

在流式细胞仪中使用 PE 和 APC 的实用指南

流式细胞术和荧光激活细胞分选 (FACS) 使细胞生物学中的分析达到了前所未有的水平。利用这些工具, 可以针对特定的, 具有生物学意义的特征, 逐个细胞地筛选和表征整个细胞群。确定给定群体中活细胞的百分比, 或量化特定蛋白质或标记物的存在已变得微不足道。实际上, 流式细胞术提供了传统酶标仪平台无法实现的一定程度的特异性, 并且具有显微镜无法提供的实用性。但也许流式细胞仪的最大优点是可以轻松实现多因素分析。

自成立以来, 研究人员一直对流式细胞仪的多因素分析能力感兴趣。由于流式细胞术 (即单细胞分析) 的性质, 可以在任何给定细胞内同时共同监测几个细胞事件。例如, 可以筛选细胞的凋亡和表面标志物表达。因为许多生物过程是共同依赖的并且串联发生, 所以并行研究多个变量的能力显然是有利的。

在流式细胞术中, 通过同时使用几种荧光探针完成多因素分析或多重分析。这些荧光探针的“颜色”不同, 即它们发射荧光的波长。通常选择荧光探针的亮度, 表示为染色指数, 以及它们与多重面板中其他探针的光谱分离。在潜在的荧光团中, PE 和 APC 已经在流式细胞术中取得了巨大的成功, 这是由于它们各自的亮度以及它们在作为串联染料实现时产生光谱分离的能力。

PE&APC

藻红蛋白 (PE) 和别藻蓝蛋白 (APC) 是称为藻胆蛋白的蛋白质家族的成员。该蛋白质家族存在于光合生物中, 例如藻类和蓝细菌。在自然界中, 它们通常作为光合作用中叶绿素素的辅助蛋白质。在结构上, 藻胆蛋白由与藻胆素共价结合的蛋白质复合物组成, 藻胆素是捕获光能的部分。为了用于流式细胞术, 从红藻中提取 PE 和 APC 并纯化。

藻红蛋白 (PE) 有两种形式: R-PE 和 B-PE, 尽管 R-PE 在流式细胞仪中有更多用途 (因此, 速记 PE 通常可与 R-PE 互换使用)。PE 的分子量为 240,000 道尔顿, 消光系数为 $1,500,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$, 量子产率 (Φ) 为 0.84。PE 在 565nm 处被最大激发 (次要最大值在 495nm 处) 并且在 573nm 处发射, 其在可见光谱的黄橙色区域中。为了比较, 在黄橙色光谱区发荧光的游离 Cy3 的消光系数为 $150,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 量子产率为 0.20 (当与 DNA 结合时, $\Phi \approx 0.40$)。因此, 与 Cy3 相比, PE 更“明亮”。实际上, 在大多数实验条件下, PE 是可用于流式细胞术的最亮荧光团。

别藻蓝蛋白 (APC) 是一种 105 kDa 的蛋白质, 消光系数为 $700,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$, 量子产率 (Φ) 为 0.68。APC 在 652nm 处最大激发 (在 625nm 处具有次级最大值) 并且在 658nm 处发射。其荧光落在可见光谱的红色区域。与 PE 相比, APC 并不像“亮”。这部分是由于其消光系数和量子产率较低。这也是因为 APC 与 PE 相比发生了红移。因此, 用于最大程度地激发 APC 的光源将包含比用于最大程度地激发 PE 的能量更少的能量。然而, 与其他红色荧光团如 Cy5 相比, APC 仍然明显更亮, 是流式细胞仪的最佳选择。

表 1. PE 和 APC 属性

| CAT # | 产品名称 | 规格 | Ex (nm) | Em (nm) |
|-------|-------------|-------|---------|---------|
| 2556 | PE [R-藻红蛋白] | 10 毫克 | 565 | 575 |
| 2554 | APC [别藻蓝蛋白] | 1 毫克 | 651 | 662 |

用于流式细胞术的 PE 和 APC 的制备

为了用于流式细胞术, 必须首先将 PE 或 APC 与抗体缀合。抗体用作感兴趣靶标的检测器, 而 PE 或 APC 充当报告物, 其将检测到的事件转化为可量化的信号。PE 或 APC 与抗体缀合的传统方法涉及用 SMCC 活化 PE 或 APC。虽然这里没有详细说明, 但一般过程如下:

1. 用 SMCC 激活报告者 (PE 或 APC)
2. 用 DTT 减少检测器 (抗体或蛋白质)
3. 混合活化的报告物与减少的检测
4. 使用透析纯化生物共轭物

尽管已建立的方法, 基于 SMCC 的缀合确实存在若干缺点。首先, 结合效率通常较低, 良好的产率保持在约 30% 的回收率。第二个缺点是需要用 DTT 减少抗体, 这可能显著影响它们的功能。最后, 因为基于 SMCC 的反应的效率通常较低, 所以需要非常高浓度的反应物 (即 PE 和抗体) 以获得足够的反应性。

SMCC 化学有几种替代方案。这些替代方案通常依赖于首先独立地缀合报道分子和检测器, 每个分子具有不同的标签。通常选择这些标签是因为它们彼此之间的高亲和力和特异性, 并且仅相互之间, 因此当标记的报道分子和检测器混合时, 标签结合, 在报道分子和检测器之间形成生物缀合物。

这种类型标记的一个相当确定的用途是生物素 - 链霉抗生物素蛋白缀合系统。在该系统中，用生物素标记或标记抗体。然后用链霉抗生物素蛋白标记检测器，例如 PE。由于生物素和链霉抗生物素蛋白彼此之间具有高亲和力，它们形成强共价键，在这种情况下最终导致抗体-PE 生物共轭物。

SMCC 化学的第二种替代方案是 AAT Bioquest 的 Buccutite™ 技术。与生物素 - 链霉抗生物素蛋白缀合系统类似，Buccutite™ 技术依赖于两个独立的标签：MTA 和 FOL。这两个标签分别独立地标记在报道分子和检测器上，并且当混合时将彼此强烈结合，产生报告子 - 检测器生物缀合物。与其他共轭化学相比，Buccutite™ 具有多项独特优势。首先，Buccutite™ 反应通常具有高得多的产率，最终回收率超过 SMCC 方法的两倍 (> 60%)。此外，因为 MTA 和 FOL 之间的反应非常有效，所以反应可以在非常低的反应物浓度下发生（即 < 1mg / mL 的抗体）。

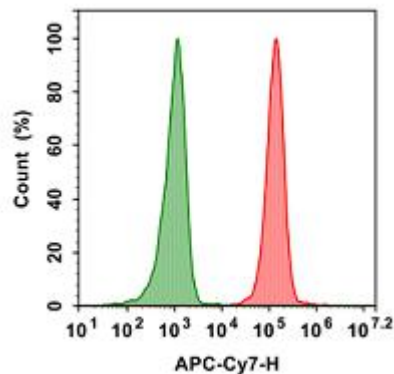


图 1. 用 1ug / ml 小鼠 IgG2a 对照 (绿色) 或 1ug / ml 抗人 HLA-ABC (红色) 染色的 HL-60 细胞的流式细胞术分析，然后是山羊抗小鼠 IgG-APC-Cy7 缀合物使用 ReadLink™ 快速 APC-Cy7 串联抗体标记试剂盒 (Cat # 1321) 制备。

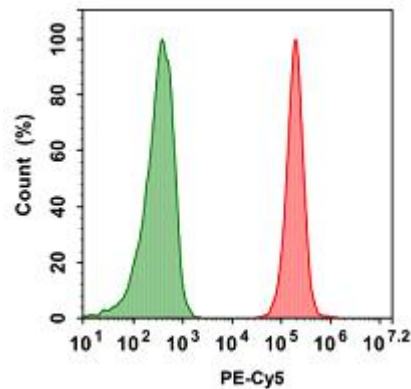


图 2. 用小鼠 IgG2a 对照或 1ug / ml 抗人 HLA-ABC 染色的 1ug / ml HL-60 细胞的流式细胞术分析，然后用 ReadLink™ Rapid PE 制备的山羊抗小鼠 IgG-PE-Cy5 缀合物-Cy5 Tandem 抗体标记试剂盒 (Cat # 1315)。

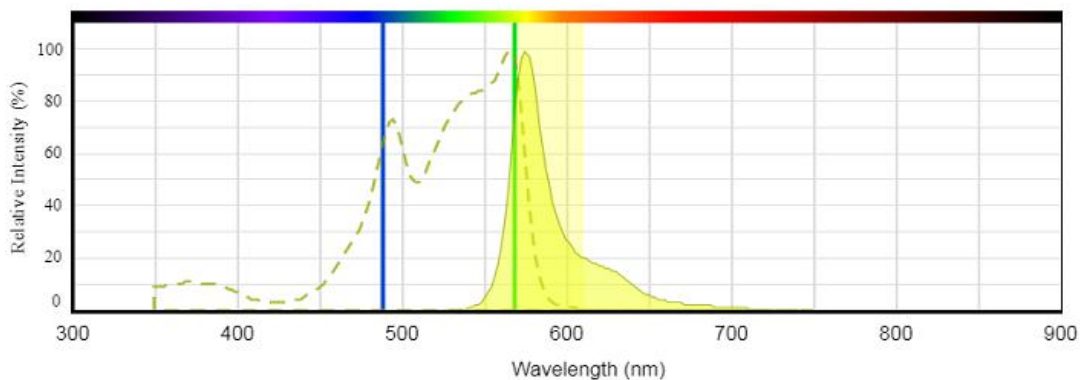


图 3. PE 的吸收和发射光谱 (Cat # 2556) 在 488nm (蓝色激光线) 和 568nm (绿色激光线) 处的激发。PE 读取发射滤光片 Cy3 / TRITC (黄色波段)。

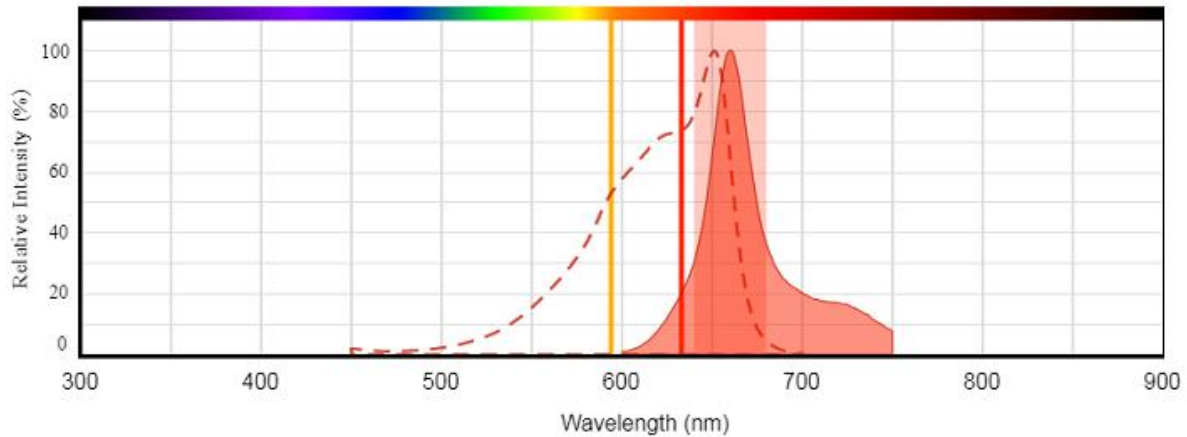


图 4. APC 的吸收和发射光谱 (Cat # 2554) 在 594nm (橙色激光线) 和 633nm (红色激光线) 的激发。PE 读取发射滤光片 Cy5 (红色波段)。

PE 和 APC 在流式细胞术中的应用

虽然实际的实验程序将根据实验而有所不同, 但在使用 PE 和 APC 进行流式细胞术时, 仍有一些通用的指导原则。

1. 确定设备规格

PE 和 APC 的成功使用取决于流式细胞仪的可用激光和滤光片组。对于 PE, 这通常不是问题。这是因为, 虽然 PE 在 565nm 处具有最大激发, 但它在 495nm 处也具有次级最大值。因此, 如果没有 568 nm 氦激光器, 极其常见的 488 氩激光器就足够了。对于发射滤光器选择, 可以使用 Cy3 / TRITC 滤光器 (590/40) 读取 PE。

对于 APC, 激发源可以根据可用的激光而变化。594nm 或 633nm 激光线是合适的。对于发射滤光片, 建议使用 Cy5 滤光片 (660/40)。

1. 确定是否需要补偿

对于多色分析，在分析数据之前可能需要进行补偿。这是因为两个或更多个荧光团可具有重叠的发射光谱。在这种情况下，任何信号读取实际上可能是由于多个单独信号的组合。补偿通过数学上去除“溢出”到感兴趣的主信号中的信号来解释这种重叠。考虑以下流式细胞仪面板：

这里，PE 发射和碘化丙锭（PI）发射之间存在光谱重叠的一部分。考虑和消除信号重叠是补偿的基础。如果给出控制参数，大多数现代仪器和软件都可以自动执行补偿。在上述实施例的情况下，这将需要首先用 PE 染色的细胞进行运行，然后在最终进行双色分析之前用仅 PI 染色的细胞进行运行。

虽然现代技术使补偿过程变得更加容易，但选择合适的荧光团也可以最大限度地减少开始补偿的需要。在这里，串联染料的进步发挥了重要作用。

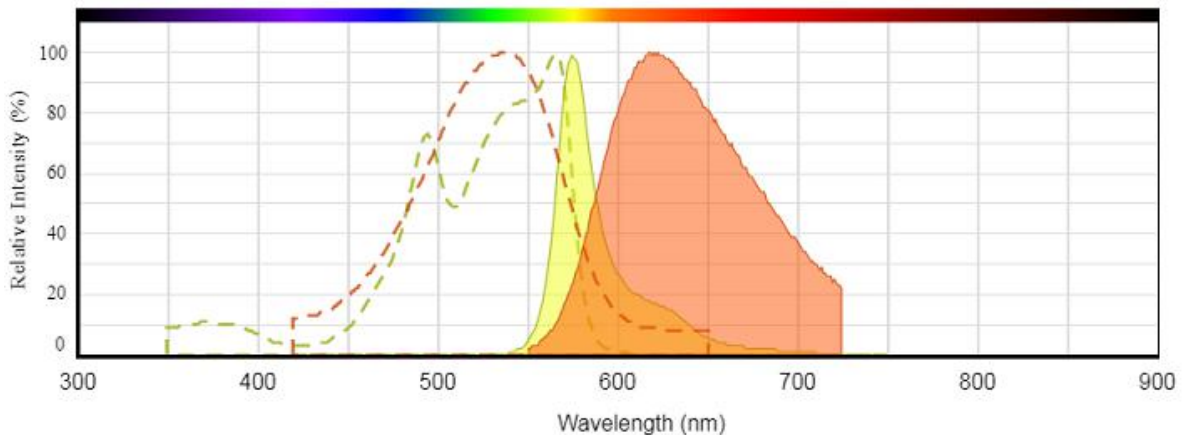


图 5. PE (黄色, Cat # 2556) 和 PI (Cat # 17516) 的重叠发射光谱的表示。多色分析可能需要在数据分析之前进行补偿。补偿通过消除“溢出”到感兴趣的主信号中的信号来解释这种重叠。

用作串联染料

串联染料是指其中两种不同的荧光团共价连接的化合物。在这种构象中，一个荧光团（称为“供体”）的激发导致能量转移到另一个荧光团并且发荧光（称为“受体”）。这种从供体到受体的能量转移通过 Förster 共振能量转移或 FRET 发生。虽然这里没有详细说明，但 FRET 的机理及其在生物探针中的应用已有详细记载。特别是，FRET 已经非常成功地应用于核苷酸和肽的研究中。然而，最近，对基于 FRET 的流式细胞术应用的兴趣激增，特别是基于 PE 和 APC 的串联染料。

基于 PE 和 APC 的串联染料在流式细胞仪中特别有用的原因是因为它们的斯托克变换异常大。斯托克斯的位移指的是最大激发和最大发射之间的距离。对于典型的荧光团，这种差异很小，平均在 10 到 50nm 之间。基于 PE 和 APC 的串联染料可以实现斯托克数百种的变化，这取决于所使用的荧光团对。当设计多色流式细胞仪板时，大型斯托克的串联染料的变化非常有价值。

考虑以下三个流式细胞仪面板：

小组 A.

| 荧光 | Ex (nm) | Em (nm) | 斯托克转换 (nm) |
|------|---------|---------|---------------|
| FITC | 489 | 515 | 26 |
| Cy5 | 554 | 568 | 14 |
| Cy7 | 650 | 669 | 19 |

小组 B.

| 荧光 | Ex (nm) | Em (nm) | 斯托克转换 (nm) |
|-----------------|---------|---------|---------------|
| FITC | 489 | 515 | 26 |
| GFP | 489 | 508 | 19 |
| Alexa Fluor 488 | 499 | 520 | 21 |

小组 C.

| 荧光 | Ex (nm) | Em (nm) | 斯托克转换 (nm) |
|--------|---------|---------|------------|
| FITC | 489 | 515 | 26 |
| PE-Cy5 | 495 | 666 | 171 |
| PE-Cy7 | 495 | 778 | 283 |

A 组在三个荧光团中具有良好的光谱分离; 三个发射峰相距很远。这意味着需要最低限度的补偿。然而, 因为三个荧光团具有不同的激发最大值, 所以最佳实验设置将需要三个不同的激光源。这在实践中既昂贵又不便于设置。

B 组有三个荧光团, 它们都能被奇异的激光源很好地激发。在这种情况下, 三种荧光团都可以被极其常见的 488nm 氩离子激光器激发。因此在实践中, 这种面板的仪器是相当简单的。然而, 面板 B 遭受广泛的光谱重叠; 发射峰太近了。如果可以完成这样的计算, 这样的面板将需要非常复杂的补偿计算。

C 组显示了串联染料 (PE-Cy5 和 PE-Cy7) 的功效。在该图中, 所有三个荧光团都可以被相同的激光线很好地激发, 如在 B 组中那样。然而, 与 B 组不同, 三个荧光团表现出优异的光谱分离。如前所述, 这是由于串联染料的大斯托克斯移位 (171nm 和 283nm)。在 C 组中, 串联染料的优点变得明显, 即串联染料允许使用共享激发最大值但不需要大量补偿的多个荧光团。

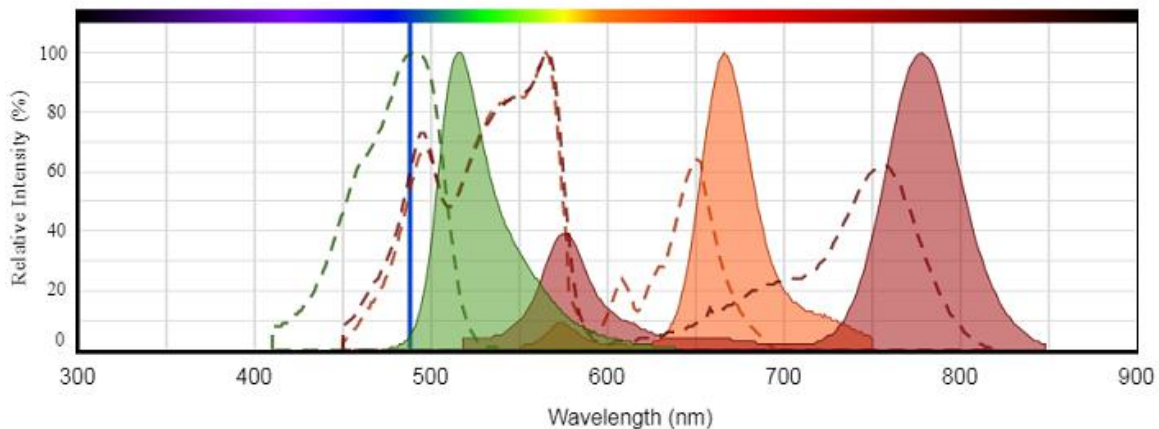


图 6. FITC (绿色), PE-Cy5 (橙色) 和 PE-Cy7 (红色) 的吸收和发射光谱。所有三种荧光团都可以被 488nm 激光线 (蓝色) 很好地激发, 具有出色的光谱分离。

PE 和 APC 串联染料的制备

合成串联染料的常用方法是使用琥珀酰亚胺酯 (也称为 NHS 酯)。这是将小分子荧光团标记到蛋白质和抗体上的常用方法。在该方法中, 由于添加了琥珀酰亚胺酯 (SE) 官能团, 小分子荧光团变得具有反应性。然后荧光团-SE 与 PE 或 APC 上的游离胺基反应, 形成共价键。一旦合成 PE 或 APC 串联染料, 就可以使用如前所述的 SMCC 或相关化学物质将其缀合至抗体。

可直接购买常见小分子荧光团的反应性琥珀酰亚胺酯, 如 FITC, Cy 染料, Alexa Fluors 和 iFluors。为方便起见, 也可购买共轭串联染料 (如 PE-Cy5) 和活化的共轭串联染料 (如 Buccutite™PE-Cy5)。

表 2. 一些常见的 PE 和 APC 串联染料。

| 串联染料 | Ex (nm) | Em (nm) | 斯托克转换 (nm) |
|--------------------|---------|---------|------------|
| PE-Cy5 | 495 | 666 | 171 |
| PE-Cy5.5 | 495 | 672 | 177 |
| PE-Cy7 | 495 | 778 | 283 |
| PE-Alexa Fluor 647 | 495 | 666 | 171 |
| PE-iFluor 700 | 495 | 722 | 227 |
| PE-德克萨斯红 | 495 | 613 | 118 |
| PE-Alexa Fluor 750 | 495 | 779 | 284 |
| APC-Cy5.5 | 625 | 700 | 75 |
| APC-Cy7 | 625 | 779 | 154 |

| | | | |
|---------------------|-----|-----|-----|
| APC-Alexa Fluor 750 | 625 | 785 | 160 |
| APC-iFluor 700 | 625 | 710 | 85 |
| APC-iFluor 750 | 625 | 791 | 166 |

参考

1. Schmid, Ingrid, et al. "Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry." *Cytometry* 13.2 (1992): 204-208.
2. Strickler, S. J., and Robert A. Berg. "Relationship between absorption intensity and fluorescence lifetime of molecules." *The Journal of chemical physics* 37.4 (1962): 814-822.
3. Autissier, Patrick, et al. "Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans." *Cytometry part A* 77.5 (2010): 410-419.
4. Baumgarth, Nicole, and Mario Roederer. "A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping." *Journal of immunological methods* 243.1 (2000): 77-97.
5. Sanborn, Matthew E., et al. "Fluorescence properties and photophysics of the sulfoindocyanine Cy3 linked covalently to DNA." *The Journal of Physical Chemistry B* 111.37 (2007): 11064-11074.
6. Roederer, Mario, et al. "Cy7PE and Cy7APC: bright new probes for immunofluorescence." *Cytometry Part A* 24.3 (1996): 191-197.