抗体滴定的流式检测

Antibody Titration 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: zlhua@ibp.ac.cn; baidong_hou@ibp.ac.cn

引用格式: 刘懿蕃，华兆琳，侯百东. (2019). 抗体滴定的流式检测. *Bio-101* e1010343. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010343.

How to cite: Liu, Y. F., Hua, Z. L. and Hou, B. D. (2019). Antibody Titration by Flow Cytometry. *Bio-101* e1010343. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010343. (in Chinese)

摘要: 抗体滴定就是做流式细胞检测之前对所用流式抗体进行最佳的抗体用量和抗体浓度测定的实验，其目的是实现最优的信噪比值，并且在多指标流式检测实验之前对于抗体配色发挥重要作用。一般抗体的生产厂商都会提供流式抗体的推荐使用量，但为了达到最好的实验效果及节省抗体的目的，我们则需要自己做抗体滴定实验，尤其在多色流式检测实验中，抗体滴定尤为重要。

关键词: 抗体滴定，流式细胞仪

材料与试剂

1. 5 ml 流式管
2. 可放置 5 ml 流式管的试管架 2~3 个
3. 解剖工具和烧杯
4. 六孔板
5. 枪尖若干: 2 μ l、20 μ l、100 μ l、200 μ l 和 1 ml
6. 40 μ m 过滤筛
7. 15 ml 离心管
8. 1 ml 带针注射器
9. 96 孔 U 型底板
10. 小鼠 (C57BL/6 小鼠，雌雄不限，8 周以上，1 只)

11. 待滴定的流式抗体 (本文以 Anti-Human/Mouse CD45R (B220) Alexa Fluor 700 为例, eBioscience, catalog number: 56-0452-82)
12. 2% 新生牛血清
13. DNase I (Worthington, catalog number: LS002140)
14. FCS
15. PBS 溶液和蒸馏水 (0.22 μ m 滤膜过滤)
16. RPMI-1640 (HyClone, catalog number: SH30809.01)
17. HEPES (25 mM pH 7.4) (Sigma-Aldrich, catalog number: H3375)
18. EDTA
19. NaN_3
20. R2 培养基 (见溶液配方)
21. 组织分离培养基 (见溶液配方)
22. FACS 缓冲液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 10 μ l、200 μ l、1,000 μ l 移液枪
2. 台式冷冻离心机 (Thermo, model: LEGEND RT+)
3. 细胞颗粒计数器 (Beckman, model: Coulter Z2)
4. BD FACS 流式细胞仪 (BD, model: BD LSRFortessa), 配置 3B-6V-4YG-3R-2UV (表 1)

表 1. 流式细胞仪激光器配置信息

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

实验步骤

一、细胞分离

1. 用二氧化碳对小鼠实施安乐死，随后颈部脱位处死。
2. 解剖脾脏 (具体操作步骤详见视频 1)，将脾脏放入一个位于 6 孔板中的 40 μm 细胞筛中，每个孔内已加入 5 ml 组织分离液。

视频 1. 解剖脾脏步骤

3. 用 1 ml 注射器从孔中吸取 1 ml 组织分离液，注入脾脏，冲洗脾细胞，然后用干净的注射器柱塞将脾细胞挤压至粉碎，使细胞通过 40 μm 细胞筛。尽量只施加推力，不要研磨组织。
4. 用 1 ml 移液枪将脾细胞吹打至无可见团块。
5. 将细胞转移到 15 ml 离心管中，并在 4 °C 下 311 $\times g$ 离心细胞 5 分钟。
6. 倒出上清液，将细胞轻轻地重新悬浮在 5 ml FACS 缓冲液中。
7. 计数细胞。

注：请根据实验室具体设备情况，选择相应计数方法。

8. 根据细胞计数结果，取 1×10^6 细胞在 96 孔 U 型板中。

二、细胞染色 (表 2)

表 2. 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 (3 管)	分别加入不同稀释度的 B220-AF700 抗体,稀释比例分别为 1:200; 1:400 和 1:800 (根据实验需要可以稀释不同比例)

1. 按照以上染色方案预先配制好不同稀释比例抗体单染管溶液 50 μ l, 每孔加入 50 μ l 单染管溶液, 离心 96 孔板 (311 $\times$ g, 1 分钟, 4 $^{\circ}$ C), 除去上清液, 轻轻拍打板两侧使细胞颗粒松动。
2. 将 Un-stain 管细胞重新悬浮在 50 μ l/孔 FACS 缓冲液中; 其余单染管加入预先稀释好的抗体的单染管, 4 $^{\circ}$ C 避光染色 30 分钟。
3. 在每个孔中加入 200 μ l 的 FACS 缓冲液, 以清洗细胞。
4. 离心 96 孔板 (311 $\times$ g, 1 分钟, 4 $^{\circ}$ C), 除去上清液, 轻轻拍打板两侧使细胞颗粒松动。
5. 再次重复清洗步骤。
6. 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。

三、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 700。
3. 上阴性对照管, 调节 FSC/SSC 电压, 使 P1 门圈中样本群。
4. 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。
5. 依次记录各单染管。

结果与分析

实验结果见图 1。

图 1. 不同稀释比例的 B220-AF700 对野生型小鼠脾脏细胞的染色情况

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. R2 培养基

RPMI-1640

2%新生牛血清

25 mM HEPES, pH 7.4

2. 组织分离培养基

在 R2 培养基 (100 µg/ml 最终) 中添加 DNase I

100 µg/ml (来自 10 mg/ml 原液)

3. FACS 缓冲液

2% FCS

2 mM EDTA

0.1% NaN₃

溶于 PBS (预冷)

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。