基于微球的流式多因子检测

Cytometric Beads-based Immunoassays to Quantify Multiple Soluble Analytes

靳婕华[#], 周明菊[#], 张超^{*}

感染性疾病诊疗与研究中心, 解放军总医院第五医学中心, 北京市

*通讯作者邮箱: zhangch302@163.com

[#]共同第一作者/同等贡献

引用格式: 靳婕华, 周明菊, 张超. (2019). 基于微球的流式多因子检测. *Bio-101* e1010329. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010329.

How to cite: Jin, J. H., Zhou, M. J. and Zhang, C. (2019). Cytometric Beads-based Immunoassays to Quantify Multiple Soluble Analytes. *Bio-101* e1010329. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010329. (in Chinese)

摘要: 可溶性蛋白质的定量分析广泛应用于免疫学、神经生物学、肿瘤、代谢等领域的研究。与传统 ELISA 技术相比, 基于微球的多指标检测技术能够实现从单份标本中同时检测多种指标, 大大提高了科研人员的工作效率以及实现了对稀少珍贵样品的高通量分析 (Lehmann 等, 2017)。其中代表技术是 Luminex 和流式多因子检测。Luminex 依赖专用设备, 门槛较高, 而流式细胞仪越来越普遍。流式多因子检测也衍生出了诸多代表性的技术, 例如 BD CBA (cytometric bead array system, CBA), Thermo 公司旗下的 FlowCytomix 技术, AimPlex 公司的 AimPlex, Biolegend 公司的 LEGENDplex 等。不同公司的技术原理上类似, 但具体操作及因子组合不尽相同, 可以根据实验的实际需求进行选择。本文将以 LEGENDplex 为例进行说明, 实验中可依据个性化需求进行比较和选择 (<https://www.biolegend.com/legendplex>)。

图 1. LEGENDplex 检测原理示例

LEGENDplex 首先根据微球粒径分为较小的 A、较大的 B 两类，在每类微球上，再通过标记不同强度荧光来进行进一步区分 (如图 1 step1 中，不同的 A 类微球标记有不同强度的 APC 荧光信号，以微球颜色深浅为例)。其中 A 类微球分为 6 种，B 类微球分为 7 种，因此 LEGENDplex 最多同时能够支持 13 种目标蛋白的检测。每一种微球分别耦连对应指标的捕获抗体，可特异性捕获样品中或标准品中的目标蛋白 (分析物)。捕获微球、目的分析物与加入的检测抗体形成双抗夹心的“三明治”结构，经过孵育和洗涤，再与藻红蛋白标记的链霉亲和素 (SA-PE) 反应 (图 1 step 2)。通过流式检测每一群微球在 PE 通道的信号强度，来反应分析物的含量 (图 1 step 3)。最后，通过分析软件对分析物进行定量分析 (图 1 step 4)。

关键词：多因子检测，微球，流式

材料与试剂

1. Beads
2. 1.5 ml EP 管
3. 各种规格 Tip 头
4. 排枪加样槽
5. 无菌水
6. SA-PE

流式多因子检测试剂 (根据需要进行选择或个性化定制):

7. Assay Buffer
8. Wash Buffer

仪器设备

1. 流式细胞仪 (BD FACSCalibur, BD FACSCanto, BD LSRFortessa 等均可，理论上含 SSC, APC, PE 检测通道的即满足使用)
2. 涡旋振荡仪 (WIGGENS, model: Vortex3000)
3. 水平离心机 (Thermo Scientific, model: Sorvall ST 40)
4. 移液器 (Eppendorf 0.5~10 μ l, 20~200 μ l, 100~1,000 μ l, 200~2,000 μ l 8 通道排枪)

实验步骤

一. 试剂准备

1. Beads 准备

将所需 Beads 剧烈涡旋 1 min 使 Beads 充分混匀。计算 Beads 用量。每个反应 25 μ l。根据反应用量，用 Assay Buffer 稀释。

注：对于未预混的 Beads，需要自行配制工作浓度：配制前先涡旋 3 min，根据所需要反应数计算用量总体积，总体积/13 等于单个因子用量，单个因子用量 $\times$ 因子数 = beads 体积，总体积 - beads 体积 = 加入 Assay Buffer 体积。举例：5 因子试剂盒做 50 个反应需 1.5 ml 工作浓度预混 bead，每个因子 beads (13x) 需要 115 μ l (总 beads 体积是 575 μ l)，加入 925 μ l Assay Buffer，涡旋混匀即可。

2. Wash Buffer 准备

将 20 $\times$ WB 放置室温，使其中盐分充分溶解，用蒸馏水将其配成 1 $\times$ WB。

3. 标准品准备

用 250 μ l Assay Buffer 溶解 Standard，颠倒多次使其充分混匀，静止 10 min，然后移入 EP 管中，标记为 C7。另取 7 个 EP 管，分别标记为 C6/C5/C4/C3/C2/C1/C0，每个管中加 75 μ l Assay Buffer，4 倍比稀释，从 C7 中取出 25 μ l 进行梯度稀释，直到稀释到 C1 为止，C0 为 Assay Buffer (如图 2)，-80 $^{\circ}$ C 储存一个月。

图 2. 标准品准备

4. Mitrix B 准备

用 5 ml Assay Buffer 溶解 Mitrix B，颠倒多次使其充分混匀，静止 15 min 以保证粉末充分溶解，-80 °C 储存一个月。

二. 实验操作流程

具体的操作流程可参见图 3。

图 3. 实验操作流程

三. 操作步骤

1. 试剂盒中组分恢复至室温。

2. 检测过程:

2.1 检测血清血浆样本:

样品准备: 血清血浆样本, 需使用 Assay buffer 稀释一倍 (50 μ l 样本 + 50 μ l Assay buffer)。

加 25 μ l Assay Buffer 到各样品管。

加 25 μ l Mitrix B 到各标准品管。

加 25 μ l 各标准品到相应标准品管。

加 25 μ l 各样品到相应样品管。

加 25 μ l 混合 beads 到各管。

加 25 μ l 检测抗体到各管。

注: 在加 Beads 时, 避免 Beads 沉降, 每管的终体积为 100 μ l。

2.2 检测细胞培养上清样本 (无 Matrix B):

加 25 μ l Assay Buffer 到各管。

加 25 μ l 各标准品到相应标准品管。

加 25 μ l 各样品到相应样品管。

加 25 μ l 混合 beads 到各管。

加 25 μ l 检测抗体到各管。

注: 在加 Beads 时, 避免 Beads 沉降, 每管的终体积为 100 μ l。

3. 避光, 1,000 rpm 震荡 EP 管, RT 孵育 2 h。

4. 加 25 μ l SA-PE 到各管。

注: 使用前轻柔涡旋混匀, 短时离心。

5. 避光, 1,000 rpm 震荡 EP 管, RT 30 min。

6. 1,000 $\times g$ 离心 5 min。

7. 用枪头小心吸弃上清 125 μ l。注意勿吸除 Beads, 尽可能去除液体。

8. 每管加 200 μ l 1 $\times$ WB。涡旋 Beads, 1,000 $\times g$ 离心 5 min, 弃上清。

9. 每管加 200~300 μ l 1 $\times$ WB。涡旋 Beads。

10. 将 Beads 转移至流式管, 准备流式上机。

四. 流式仪器调试 (首次应用, 以 BD FACSCanto 为例)

1. 开机检查运行情况。
2. 设置数据收集文件模板。
 - 2.1 在 BD FACSDiva 软件上创建新的模板, Experiment > New Experiment。
 - 2.2 打开 Worksheet, 创建 “dot plot”, X 轴为 FSC, Y 轴为 SSC, 二者为线性模式; 创建两个门: Bead A 和 Bead B。
 - 2.3 新建两个点状图, 均以 PE 为 X 轴, APC 为 Y 轴, 分别显示上述两个门, 数据显示应为 log 模式。
3. 设置 PMT 电压
 - 3.1 震荡混匀 Raw Beads, 分装 400 μ l Raw Beads 到 FACS 管。
 - 3.2 机器流速设为 low, 运行, 确保可见两群 Beads (A 和 B)。
 - 3.3 继续调试, 确保 A 和 B 分离完全, 且 FSC 和 SSC 读值大于 50 ($\times 1,000$)。
 - 3.4 调整 Bead A 和 Bead B 门范围, 确保将群覆盖。
 - 3.5 调整 FITC 设置, 以确保多数 Beads 介于 $10e1 \sim 10e2$ 之间。
 - 3.6 调整 PE 设置, 以确保多数 Beads 介于 $10e1 \sim 10e2$ 之间。
 - 3.7 调整 APC 设置, 确保所有 Beads 的荧光强度在 $1 \times 10e2 \sim 5 \times 10e4$ 之间。
 - 3.8 保存设置, 准备样品上机。

五. 样品上机及分析

1. 调试完成后, 打开文件模板, 设置每个分析物收集数: 300 左右。比如 8 个因子, Beads 数目应该至少收集 2,400 个。
2. 震荡样品, 待机器稳定上样, 设置机器流速为 Low。数据导出, 软件分析。

结果与分析

人外周血单核细胞 (PBMC) 分别用 LPS 和 CD3/CD28 ($1 \mu\text{g/ml}$) 刺激 2 d 和 4 d, 收集细胞培养上清, 检测 13 种细胞因子的表达量 (浓度单位: pg/ml) 变化 (图 4)。

图 4. PBMC 刺激后培养上清 13 种细胞因子表达水平

失败经验

1. 微球分群不均一

可能微球未充分混匀。微球容易沉积，使用之前必须充分涡旋。样品较多微球加样时，为防止微球沉积，应该每隔一段时间（例如每加 2~3 列）再次短暂涡旋混匀。

2. 标准曲线不理想

可能为样品交叉污染。加样时应严格防止交叉污染，例如标准品从低浓度至高浓度最后加样，优先用排枪加入共同的组分等。

3. 碎片信号过多

上调 FSC 和 SSC 的阈值。如果在调整阈值以后问题依然存在，可重复样品的洗涤步骤或者再次稀释样品。

4. 检测结果值偏低

样本避免反复冻融，冻融会导致蛋白降解。

致谢

本工作得到解放军总医院第五医学中心和中国科学院生物物理研究所的支持。本文实验方案改编自本团队的已发表文章 (Ma 等, 2014 和 Zhang 等, 2018)。

参考文献

1. Lehmann, J. S., Zhao, A., Sun, B., Jiang W. and Ji, S. (2017). [Multiplex cytokine profiling of stimulated mouse splenocytes using a cytometric bead-based immunoassay platform](#). *J Vis Exp* 129: e56440.
2. Ma, F., Feng, J., Zhang, C., Li, Y., Qi, G., Li, H., Wu, Y., Fu, Y., Zhao, Y., Chen, H., Du, J. and Tang, H. (2014). [The requirement of CD8+ T cells to initiate and augment acute cardiac inflammatory response to high blood pressure](#). *J Immunol* 192(7): 3365-3373.
3. Zhang, C., Feng, J., Du, J., Zhuo, Z., Yang, S., Zhang, W., Wang, W., Zhang, S., Iwakura, Y., Meng, G., Fu, Y. X., Hou, B. and Tang, H. (2018). [Macrophage-derived IL-1 \$\alpha\$ promotes sterile inflammation in a mouse model of acetaminophen hepatotoxicity](#). *Cell Mol Immunol* 15(11): 973-982.