的 y 轴的数值自上至下依次为该组数据的 1/4 点、中值、3/4 点。上方的 whisker 表示该组数据的最大值，下方的 whisker 表示该组数据的最小值。数据由两次拍摄数据合并。

实线折线表示第一次拍摄所得数据的平均值。虚线折线表示第二次拍摄所得数据的平均值。

*表示 $p < 0.05$ ，**表示 $p < 0.01$ 。

3.3 结论

在 MDCK 胞囊形成过程中，前三天经历的四次细胞周期，即从一个细胞分裂为二、二个细胞分裂为四、四个细胞分裂为八、八个细胞分裂为十六个细胞的阶段中，S/G2/M 期减短，而 G0/G1 期（除第一次分裂后与第二次分裂后比较无显著差别外）增长。

4 讨论

4.1 误差分析

- 1) 在开始拍摄时，由于细胞刚进入此环境，虽然温度及 CO_2 浓度未改变，但湿度、 CO_2 进入方式等与此前置于培养箱中有差别，细胞生长增殖可能受到抑制，使第一次分裂 S/G2/M 期及其后 G0/G1 期时间延长。同时，由于细胞所处位置的异质性及数据量较少，第一次分裂 S/G2/M 期时间差异大，方差较其他组数据大。
- 2) 拍摄过程历时 70h 左右。培养室中湿度变化较大。拍摄后期可能对细胞正常生长增殖造成影响。
- 3) 一些帧图像分辨率较低或因为细胞上下浮动或细胞间荧光重叠不能辨个数，图像模糊而造成难以判断荧光出现或消失，读数时可能产生误差。
- 4) 调整 Z 轴时停顿造成调整前后曝光亮度不同，照片上细胞亮度不同。有前一帧亮起的细胞后一帧暗去，实则只是曝光亮度变低（对此可从背景即前后照片整体亮度看出）的情况。当不太明显时仍使用此数据，但可能造成误差。
- 5) 当拍摄结束时，一些胞囊所处的时期，其时期应有的细胞荧光仍未完全亮起。由于存在该时期跟踪完仍不能追踪到所有细胞带荧光的可能，该部分数据可能带来误差。
- 6) 第二次拍摄时，由于拍摄开始 24h 后有 6h 数据未采集，故 360 帧与 361 帧间间隔 6h。这段时间细胞荧光亮起或消失时间都根据情况按 360 帧或 361 帧计。因此数据不十分准确。

有影响的主要包括第二次拍摄统计的十七个胞囊中的六个，其 2 细胞期的 G0/G1 期时长（偏长）、2 细胞分裂为 4 细胞时的 S/G2/M 期时长（偏长或偏短）。这是由于这段时间这几个胞囊处于 2 细胞期的 G0/G1 期或 2 细胞分裂为 4 细胞时的 S/G2/M 期。

统计时，若第 360 帧细胞荧光未出现，而第 361 帧细胞出现荧光，推理出实际上该细胞荧光出现于 360 帧-361 帧，多数时候以第 361 帧计；若第 360 帧细胞荧光未完全消失，而第 361 帧细胞荧光未完全消失，推理出实际上该细胞消失于 360 帧-361 帧，则消失帧序数多数时候按第 360 帧计。且由于计算时 2 细胞分裂为 4 细胞时的 S/G2/M 期数据与此前 2 细胞期的 G0/G1 时长相关联，是一一对应的，故若计算时 2 细胞期的 G0/G1 时长较真实值偏长，自然地 2 细胞分裂为 4 细胞时的 S/G2/M 期时长将偏短。

4.2 改进

在开始拍摄时，由于细胞刚进入此环境，虽然温度及 CO_2 浓度未改变，但湿度、 CO_2 进入方式等与此前置于培养箱中有差别，一些细胞可能“shock”，生长有暂时停滞的现象。应提前数小时将三维培养的腔室置于该拍摄环境中。

虽然拍摄频次越多，图像时间分辨率越高，但由于过多表达荧光蛋白可能对细胞生长有不利影响，因此可以在拍摄初期 S/G2/M 期较长（细胞表达荧光蛋白）时降低拍摄频率，而在拍摄中后期提高频率。如此，对于细胞数较多、变化较快的拍摄中后期胞囊，利于捕捉荧光变化。

因一些组数据量不够，应扩大样本量，重复实验。

对于由于细胞上下浮动或细胞间荧光重叠使图像模糊等情况，可采用激光共聚焦显微镜拍摄成三维图像。

4.3 展望

本课题探究了 MDCK 胞囊形成初期细胞分裂周期中 S/G2/M 期与 G0/G1 期的时长。初步得到了在所记录的阶段中，S/G2/M 期变短，而 G0/G1 期（除第一次分裂后与第二次分裂后比较无显著差别外）延长。但由于一些组数据量不够，还应扩大样本量，重复实验，验证结果。

另外，在以 MDCK 胞囊为模型的研究中，常常涉及胞囊形成从初始到成熟的整个阶段，因此，进行胞囊形成整个阶段细胞分裂周期特性的研究是有必要的。在胞囊形成过程最初三天之后，同样可以使用本方法，截取一段时间，对该过程中细胞进行跟踪。当然，使用激光共聚焦显微镜拍摄能使初期之后更复杂的情况得以清晰地观察。

除细胞分裂周期中 S/G2/M 期与 G0/G1 期的时长外，M 期时长亦是细胞周期的重要特性，为此还应就 M 期时长进行检测、分析：观察细胞带荧光到荧光消失的几帧，记录细胞荧光团从圆变为分散到荧光团一分为二最终消失的时间。

本课题进行过程中，从图像上观察荧光团出现、消失以获取数据耗时耗力。可以探究开发通过检测成簇荧光像素点的个数确定发光细胞的个数及通过检测同一区域前后帧像素亮度变化确定荧光团出现、消失的图像分析方法。

5 参考文献

- ¹ Dukes et al. The MDCK variety pack: choosing the right strain. *BMC Cell Biology*.2011.12:43
- ² O'Brien et al. Building epithelial architecture:insights from three-dimensional culture models. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2002.3:531-537
- ³ Andrew et al. Morphogenesis of epithelial tubes: Insights into tube formation, elongation, and elaboration. *Developmental Biology*.2010.341:34–55
- ⁴ Guo et al. The microenvironmental determinants for kidney epithelial cyst morphogenesis. *European Journal of Cell Biology*.2008. 87:251–266
- ⁵ Zheng et al. LGN regulates mitotic spindle orientation during epithelial morphogenesis. *J Cell Biol*. 2010.189(2):275–288
- ⁶ Sakurai et al. Activated Ras protein accelerates cell cycle progression to perturb Madin-Darby canine kidney cystogenesis. *J Biol Chem*.2012.287(38):31703-11
- ⁷ Tanner et al. Coherent angular motion in the establishment of multicellular architecture of glandular tissues. *PNAS* .2012.109(6):1973–1978
- ⁸ Martin-Belmonte et al. Cell-polarity dynamics controls the mechanism of lumen formation in epithelial morphogenesis. *Curr Biol*.2008.18: 507–513
- ⁹ Engelberg et al. MDCK cystogenesis driven by cell stabilization within computational analogues. *PLoS Computational Biology*.2011.7:30-49
- ¹⁰ Guo et al. The microenvironmental determinants for kidney epithelial cyst morphogenesis. *European Journal of Cell Biology*.2008. 87:251–266
- ¹¹ Sakaue-Sawano et al. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell*.2008.132:487–498
- ¹² Li et al. The SCF^{Skp2} ubiquitin ligase complex interacts with the human replication licensing factor Cdt1 and regulates Cdt1 degradation. *J Biol Chem*.2003.278:30854–30858.
- ¹³ Wei et al. Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature*.2004.428:194–198.
- ¹⁴ Benmaamar et al. Involvement of the SCF complex in the control of Cdh1 degradation in S phase. *Cell Cycle*.2005.4:1230–1232.
- ¹⁵ Nishitani et al. The human licensing factor for DNA replication Cdt1 accumulates in G1 and is destabilized after initiation of S-phase. *J Biol Chem*.2001.276:44905–44911
- ¹⁶ Blow, J.J., and Dutta, A. Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2005.6:476–486.

¹⁷Teschendorf et al. Comparison of the EF-1 alpha and the CMV promoter for engineering stable tumor cell lines using recombinant adeno-associated virus. *Anticancer Research*.2002. 22:3325-3330

¹⁸ Monici M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Annu Rev*.2005.11:227–256.

¹⁹ Sakaue-Sawano et al. Tracing the Silhouette of Individual Cells in S/G/M Phases with Fluorescence. *Chemistry & Biology*.2008.15:1243–1248.

6 致谢

本课题的设计、实验操作及结果讨论的进行均得到了我的导师蔡亮老师的悉心指导和大力帮助。蔡老师对科学研究的热情与积极态度及尽职尽责、勤奋严谨的态度也极大地感染了我，使我尽力投入到课题的研究中，获得了诸多乐趣。

也要感谢实验室的工作人员徐源，准备了实验所用的许多试剂材料。同时，在向实验室的牟男、曹淑中、王洁、张晓丽、姚龙芳等师兄师姐的请教学习，及与陈珺、郭昊天、陈天骐同学的讨论交流中，我也学到了很多知识，了解到许多经验及不同的思路想法，对课题的实验工作有较大帮助。

同时要感谢生科院其他老师、同学在我需要时给予我的帮助。

-
- ¹ Dukes et al. The MDCK variety pack: choosing the right strain. *BMC Cell Biology*.2011.12:43
- ² O'Brien et al. Building epithelial architecture:insights from three-dimensional culture models. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2002.3:531-537
- ³ Andrew et al. Morphogenesis of epithelial tubes: Insights into tube formation, elongation, and elaboration. *Developmental Biology*.2010.341:34–55
- ⁴ Guo et al. The microenvironmental determinants for kidney epithelial cyst morphogenesis. *European Journal of Cell Biology*. 2008. 87:251–266
- ⁵ Zheng et al. LGN regulates mitotic spindle orientation during epithelial morphogenesis. *J Cell Biol*. 2010.189(2):275–288
- ⁶ Sakurai et al. Activated Ras protein accelerates cell cycle progression to perturb Madin-Darby canine kidney cystogenesis. *J Biol Chem*.2012.287(38):31703-11
- ⁷ Tanner et al. Coherent angular motion in the establishment of multicellular architecture of glandular tissues. *PNAS* .2012.109(6):1973–1978
- ⁸ Martin-Belmonte et al. Cell-polarity dynamics controls the mechanism of lumen formation in epithelial morphogenesis. *Curr Biol*.2008.18: 507–513
- ⁹ Engelberg et al. MDCK cystogenesis driven by cell stabilization within computational analogues. *PLoS Computational Biology* .2011.7:30-49
- ¹⁰ Guo et al. The microenvironmental determinants for kidney epithelial cyst morphogenesis. *European Journal of Cell Biology*. 2008. 87:251–266
- ¹¹ Sakaue-Sawano et al. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell*.2008.132:487–498
- ¹² Li et al. The SCF^{Skp2} ubiquitin ligase complex interacts with the human replication licensing factor Cdt1 and regulates Cdt1 degradation. *J Biol Chem*.2003.278:30854–30858.
- ¹³ Wei et al. Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature*.2004.428:194–198.
- ¹⁴ Benmaamar et al. Involvement of the SCF complex in the control of Cdh1 degradation in S phase. *Cell Cycle*.2005.4:1230–1232.
- ¹⁵ Nishitani et al. The human licensing factor for DNA replication Cdt1 accumulates in G1 and is destabilized after initiation of S-phase. *J Biol Chem*.2001.276:44905–44911
- ¹⁶ Blow, J.J., and Dutta, A. Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2005.6:476–486.
- ¹⁷ Teschendorf et al. Comparison of the EF-1 alpha and the CMV promoter for engineering stable tumor cell lines using recombinant adeno-associated virus. *Anticancer Research*.2002. 22:3325-3330
- ¹⁸ Monici M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Annu Rev*.2005.11:227–256.
- ¹⁹ Sakaue-Sawano et al. Tracing the Silhouette of Individual Cells in S/G/M Phases with Fluorescence. *Chemistry & Biology*.2008.15:1243–1248.

