特异性 B 细胞免疫反应的流式检测

The Detection of Specific B Cell Immune Response 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). 特异性 B 细胞免疫反应的流式检测. *Bio-101* e1010344. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010344.

How to cite: Liu, Y. F., Hua, Z. L. and Hou, B. D. (2019). The Detection of Specific B Cell Immune Response by Flow Cytometry. *Bio-101* e1010344. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010344. (in Chinese)

摘要: B 细胞主要通过呈递抗原和产生抗体在自身免疫病的发生、发展中发挥重要作用，研究抗原特异性的 B 细胞免疫反应非常重要，但是对于特异性 B 细胞免疫反应的检测非常困难，于是我们根据 B 细胞上的 BCR 可以识别 Qb 抗原的特性，利用 Qb-AF647 富集到抗原特异性 B 细胞。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. 可放置 5 ml 流式管的试管架 2~3 个
9. 解剖工具和烧杯

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. DNase I 10 mg/ml (Worthington, catalog number: LS002140, 溶剂为 20 mM Tris, 1 mM MgCl₂, pH 7.5)
14. Collagenase 4,000 U/mg (Worthington, catalog number: LS004177, 溶剂为 PBS)
15. 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]
16. Anti-CD16/32 抗体 (Bioxcell, catalog number: BE0307)
17. 大鼠血清
18. FCS
19. 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

20. PBS 溶液和蒸馏水 (0.22 μm 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. EDTA
24. NaN₃
25. Tris

26. $MgCl_2$
27. NaOH
28. 消化液 (见溶液配方)
29. FC block (见溶液配方)
30. FACS 缓冲液 (见溶液配方)
31. 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. 台式冷冻离心机 (Thermo, model: LEGEND RT+)
5. 恒温培养箱
6. 旋转仪
7. 细胞颗粒计数器 (Beckman, model: Coulter Z2)
8. 旋涡混匀器 (配抗体 mix)
9. 水浴锅
10. 高压蒸汽灭菌锅
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	355 nm
	405 nm
	488 nm
	561 nm
	633 nm

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 $\times$ 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-Alexa 647 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 1×10^6 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 (7 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 抗体做单染对照调节补偿
样本管 (n 管)	同时加入 B220-PE-CF594、IgM-PE-Cy7、IgD-BV711、CD38-AF700、CD19-APC-Cy7、GL-7-PE、CD8-PerCP-Cy5.5 抗体

1. 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 ($863 \times g$, 1 分钟, 4°C)，除去上清液，轻轻拍打板两侧使细胞颗粒松动。

2. (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 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下阻断 Ig-fc 受体 (fcr) 15 分钟。
3. 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 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 30 分钟。
4. 在每个孔中加入 200 μl 的 FACS 缓冲液，以清洗细胞。
5. 离心 96 孔板 (863 $\times g$, 1 分钟, 4 $^{\circ}\text{C}$)，除去上清液，轻轻拍打板两侧使细胞颗粒松动。
6. 再次重复清洗步骤。
7. 向细胞中加入 200 μl 的 FACS 缓冲液，并将所有细胞转移到冰上的流式上机管中。

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。
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. 小鼠和 Qb-VLP 免疫的脾脏细胞富集及检测结果. A. 用 Qb-AF647 分别标记来自 naïve 小鼠和 Qb-VLP 免疫 12 天的脾脏细胞，并用磁珠富集. B. 从 Qb-VLP 免疫 14 天小鼠的脾脏细胞富集 Qb-AF647+ 细胞，进一步将其分为 GC B 细胞和 PCs (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 pH 7.4 (来自 1 M 原液)

胶原酶 II 200 U/ml (来自 4,000 U/ml 原液)

DNase I 100 µg/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 °C

2. 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)

3. FACS 缓冲液

2% FCS

2 mM EDTA

0.1% NaN₃

溶于 PBS (预冷)

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)、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.