



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112946293 A

(43)申请公布日 2021.06.11

(21)申请号 201911259341.X

(22)申请日 2019.12.10

(71)申请人 中国科学院大连化学物理研究所
地址 116023 辽宁省大连市沙河口区中山
路457-41号

(72)发明人 石蒙 关亚凤 耿旭辉 李佳敏

(74)专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限
公司 21002

代理人 郑伟健

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

G01N 27/447(2006.01)

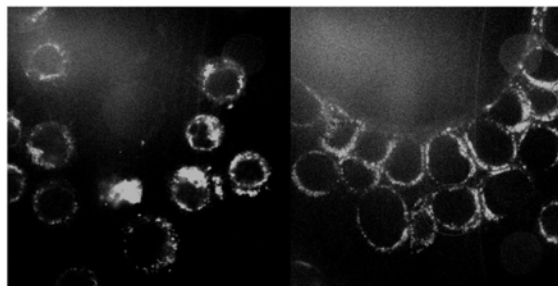
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种单细胞中目标膜蛋白的定量检测方法

(57)摘要

本发明提供了一种采用毛细管电泳-共聚焦激光诱导荧光法定量检测单细胞中目标膜蛋白的方法。首先,通过毛细管电泳-共聚焦激光诱导荧光法测定表面键合已知荧光分子数目的众多单个荧光微球的荧光信号,取中位数,然后建立荧光强度-荧光分子数目的标准曲线;第二步,对细胞的膜蛋白进行免疫荧光标记,测定单细胞膜蛋白的荧光信号;最后,通过标准曲线计算单细胞中目标膜蛋白的浓度。本方法利用电泳和电渗流共同作用将细胞和微球驱动至检测光窗,用共聚焦激光诱导荧光检测单颗粒荧光信号。该方法可通过多通道检测器实现多种目标膜蛋白同时检测,具有灵敏度高、定量准确、成本低的特点。



1. 一种单细胞中目标膜蛋白的定量检测方法,其特征在于:

(1) 建立荧光强度-荧光分子数目的标准曲线,具体包括以下步骤:

a、配制标准溶液:标准溶液由表面键合已知荧光分子数目的荧光微球配制在一定体积的电泳缓冲溶液中而成,其中,配制3个以上不同标准溶液,不同标准溶液所用微球的荧光分子相同,仅键合的荧光分子数目不同;超声混匀,荧光分子和微球表面均带有电荷,所配制标准溶液中微球的浓度为 $10^3 \sim 10^6$ 个/mL;所用微球的直径与所测定细胞的直径相差 $1 \sim 2 \mu\text{m}$;荧光微球上键合荧光分子的数目为 $10^2 \sim 10^6$ 个;

b、采用电泳缓冲溶液冲洗毛细管,然后使电泳缓冲溶液充满毛细管,将由步骤a)配制的标准溶液放入样品瓶中,样品瓶置于毛细管电泳的进样端,将毛细管一端插入样品瓶中,另一端插入电泳缓冲溶液中;

c、开启高压电源,对毛细管两端加电压,微球在电场作用下依次进入带检测光窗的毛细管,由于微球表面带有电荷,在电泳和电渗流共同作用下,电泳会将微球分离,使微球之间无粘连,毛细管的有效长度大于30cm;所述毛细管所用直径 d_L 与微球直径 d_b 的关系为 $d_b < d_L < 2d_b$,微球单独且连续地从进样端驱动至检测光窗;光学检测焦斑的 d_w 与微球直径的关系为 $d_b < d_w < 2d_b$,所用荧光检测器的波长参数与步骤a中所述荧光分子的激发和发射波长相匹配;通过电泳分离条件确保每次通过光窗检测到的荧光信号为单个微球产生的荧光,记录至少1000个微球产生的荧光信号;

d、依次重复步骤b、c,获得其它不同标准溶液的荧光信号强度;

e、将所测得的微球荧光强度的中位数作为该标准溶液的荧光强度,依据标准溶液中微球的荧光分子数目和标准溶液的荧光强度建立标准曲线;

(2) 单细胞膜蛋白定量检测,具体包括以下步骤:

a、洗涤培养的细胞,通过离心除去细胞培养液,洗涤完成后,采用细胞稀释液重悬细胞;

b、采用细胞固定液固定细胞,然后洗涤细胞,并用细胞稀释液重悬细胞;

c、采用封闭试剂对细胞膜上的蛋白进行封闭,封闭完成后,离心除去封闭试剂,采用细胞稀释液重悬细胞;

d、采用带有与荧光微球相同荧光基团的抗体对细胞膜表面的目标蛋白进行免疫标记,标记完成后洗涤细胞,然后采用电泳缓冲溶液重悬细胞,形成细胞悬浮液;

e、采用电泳缓冲溶液冲洗毛细管,并使电泳缓冲溶液充满毛细管,然后将细胞悬浮液放入样品瓶中,样品瓶置于毛细管电泳的进样端,将毛细管一端插入样品瓶中,另一端插入电泳缓冲溶液中;

f、开启高压电源,对毛细管两端加电压,电场强度范围是300-500V/cm;细胞在电场作用下依次进入毛细管,由于细胞表面带有电荷,在电泳和电渗流共同作用下,毛细管电泳会将细胞分离,使细胞单独且连续地从进样端驱动至检测光窗;记录检测到的荧光信号;

g、依据(1)中所建标准曲线和步骤f中检测的荧光强度计算单个细胞中目标膜蛋白的分子数目;

所述步骤(1)和步骤(2)中的电泳缓冲溶液相同,其中不含有离子表面活性剂或细胞破膜试剂,缓冲溶液为20-50mM的硼酸钠-硼酸或20-50mM的Tris-HCl缓冲溶液,电泳缓冲溶液的pH值范围是6~8;所用荧光检测器为共聚焦式激光诱导荧光检测器。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于: 所述步骤(1)中荧光微球的直径为5~30 μ m, 微球的材质为苯乙烯-二乙烯基苯、聚苯乙烯或二氧化硅, 微球粒径的RSD小于5%。

3. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于: 所述细胞稀释液是磷酸盐缓冲溶液。

4. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于: 所述细胞固定液是甲醛溶液, 体积分数为4%~6%, 固定时间为10~20min; 封闭试剂是体积分数为5%~10%的BSA溶液或山羊血清, 封闭时间为10~60min。

5. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于: 所述单细胞膜蛋白定量检测步骤f中, 电场强度优选200~400V/cm。

6. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于: 采用两种及两种以上的荧光标记抗体对细胞膜表面的多种目标膜蛋白进行免疫标记, 采用相应的表面键合已知荧光分子数目的两种及两种以上微球建立对应的标准曲线, 采用多通道激光诱导荧光检测器, 对单细胞上的两种及两种膜蛋白同时检测。

7. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于:

荧光基团为FITC、dylight488、BV605和BV650;

抗体为带有荧光基团的兔抗人抗CD3、CD63、CD206和Her 2的IgG抗体中的一种或二种以上, 对应的细胞内目标蛋白质CD3、CD63、CD206和Her 2中的一种或二种以上。

一种单细胞中目标膜蛋白的定量检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种单细胞目标膜蛋白的定量检测方法,更具体地说,涉及一种毛细管电泳-共聚焦激光诱导荧光技术检测单细胞中目标膜蛋白的定量检测方法。

背景技术

[0002] 各种生命活动的正常进行都离不开蛋白质,其在信息传导、生理调控、物质运输、机体防御等各项生理过程中发挥着至关重要的作用。细胞当中含有上万种蛋白质,每种蛋白质都有其特定的结构和功能,其中,膜蛋白参与机体的物质运输、信号传导、免疫识别等相关过程。膜蛋白的含量发生变化,可能会影响到相关的生理过程,甚至导致疾病。因此,定量的检测膜蛋白的含量十分必要。

[0003] 近年来,已经发展了一些单细胞膜蛋白检测技术,例如荧光成像技术、流式细胞技术等。荧光成像技术可实时观测细胞的膜蛋白含量,但仅可进行半定量分析;流式细胞术可对细胞进行多参数定量检测,可采用多通道实现多种膜蛋白同时分析,但是由于光谱重叠效应,一次检测过程中,最多能检测几十种膜蛋白,且由于灵敏度的限制,流式细胞仪仅适合检测表达含量较高的蛋白(表达含量需大于1000个分子),不适合检测表达含量较低的蛋白。同时,流式细胞技术中,细胞以鞘流的形式到达检测光窗,鞘流控制方式主要有两种,第一种是使用注射器推动细胞悬浮液,细胞悬浮液的四周被鞘流气包围,保证细胞在中间形成单个排列的细胞流后到达检测光窗,系统中需要安装气流稳压装置来稳定气压。第二种是鞘流液和细胞均需要独立的控制装置,需要两套电机和两台注射泵。这两种细胞的驱动方式均采用复杂的机械结构才能使细胞稳定的流经检测光窗,不易控制且成本较高。

[0004] 共聚焦式激光诱导荧光检测器(Laser Induced Fluorescence Detector)由于具有较高的灵敏度,很小的检测聚焦光斑($\sim 5\mu\text{m}$),适用于超痕量检测,尤其适用于单细胞中低表达蛋白质的检测。与流式细胞仪相比,毛细管电泳(Capillary Electrophoresis)技术发展相对成熟,仪器构造相对简单、易于操控,毛细管内存在电渗流,可以驱动细胞,使细胞快速通过检测光窗,实现高通量检测。将毛细管电泳与共聚焦激光诱导荧光检测相结合,有望实现单细胞上低表达膜蛋白的定量检测。为了提高检测通量,单细胞最好以完整个体形式(不破膜)经过检测窗口。但是,这样的检测方式无法使用传统的、采用均相标准溶液建立标准曲线来定量。同时,单细胞在毛细管内的电泳行为与传统小分子或大分子蛋白质均不同,无法采用传统的电泳方法。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种采用毛细管电泳-激光诱导荧光法定量检测单细胞目标膜蛋白的方法,首先,通过毛细管电泳-共聚焦激光诱导荧光法测定表面键合已知荧光分子数目的荧光微球的荧光信号,建立荧光强度-荧光分子数目的标准曲线;然后,对细胞的膜蛋白进行免疫荧光标记,测定单细胞膜蛋白的荧光信号;最后,通过标准曲线计算单细胞中目标膜蛋白的浓度。

[0006] 本发明的技术方案是：

[0007] 一种单细胞中目标膜蛋白的定量检测方法：

[0008] (1) 建立荧光强度-荧光分子数目的标准曲线，具体包括以下步骤：

[0009] a、配制标准溶液：标准溶液由表面键合已知荧光分子数目的荧光微球配制在一定体积的电泳缓冲溶液中而成，其中，配制3个以上不同标准溶液，不同标准溶液所用微球的荧光分子相同，仅键合的荧光分子数目不同；超声混匀，荧光分子和微球表面均带有电荷，所配制标准溶液中微球的浓度为 $10^3 \sim 10^6$ 个/mL；所用微球的直径与所测定细胞的直径相差 $1 \sim 2 \mu\text{m}$ ；荧光微球上键合荧光分子的数目为 $10^2 \sim 10^6$ 个；

[0010] b、采用电泳缓冲溶液冲洗毛细管，然后使电泳缓冲溶液充满毛细管，将由步骤a)配制的标准溶液放入样品瓶中，样品瓶置于毛细管电泳的进样端，将毛细管一端插入样品瓶中，另一端插入电泳缓冲溶液中；

[0011] c、开启高压电源，对毛细管两端加电压，微球在电场作用下依次进入带检测光窗的毛细管，由于微球表面带有电荷，在电泳和电渗流共同作用下，电泳会将微球分离，使微球之间无粘连，毛细管的有效长度大于30cm；所述毛细管所用直径 d_L 与微球直径 d_b 的关系为 $d_b < d_L < 2d_b$ ，微球单独且连续地从进样端驱动至检测光窗；光学检测焦斑的 d_w 与微球直径的关系为 $d_b < d_w < 2d_b$ ，所用荧光检测器的波长参数与步骤a中所述荧光分子的激发和发射波长相匹配；通过电泳分离条件确保每次通过光窗检测到的荧光信号为单个微球产生的荧光，记录至少1000个微球产生的荧光信号；

[0012] d、依次重复步骤b、c，获得其他不同标准溶液的荧光信号强度；

[0013] e、将所测得的微球荧光强度的中位数作为该标准溶液的荧光强度，依据标准溶液中微球的荧光分子数目和标准溶液的荧光强度建立标准曲线；

[0014] (2) 单细胞膜蛋白定量检测，具体包括以下步骤：

[0015] a、洗涤培养的细胞，通过离心除去细胞培养液，洗涤完成后，采用细胞稀释液重悬细胞；

[0016] b、采用细胞固定液固定细胞，然后洗涤细胞，并用细胞稀释液重悬细胞；

[0017] c、采用封闭试剂对细胞膜上的蛋白进行封闭，封闭完成后，离心除去封闭试剂，采用细胞稀释液重悬细胞；

[0018] d、采用带有与荧光微球相同荧光基团的抗体对细胞膜表面的目标蛋白进行免疫标记，标记完成后洗涤细胞，然后采用电泳缓冲溶液重悬细胞，形成细胞悬浮液；

[0019] e、采用电泳缓冲溶液冲洗毛细管，并使电泳缓冲溶液充满毛细管，然后将细胞悬浮液放入样品瓶中，样品瓶置于毛细管电泳的进样端，将毛细管一端插入样品瓶中，另一端插入电泳缓冲溶液中；

[0020] f、开启高压电源，对毛细管两端加电压，电场强度范围是300-500V/cm；细胞在电场作用下依次进入毛细管，由于细胞表面带有电荷，在电泳和电渗流共同作用下，毛细管电泳会将细胞分离，使细胞单独且连续地从进样端驱动至检测光窗；记录检测到的荧光信号；

[0021] g、依据(1)中所建标准曲线和步骤f中检测的荧光强度计算单个细胞中目标膜蛋白的分子数目；

[0022] 所述步骤(1)和步骤(2)中的电泳缓冲溶液相同，其中不含有离子表面活性剂或细胞破膜试剂，缓冲溶液为20-50mM的硼酸钠-硼酸或20-50mM的Tris-HCl缓冲溶液，电泳缓冲

溶液的pH值范围是6~8,所用荧光检测器为共聚焦式激光诱导荧光检测器。

[0023] 所述步骤(1)中荧光微球的直径为5~30 μm ,微球的材质为苯乙烯-二乙烯基苯、聚苯乙烯或二氧化硅,微球粒径的RSD小于5%。

[0024] 所述细胞稀释液是磷酸盐缓冲溶液。

[0025] 所述细胞固定液是甲醛溶液,体积分数为4%~6%,固定时间为10~20min;封闭试剂是体积分数为5%~10%的BSA溶液或山羊血清,封闭时间为10~60min。

[0026] 所述单细胞膜蛋白定量检测步骤f中,电场强度优选200~400V/cm。

[0027] 所述方法还可以采用两种及两种以上的荧光标记抗体对细胞膜表面的多种目标膜蛋白进行免疫标记,采用相应的表面键合已知荧光分子数目的两种及两种以上微球建立对应的标准曲线,采用多通道激光诱导荧光检测器,对单细胞上的两种及两种膜蛋白同时检测。

[0028] 所述荧光基团为FITC、dylight488、BV605和BV650;

[0029] 抗体为带有荧光基团的兔抗人抗CD3、CD63、CD206和Her 2的IgG抗体中的一种或二种以上,对应的细胞内目标蛋白质CD3、CD63、CD206和Her2中的一种或二种以上。

[0030] 与现有技术相比,本发明方法具有如下优点:

[0031] 1.本方法采用电泳和电渗流共同作用驱动细胞和荧光微球到达检测光窗,可通过控制毛细管两端的电压和毛细管内缓冲溶液的浓度对电渗流的速度进行控制,易于操控。

[0032] 2.本方法采用荧光微球建立标准曲线,使得单细胞在不破膜的情况下也能定量检测表面膜蛋白,实现了分析方法的高通量。

[0033] 3.本方法采用的毛细管电泳-共聚焦激光诱导荧光检测器系统方法简单,可靠,且易于在其他实验室使用。

[0034] 4.本发明方法可采用多通道激光诱导荧光检测器实现多种目标膜蛋白的同时检测。

[0035] 5.本发明方法采用激光诱导荧光检测器与毛细管电泳结合,灵敏度高,检测速度快,成本较低。

附图说明

[0036] 图1示意性展示了实施例1中单细胞膜蛋白标记后的显微荧光照片。

[0037] 图2示意性展示了实施例1中测定多个乳腺癌细胞膜上Her2蛋白的结果。

具体实施方式

[0038] 为了更好地理解本发明,通过实施例对本发明进行说明。本发明所列的这些具体实施例仅限于说明本发明,而非对本发明的限定。

[0039] 实施例1:

[0040] 一种定量检测单个乳腺癌细胞表面的Her 2蛋白的方法,步骤如下:

[0041] (1)建立荧光强度-荧光分子数目的标准曲线,具体包括以下步骤:

[0042] a、配制标准溶液,标准溶液由表面键合已知荧光分子数目的荧光微球配制在1mL的电泳缓冲溶液中而成,其中,不同标准溶液所用微球的荧光分子相同,均为FITC,仅键合的分子数目不同,所用微球的直径与所测定细胞的直径相当,微球直径为12 μm ,微球的材质

为苯乙烯-二乙烯基苯,微球粒径的RSD小于5%,超声10min混匀,荧光分子和微球表面均带有电荷,所配制标准溶液中微球的浓度为 10^4 个/mL;将三种表面键合不同荧光分子数目的荧光微球配制在50mM的硼酸钠-硼酸电泳缓冲溶液中,然后放入棕色样品瓶中,三种微球表面的FITC分子数目分别为350、1000和8000,分别记为1号、2号和3号标准样品;

[0043] b、采用电泳缓冲溶液冲洗毛细管,然后使电泳缓冲溶液充满毛细管,使毛细管内壁充分平衡,毛细管内径为20 μ m,外径为365 μ m,然后将1号标准样品放入棕色的样品瓶中,样品瓶置于毛细管电泳的进样端,将毛细管一端插入样品瓶中,另一端插入电泳缓冲溶液中,两个瓶中分别插入铂电极;

[0044] c、开启高压电源,对毛细管两端加电压,微球在电场作用下依次进入带检测光窗的毛细管,由于微球表面带有电荷,在电泳和电渗流共同作用下,电泳会将微球分离,毛细管的有效长度为35cm,分离过程中使微球之间无粘连;共聚焦激光诱导荧光检测器在检测光窗内的焦斑宽度为15 μ m,保证每次只能检测到一个微球的荧光信号,所用荧光检测器的波长参数与FITC荧光分子的激发和发射波长相匹配,所用荧光检测器的激发波长为488nm,检测波长为530~650nm;每种微球测定的个数约为3000个,记录检测到的荧光信号;

[0045] d、依次重复步骤b、c,获得2号和3号标准溶液的荧光信号强度;

[0046] e、将所测得的微球荧光强度的中位数作为该标准溶液的荧光强度,依据标准溶液中微球的荧光分子数目和标准溶液的荧光强度建立带有FITC荧光分子的微球的标准曲线;

[0047] (2) 单细胞膜蛋白定量检测,具体包括以下步骤:

[0048] a、收集培养的乳腺癌细胞,收集到的细胞采用显微镜进行细胞计数,细胞数目约为 1×10^6 个,采用磷酸盐缓冲溶液(PBS)对细胞进行洗涤,通过离心除去细胞培养液,离心5min(转速为800rpm/min),洗涤完成后,采用PBS对细胞进行重悬;

[0049] b、采用200 μ L体积分数为5%的甲醛溶液固定细胞,37 $^{\circ}$ C下固定20min,然后洗涤细胞,离心10min(转速为800rpm/min),离心后采用PBS重悬细胞;

[0050] c、采用体积分数为5%的BSA对乳腺癌细胞进行封闭,封闭时间为15min,离心除去BSA溶液,采用100 μ L的PBS重悬细胞;

[0051] d、在细胞悬浮液中加入5 μ L带有FITC的兔抗人抗Her2蛋白的IgG抗体对乳腺癌细胞膜表面的Her2蛋白进行免疫标记,在37 $^{\circ}$ C下孵育1hour,标记完成后洗涤细胞三次,每次离心5min(转速为1000rpm/min),然后采用1mL的50mM的硼酸钠-硼酸缓冲溶液重悬细胞,形成细胞悬浮液,取部分细胞在荧光显微镜下观察,确定是否标记成功;

[0052] e、采用50mM的硼酸钠-硼酸缓冲溶液冲洗毛细管,并使其充满毛细管,然后将1mL的细胞悬浮液加入棕色样品瓶中,细胞浓度约为 10^3 个/mL,样品瓶置于毛细管电泳的进样端,将毛细管一端插入样品瓶中,另一端插入电泳缓冲溶液中;

[0053] f、开启高压电源,对毛细管两端加电压,电场强度为350V/cm;细胞在电场作用下依次进入毛细管,由于细胞表面带有电荷,在电泳和电渗流共同作用下,毛细管电泳会将细胞分离,使细胞单独且连续地从进样端驱动至检测光窗;记录检测到的荧光信号;

[0054] g、依据(1)中所建标准曲线和步骤f中检测的荧光信号计算每个乳腺癌细胞中Her2蛋白的分子数目。实验结果表明,100个乳腺癌细胞Her2蛋白的分子数目范围是455到12000,平均分子数目为6735。

[0055] 实施例2

[0056] 一种定量检测单个T细胞表面的CD3蛋白含量的方法,步骤如下:

[0057] (1) 建立荧光强度-荧光分子数目的标准曲线,具体包括以下步骤:

[0058] a、配制标准溶液,标准溶液由表面键合已知荧光分子数目的荧光微球配制在1mL的电泳缓冲溶液中而成,其中,不同标准溶液所用微球的荧光分子相同,均为BV605,仅键合的分子数目不同,所用微球的直径与所测定细胞的直径相当,微球直径为13 μ m,微球的材质为苯乙烯-二乙烯基苯,微球粒径的RSD小于5%,超声5min混匀,荧光分子和微球表面均带有电荷,所配制标准溶液中微球的浓度为 2×10^4 个/mL;将三种表面键合不同荧光分子数目的荧光微球配制在50mmol/L的Tris-HCl电泳缓冲溶液中,然后放入棕色样品瓶中,三种微球表面的FITC分子数目分别为300、900和9000,分别记为1号、2号和3号标准样品;

[0059] b、采用电泳缓冲溶液冲洗毛细管,然后使电泳缓冲溶液充满毛细管,使毛细管内壁充分平衡,毛细管内径为25 μ m,外径为365 μ m,然后将1号标准样品放入棕色的样品瓶中,样品瓶置于毛细管电泳的进样端,将毛细管一端插入样品瓶中,另一端插入电泳缓冲溶液中,两个瓶中分别插入铂电极;

[0060] c、开启高压电源,对毛细管两端加电压,微球在电场作用下依次进入毛细管,由于微球表面带有电荷,在电泳和电渗流共同作用下,电泳会将微球分离并输送通过检测光窗,毛细管的有效长度为35cm,分离过程中使微球之间无粘连。共聚焦激光诱导荧光检测器焦斑宽度为15 μ m,保证每次只能检测到一个微球的荧光信号,测定荧光微球的个数约为3000个,记录检测到的荧光信号。所用荧光检测器的波长参数与BV605荧光分子的激发和发射波长相匹配,所用荧光检测器的激发波长为405nm,检测波长为590~720nm;

[0061] d、依次重复步骤b、c,获得2号和3号标准溶液的荧光信号强度;

[0062] e、将所测得的微球荧光强度的中位数作为该标准溶液的荧光强度,依据标准溶液中微球的荧光分子数目和标准溶液的荧光强度建立带有BV605荧光分子的微球的标准曲线;

[0063] (2) 单细胞膜蛋白定量检测,具体包括以下步骤:

[0064] a、收集培养的T细胞细胞,收集到的细胞采用显微镜进行细胞计数,细胞数目约为 1×10^6 个,采用PBS对细胞进行洗涤,通过离心除去细胞培养液,离心5min(转速为1000rpm/min),洗涤完成后,采用PBS对细胞进行重悬;

[0065] b、采用200 μ l体积分数为4%的甲醛溶液固定细胞,37 $^{\circ}$ C下固定15min,然后洗涤细胞,离心5min(转速为1000rpm/min),离心后采用PBS重悬细胞;

[0066] c、采用体积分数为5%的BSA对乳腺癌细胞进行封闭,封闭时间为15min,离心除去BSA溶液,采用100 μ l的PBS重悬细胞;

[0067] d、在细胞悬浮液中加入5 μ L带有BV605的鼠抗人抗CD3蛋白的IgG抗体对T细胞膜表面的CD3蛋白进行免疫标记,在37 $^{\circ}$ C下孵育30min,标记完成后洗涤细胞三次,每次离心5min(转速为1000rpm/min),然后采用1mL50 mM的Tris-HCl电泳缓冲溶液重悬细胞,形成细胞悬浮液,取部分细胞在荧光显微镜下观察,确定是否标记成功;

[0068] e、采用50mM的Tris-HCl电泳缓冲溶液冲洗毛细管,并使其充满毛细管,然后将1mL的细胞悬浮液加入棕色样品瓶中,细胞浓度约为 10^4 个/mL,样品瓶置于毛细管电泳的进样端,将毛细管一端插入样品瓶中,另一端插入电泳缓冲溶液中;

[0069] f、开启高压电源,对毛细管两端加电压,电场强度为400V/cm;细胞在电场作用下

依次进入毛细管,由于细胞表面带有电荷,在电泳和电渗流共同作用下,毛细管电泳会将细胞分离,使细胞单独且连续地从进样端驱动至检测光窗;记录检测到的荧光信号;

[0070] g、依据(1)中所建标准曲线和步骤f中检测的荧光信号计算每个T细胞中CD3蛋白的分子数目,实验结果表明,100个T细胞CD3蛋白的分子数目范围是565到11000,平均分子数目为8435。

[0071] 实施例3:

[0072] 一种定量检测单个巨噬细胞表面的CD63和CD206蛋白含量的方法,步骤如下:

[0073] (1) 建立荧光强度-荧光分子数目的标准曲线,具体包括以下步骤:

[0074] a、配制标准溶液,标准溶液由表面键合已知荧光分子数目的荧光微球配制在1mL的电泳缓冲溶液中而成,其中,不同标准溶液所用微球的荧光分子相同,均为FITC,仅键合的分子数目不同,所用微球的直径与所测定细胞的直径相当,微球直径为13 μ m,微球的材质为聚苯乙烯,超声10min混匀,荧光分子和微球表面均带有电荷,所配制标准溶液中微球的浓度为 10^4 个/mL;将三种表面键合不同荧光分子数目的荧光微球配制在50mM的硼酸钠-硼酸电泳缓冲溶液中,然后放入棕色样品瓶中,第一个标准曲线中,三种微球表面的BV421分子数目分别为400、1000和8000,分别记为1号、2号和3号标准样品;第二个标准曲线中,三种微球表面的BV711分子数目分别为400、1000和8000,分别记为4号、5号和6号标准样品;

[0075] b、采用电泳缓冲溶液冲洗毛细管,然后使电泳缓冲溶液充满毛细管,使毛细管内壁充分平衡,毛细管内径为25 μ m,外径为365 μ m,然后将1号标准样品放入棕色的样品瓶中,样品瓶置于毛细管电泳的进样端,将毛细管一端插入样品瓶中,另一端插入电泳缓冲溶液中,两个瓶中分别插入铂电极;

[0076] c、开启高压电源,对毛细管两端加电压,微球在电场作用下依次进入带检测光窗的毛细管,由于微球表面带有电荷,在电泳和电渗流共同作用下,电泳会将微球分离,毛细管的有效长度为35cm,分离过程中使微球之间无粘连。共聚焦激光诱导荧光检测器焦斑直径15 μ m,每次只能检测到一个微球的荧光信号,所用荧光检测器的波长参数与BV421和BV711荧光分子的激发和发射波长相匹配,采用双通道检测,通道1的激发波长为405nm,检测波长为420~550nm;通道2的激发波长为405nm,检测波长为650~850nm,每种微球测定的个数约为4000个,记录检测到的荧光信号;

[0077] d、依次重复步骤b、c,获得2号至6号标准溶液的荧光信号强度;

[0078] e、将所测得的微球荧光强度的中位数作为该标准溶液的荧光强度,依据标准溶液中微球的荧光分子数目和标准溶液的荧光强度建立带有BV421和BV711两种荧光微球的标准曲线;

[0079] (2) 单细胞膜蛋白定量检测,具体包括以下步骤:

[0080] a、收集培养的巨噬细胞,收集到的细胞采用显微镜进行细胞计数,细胞数目约为 2×10^6 个,采用PBS对细胞进行洗涤,通过离心除去细胞培养液,离心10min(转速为800rpm/min),洗涤完成后,采用PBS对细胞进行重悬;

[0081] b、采用100 μ l体积分数为4%的甲醛溶液固定细胞,37 $^{\circ}$ C下固定15min,然后洗涤细胞,离心10min(转速为800rpm/min),离心后采用PBS重悬细胞;

[0082] c、采用体积分数为5%的BSA对巨噬细胞进行封闭,封闭时间为15min,离心除去BSA溶液,采用100 μ l的PBS重悬细胞;

[0083] d、细胞悬浮液中加入5 μ L带有BV421鼠抗人的抗CD63的IgG抗体和5 μ L带有BV711的鼠抗人抗CD206的IgG抗体对巨噬细胞膜表面的CD63和CD206蛋白进行免疫标记,在37℃下孵育1hour,标记完成后洗涤细胞三次,每次离心5min(转速为1000rpm/min),然后采用1mL的50mM的硼酸钠-硼酸缓冲溶液重悬细胞,形成细胞悬浮液,取部分细胞在荧光显微镜下观察,确定是否标记成功;

[0084] e、采用50mM的硼酸钠-硼酸缓冲溶液冲洗毛细管,并使其充满毛细管,然后将1mL的细胞悬浮液加入棕色样品瓶中,细胞浓度约为 10^4 个/mL,样品瓶置于毛细管电泳的进样端,将毛细管一端插入样品瓶中,另一端插入电泳缓冲溶液中;

[0085] f、开启高压电源,对毛细管两端加电压,电场强度为350V/cm;细胞在电场作用下依次进入毛细管,由于细胞表面带有电荷,在电泳和电渗流共同作用下,毛细管电泳会将细胞分离,使细胞单独且连续地从进样端驱动至检测光窗。记录检测到的荧光信号;

[0086] g、依据(1)中所建标准曲线和步骤f中检测的荧光信号计算每个单细胞中CD63和CD206膜蛋白的分子数目,实验结果表明,100个巨噬细胞中CD63蛋白的分子数目范围是745到13000,平均分子数目为9435;CD206蛋白的分子数目范围是935到15680,平均分子数目为9338。

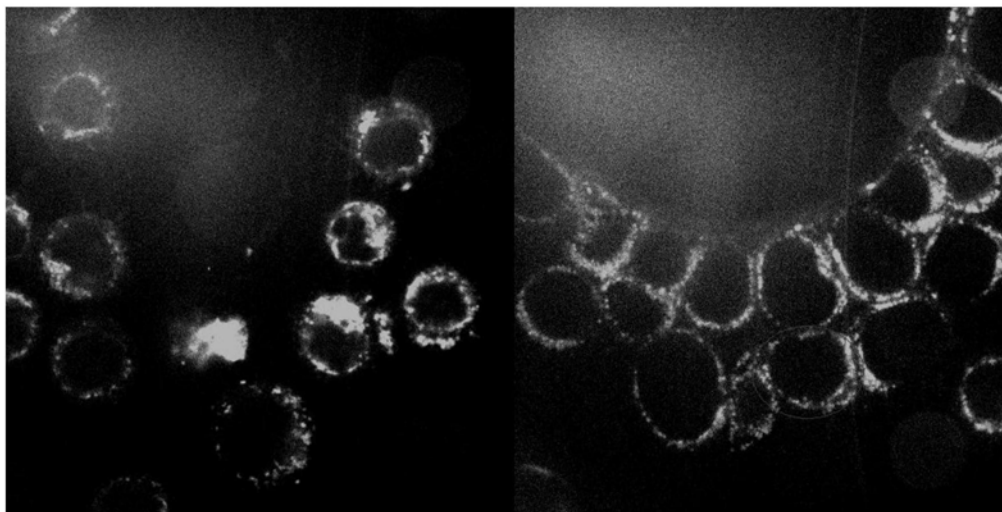


图1

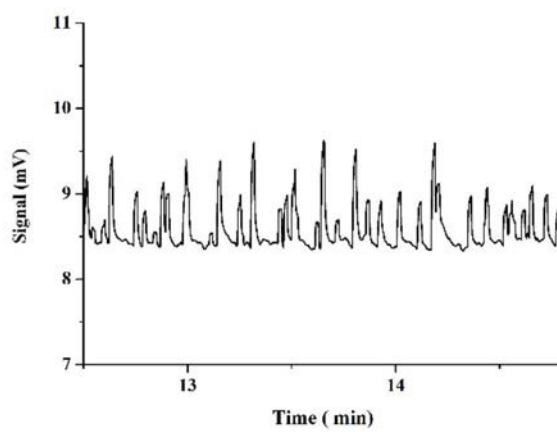


图2