B 细胞分化相关转录因子的流式检测

The Detection of B Cell Differentiation-related Transcription Factors by Flow Cytometry

刘懿蕃, 华兆琳*, 侯百东*

感染与免疫重点实验室, 中国科学院生物物理研究所, 北京

*通讯作者邮箱: zhua@ibp.ac.cn; baidong_hou@ibp.ac.cn

引用格式: 刘懿蕃, 华兆琳, 侯百东. (2019). B 细胞分化相关转录因子的流式检测. *Bio-101* e1010341. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010341.

How to cite: Liu, Y. F., Hua, Z. L. and Hou, B. D. (2019). The Detection of B cell Differentiation-related Transcription Factors by Flow cytometry. *Bio-101* e1010341. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010341. (in Chinese)

摘要: B 细胞在抗原活化后除了分化成抗体分泌细胞 (浆细胞) 外, 还可以分化成生发中心细胞、记忆细胞等具有不同生理功能的细胞类型。以往对于 B 细胞分化调控的研究由于体外培养困难受到很大限制。我们利用实验室建立的抗原特异性 B 细胞标记和富集技术, 可以在动物体内获得抗原特异性 B 细胞, 这将有力地推动对 B 细胞分化机制和调控规律的研究。由于流式细胞仪是使细胞以单个方式依次通过探测光束, 并采集细胞被光照时产生的各种信号, 并能对多个荧光参数进行关联分析的一种仪器, 所以我们对富集后的抗原特异性 B 细胞分化相关转录因子通过流式细胞仪进行检测。

关键词: B 细胞, 流式细胞染色, 流式细胞仪

材料与试剂

1. 5 ml 流式管
2. 枪尖若干: 2 μ l、20 μ l、100 μ l、200 μ l 和 1 ml
3. 40 μ m 和 70 μ m 过滤筛
4. U 型底 96 孔板
5. 六孔板
6. 15 ml、50 ml 离心管
7. 1 ml 带针注射器
8. 解剖工具和烧杯

9. 可放置 5 ml 流式管的试管架 2~3 个
10. Anti-Cy5/Anti-Alexa Fluor 647 MicroBeads (Miltenyi, catalog number: 130-091-395)
11. LS Separation columns (Miltenyi, catalog number: 130-042-401)
12. 小鼠 (C57BL/6 小鼠, 雌雄不限, 8 周以上, 数量根据实验需求安排)
13. 大鼠血清
14. 流式抗体 (表 1)

表 1. 流式抗体详细信息

抗体名称	生产公司	货号	克隆号
PE-CF594 Rat Anti-Mouse CD45R	BD	562290	RA3-6B2
Anti-Mouse IgM PE-Cyanine7	eBioscience	25-5790-82	II/41
Brilliant Violet 711™ anti-mouse IgD	Biolegend	405731	11-26c.2a
Anti-Mouse CD38 Alexa Fluor 700	eBioscience	56-0381-82	90
APC-Cy™7 Rat Anti-Mouse CD19	BD	557655	1D3
PE Rat Anti-Mouse T- and B-Cell Activation Antigen	BD	561530	GL-7
PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse CD8a	Biolegend	100734	53-6.7
Anti-Human/Mouse IRF4 eFluor 450	eBioscience	48-9858-82	3E4
或者			
PE-CF594 Rat Anti-Mouse CD45R	BD	562290	RA3-6B2
Anti-Mouse IgM PE-Cyanine7	eBioscience	25-5790-82	II/41
Brilliant Violet 711™ anti-mouse IgD	Biolegend	405731	11-26c.2a
Anti-Mouse CD38 Alexa Fluor 700	eBioscience	56-0381-82	90
APC-Cy™ 7 Rat Anti-Mouse CD19	BD	557655	1D3
Anti-Human/Mouse GL7 (T and B Cell Activation Marker) eFluor 450	eBioscience	48-5902-82	GL-7
PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse CD8a	Biolegend	100734	53-6.7
Anti-Human/Mouse T-bet PE	eBioscience	12-5825-82	eBio4B10

15. DNase I 10 mg/ml (Worthington, catalog number: LS002140, 溶剂为 20 mM Tris, 1 mM MgCl₂, PH 7.5)
16. Collagenase 4,000 u/mg (Worthington, catalog number: LS004177, 溶剂为 PBS)
17. Anti-CD16/32 抗体
18. FCS

19. Qb-AF647 (荧光蛋白) [Qb 为实验室自行表达纯化, 用 AF647 标记试剂盒 (Invitrogen, catalog number: A20173) 标记 Qb, 合成 Qb-AF647]
20. PBS 溶液和蒸馏水 (0.22 μ m 滤膜过滤)
21. RPMI-1640 (HyClone, catalog number: SH30809.01)
22. HEPES (25 mM, PH 7.4) (Sigma-Aldrich, catalog number: H3375, 溶剂为 ddH₂O)
23. NaN₃
24. Tris
25. MgCl₂
26. NaOH
27. EDTA·2H₂O
28. BD Cytotfix/Cytoperm 缓冲液
29. BD 1 x Cytoperm/Wash 缓冲液
30. 消化液 (见溶液配方)
31. FACS 缓冲液 (见溶液配方)
32. FC block (见溶液配方)
33. 0.5 M EDTA (见溶液配方)

仪器设备

1. 10 μ l、200 μ l、1,000 μ l 移液枪
2. 12 通道 200 μ l 排枪
3. 磁力架 (Miltenyi)
4. 水浴锅
5. 高压灭菌锅
6. 台式冷冻离心机 (Thermo, model: LEGEND RT+)
7. 恒温培养箱
8. 旋转仪
9. 细胞颗粒计数器 (Beckman, model: Coulter Z2)
10. 旋涡混匀器 (配抗体 mix)
11. BD FACS 流式细胞仪 (BD, model: BD LSRFortessa), 配置 3B-6V-4YG-3R-2UV (表 2)

表 2. 流式细胞仪激光器配置信息

流式细胞仪	激光器
BD LSRFortessa	355nm
	405nm
	488nm
	561nm
	633nm

实验步骤

一、收集细胞

1. 收集所有淋巴结 (腹股沟、腋窝、臂) 或脾脏 (具体操作步骤详见视频 1~2), 放在 6 孔板中, 每孔含 1 ml 消化液。

注: 如果同时分离淋巴结和脾脏, 将淋巴结和脾脏分成两个孔。

视频 1. 收集淋巴结步骤

视频 2. 收集和解剖脾脏步骤

2. 对于脾脏，先用 1 ml 带针注射器吸取孔中消化液冲洗脾细胞，然后用手术刀片将组织切碎，组织块应能通过 1 ml 移液管尖端的孔，将细胞吹打至无可见团块。并将细胞转移到 15 ml 离心管中，再向孔中加入 4 ml 消化液冲洗该孔，并合并到同一管中。对于淋巴结，用手术刀片将组织切碎，并将细胞转移到 15 ml 离心管中，再向孔中加入 4 ml 消化液冲洗该孔，并合并到同一管中。
3. 将离心管在 37 °C 水浴中孵育 5 分钟，然后在 37 °C 培养箱中以大约 20 转/分的速度旋转 20 分钟 (总共 25 分钟的消化时间)。这一步骤对于从淋巴结和脾脏中取出血浆细胞至关重要。

注：未消化的细胞含有更多的非特异性细胞，这些细胞将与抗 AF647 磁珠结合。

4. 向每管中加入 100 μ l 0.5 M EDTA，并用移液枪吹散细胞聚集物。在 37 °C 培养箱下以大约 20 转/分的速度再旋转 5 分钟。
5. 在 50 ml 离心管口放置 70 μ m 细胞过滤筛。将消化后的细胞悬浮液倒在细胞筛上，并用注射器栓塞将剩余的组织捣碎，使之通过细胞筛。用 FACS 缓冲液先将消化管冲洗干净，再用 FACS 缓冲液冲洗细胞筛，之后用 FACS 缓冲液将最终体积调至 40 ml，翻转 50 ml 离心管至细胞均匀。
6. 细胞计数。

注：请根据实验室具体设备情况，选择相应计数方法。

7. 以 455 x g 的转速在 4 °C 下离心细胞 5 分钟，尽可能地倒出上清液。轻敲细胞颗粒使之完全松散。加入 200 μ l Fc Block，重新悬浮。在冰上孵育 5 分钟，然后进入下一步。

二、QB-AF647 染色 (Hua 和 Hou, 2013)

1. 加入 1 μ l Qb-AF647 (1.0 μ g/ μ l, 标记率 10~20%)。每个样品加入 1 μ g Qb-AF647, 轻轻敲击和晃动, 混合均匀。在 4 °C 冰箱中避光染色 30 分钟。
2. 用 20 ml FACS 缓冲液冲洗细胞, 然后以 311 $\times$ g 的速度 4 °C 离心 5 分钟。倒出上清液; 轻敲细胞颗粒使之完全松散。
3. 向细胞中加入 200 μ l FACS 缓冲液, 并用移液器使之重新悬浮。
4. 加入 15 μ l Anti-Alexa647 磁珠, 混合均匀, 4 °C 孵育 15 分钟。
5. 用 40 ml FACS 缓冲液清洗细胞, 然后离心 (455 $\times$ g, 5 分钟, 4 °C)。

三、MACS 富集 (Hua 和 Hou, 2013)

1. 在 Midimacs 磁铁上放置一个 Mitenyl LS 柱, 并用 3 ml FACS 缓冲液进行预冲洗, 弃废液。在柱下放置一个新的 15 ml 离心管。
2. 倒出细胞离心后的上清液, 将细胞颗粒重新悬浮在 3 ml FACS 缓冲液中, 并用 40 μ m 细胞筛过滤。将过滤后细胞加入 LS 柱中, 至细胞通过 LS 柱后, 立即加入 3 ml FACS 缓冲液冲洗 LS 柱。
3. 停止滴水后, 将 LS 柱从磁铁上取下, 放在一个新的 15 ml 离心管上。
4. 向 LS 柱中加入 5 ml FACS 缓冲液, 用活塞一次推动缓冲液通过。
5. 离心收集细胞 (311 $\times$ g, 5 分钟, 4 °C 离心)。用 100 μ l FACS 缓冲液重新悬浮细胞。
6. 细胞计数。

注: 请根据实验室具体设备情况, 选择相应计数方法。

7. 根据细胞计数结果, 取 1 $\times$ 10⁶ 细胞在 96 孔 U 型板中。

四、样品染色 (表 3)

表 3. 流式染色配置方案

Un-stain 管 (1 管)	不做任何处理的细胞
单染管 (8 管)	分别加入 B220-PE-CF594、IgM-PE-Cy7、IgD-BV711、CD38-AF700、CD19-APC-Cy7、GL-7-PE、CD8-PerCP-Cy5.5、IRF4-EF450 抗体做单染对照调节补偿
样本管 (n 管)	1. 表面染色, 同时加入 B220-PE-CF594、IgM-PE-Cy7、IgD-BV711、CD38-AF700、CD19-APC-Cy7、GL-7-PE、CD8-PerCP-Cy5.5。 2. 细胞固定后进行胞内染色, 加入 IRF4-EF450 抗体
或者	
单染管 (8 管)	分别加入 B220-PE-CF594、IgM-PE-Cy7、IgD-BV711、CD38-AF700、CD19-APC-Cy7、GL-7-EF450、CD8-PerCP-Cy5.5、T-bet-PE 抗体做单染对照调节补偿
样本管 (n 管)	1. 表面染色, 同时加入 B220-PE-CF594、IgM-PE-Cy7、IgD-BV711、CD38-AF700、CD19-APC-Cy7、GL-7-EF450、CD8-PerCP-Cy5.5。 2. 细胞固定后进行胞内染色, 加入 T-bet-PE 抗体

- 按照以上染色方案预先配制好抗体单染管和样品管溶液, 离心 96 孔板 (863 x g, 1 分钟, 4 °C), 除去上清液, 轻轻拍打板两侧使细胞颗粒松动;
- (可选) 对于小鼠来源的单克隆抗体染色, 或对于可能受染色抗体的 FC 段结合影响的弱信号, 用 0.5 µg 纯化的 anti-CD16/32 单克隆抗体 (最终 10 µg/ml) 在 4 °C 下阻断 Ig-fc 受体 (fcr) 15 分钟;
- 将 Un-stain 管细胞重新悬浮在 50 µl/孔 FACS 缓冲液中; 其余单染管和样品管分别加入 50 µl 预先配制好已加入抗体的单染管和样品管溶液, 4 °C 避光染色 30 分钟;
- 在每个孔中加入 200 µl 的 FACS 缓冲液, 以清洗细胞;
- 离心 96 孔板 (863 x g, 1 分钟, 4 °C), 除去上清液, 轻轻拍打板两侧使细胞颗粒松动;
- 再次重复清洗步骤;

7. 向细胞中加入 200 μ l 的 FACS 缓冲液,并将所有细胞转移到冰上的流式上机管中;
8. 需胞内染色的样品,在表面染色完成后,加入 100 μ l BD Cytofix/Cytoperm 缓冲液 (100 μ l/ 10^6 个细胞), 4 $^{\circ}$ C 避光, 孵育 20 分钟, 对细胞进行固定破膜;
9. 4 $^{\circ}$ C, 863 $\times$ g, 离心 1 分钟, 弃去固定液;
10. 加入 200 μ l BD 1x Cytoperm/Wash 缓冲液, 4 $^{\circ}$ C, 863 $\times$ g, 离心 1 分钟, 弃去固定液, 重复洗 2 遍;
11. 配制染胞内的抗体混合液 (1:200 于 BD 1x Cytoperm/Wash 缓冲液), 50 μ l 每个样品, 充分混匀后, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 分钟;
12. 用 200 μ l BD 1x Cytoperm/Wash 缓冲液重复清洗 2 遍;
13. 200 μ l FACS 缓冲液重悬细胞, 转移至流式管, 即可用于流式细胞仪检测。

五、上机检测流程

1. 依次创建 New Folder > Experiment > Specimen > Tube。
2. 在 Parameters 窗口中保留: Alexa Fluor 647、PE-CF594、PE-Cy7、BV711、AF700、APC-Cy7、PE、PerCP-Cy5.5、EF450。
3. 在菜单栏中选择 Experiment > Compensation Setup > Create Compensation Controls, 点击 OK。自动生成名称为 Compensation Control 的 Specimen, 包含阴性对照管及各单染补偿管。
4. 上阴性对照管, 调节 FSC/SSC 电压, 使 P1 门圈中样本群, 单击右键, 将 P1 门应用到所有补偿对照管。
5. 将各单染管依次上样, 调整电压, 确认阳性群低于各荧光通道的最高检测范围。
6. 依次记录各单染管, 重新命名补偿名称, 并链接应用补偿, 记录样本管。

结果与分析

实验结果见图 1。

图 1. Qb 免疫野生型小鼠 1 个月流式检测结果. 其中 A 为 Qb+ B 细胞中 IRF4+ 表达情况; B 为 Qb+ 记忆 B 细胞中 T-bet 表达情况 (Liao 等, 2017)。

失败经验

1. 使细胞和所用到的缓冲液和试剂尽可能地保持在冰上。
2. 细胞离心后, 请用力拍打 96 孔板以致细胞颗粒松散。
3. 96 孔 U 型板需要移液时尽量用排枪, 以免加错孔。
4. 操作过程动作轻柔, 尽量避光, 于冰上操作; 排枪加样、混匀时应小心细致, 防止样品污染。

溶液配方

1. 消化液

RPMI-1640

25 mM HEPES pH7.4 (来自 1 M 原液)

胶原酶 II 200 μ g/ml (来自 4,000 μ g/ml 原液)

DNase I 100 μ g/ml (来自 10 mg/ml 原液)

新鲜制备, 每个样品 5 ml, 准备收集细胞时预热至 37 $^{\circ}$ C

2. FACS 缓冲液

2% FCS

2 mM EDTA

0.1% NaN₃

溶于 PBS (预冷)

3. FC block

100 µg/ml 的 anti-CD16/32 抗体

2%大鼠血清

溶于 FACS 缓冲液 (制备 200 µl/样品)

4. 0.5 M EDTA

将 18.6 g EDTA·2H₂O 溶于 80 ml 超纯水中

用 NaOH 调 PH 值至 8.0, 并高温高压灭菌

最终调整至 10 mM

致谢

侯百东实验室的工作得到中国科学院, 国家自然科学基金和国家科技重大专项的支持。
本文实验方案改编自本实验室的发表文章 Liao 等 (2017) 以及 Hua 和 Hou (2013)。

参考文献

1. Hua, Z. and Hou, B. (2013). [TLR signaling in B-cell development and activation.](#) *Cell Mol Immunol* 10(2): 103-106.
2. Liao, W., Hua, Z., Liu, C., Lin, L., Chen, R. and Hou, B. (2017). [Characterization of T-dependent and T-independent B cell responses to a virus-like particle.](#) *J Immunol* 198(10): 3846-3856.