

使用 NovoCyte Advanteon 流式细胞仪 进行高灵敏度 SSC 和荧光检测

作者

Lauren Jachimowicz,
Yan Lu, Peifang Ye 和
Garret Guenther
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了 Agilent NovoCyte Advanteon 流式细胞仪分析小颗粒的性能，包括由细胞形成的细胞外囊泡 (extracellular vesicle, EV) 和微球。NovoCyte Advanteon 流式细胞仪配备了先进的检测器，能够提供高灵敏度的侧向角散射 (side scatter, SSC) 和荧光检测，获得比传统流式细胞仪更出色的检测结果。

前言

人们已经认识到由细胞形成的 EV 在多种生物过程中都发挥着重要作用，其也逐渐成为生物医学研究领域的热点。正常细胞和病理状态下的细胞都会释放 EV，它是由细胞形成的膜性囊泡。根据它们的细胞起源和大小可分为外泌体、微囊泡和凋亡小体。外泌体起源于细胞的内吞过程，大小为 50–150 nm。微囊泡的形成方式是细胞表面出芽，大小为 50 nm–1 μm，凋亡小体则是细胞发生程序性细胞死亡所释放出的 0.8–5 μm 的囊泡。EV 在细胞内通讯中发挥着重要作用，在血液、其他生物体液和细胞培养上清液中都发现了 EV。EV 与许多疾病密切相关，包括癌症转移、血液疾病、心血管疾病、传染病等。EV 作为一种无细胞疗法来治疗癌症和其他疾病具有潜在的应用前景，且已有广泛的研究。目前主要使用蛋白质印迹和酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测 EV，这些技术可以测定纯化颗粒的整体蛋白质浓度，但不能分析单个颗粒的蛋白质表达。利用流式细胞术进行小颗粒研究能够改善现有的检测方法，该技术能够对大量单个颗粒进行分析并检测表面的蛋白质水

平。然而，由于 EV 直径小、成分多变，传统的流式细胞仪难以对其进行分析。随着流式细胞术的不断发展，如 NovoCyte Advanteon 流式细胞仪，其检测能力也不断提升，能够检测 EV 等小颗粒。本研究使用微球和细胞来源的 EV，考察了 NovoCyte Advanteon 流式细胞仪分析小颗粒的能力。

实验部分

NovoCyte Advanteon 流式细胞仪可以使用灵敏的 SSC 检测小颗粒微球

为了确定 NovoCyte Advanteon 流式细胞仪分析小颗粒的能力，我们首先分析了 3 种商品化的小颗粒微球混合物：

- 不同大小空白标准微球 (NIST-traceable size standards, Bang's laboratories)
- ApogeeMix 微球
- BioCytex-Plus FSC 和 SSC 混合微球

这些微球大小为 100–1300 nm。NovoCyte Advanteon 流式细胞仪配备灵敏度更高的 SSC 检测器，因此仅使用 SSC 就可以分析小至 100 nm 的微球 (图 1)。

使用流式细胞术对生物小颗粒进行高灵敏度分析

膜囊泡的折射率 (refractive index, RI) 与微球的折射率不同，因此确定 NovoCyte Advanteon 流式细胞仪检测生物来源的 EV 的能力非常重要。我们分析了来自表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的 HEK293T 细胞的纯化脂质颗粒，这些脂质颗粒通过鼠类白血病病毒 (MLV) 诱导释放。根据动态光散射测定结果，这些脂质颗粒大小约为 240 nm (图 2A)。通过 SSC 和 GFP 荧光将脂质颗粒与背景分离 (图 2B)。此外，NovoCyte Advanteon 流式细胞仪配备有注射泵，能够精确测量样品体积，直接对脂质颗粒进行绝对计数。图 2C 显示了连续稀释的 MLV 诱导的脂质颗粒的结果。对于小颗粒检测而言，确保对单个颗粒进行分析非常重要。如果颗粒的浓度过高，颗粒之间靠得太近，检测时多个颗粒可能会被当成一个颗粒。这种现象称为重合 (coincidence) 或蜂群效应 (swarm effect)。通常在检测阈值以下的单个颗粒易被检测为累积事件，因为这使它们能够达到触发阈值。这种效应会使数据失真，使得检测到的样品浓度和表型不够准确。一种解决办法是对样品进行连续稀释，以确保进行单颗粒检测。如果没有重合，通过连续稀释应观察到样品浓度呈线性下降。根据实测的绝对事件数量，实际稀释倍数与计算得出的稀释倍数表现出良好的相关性 (图 2C)，证实了检测到的事件并非是由于重合。这些数据展示了 NovoCyte Advanteon 流式细胞仪对膜性小颗粒的检测能力。

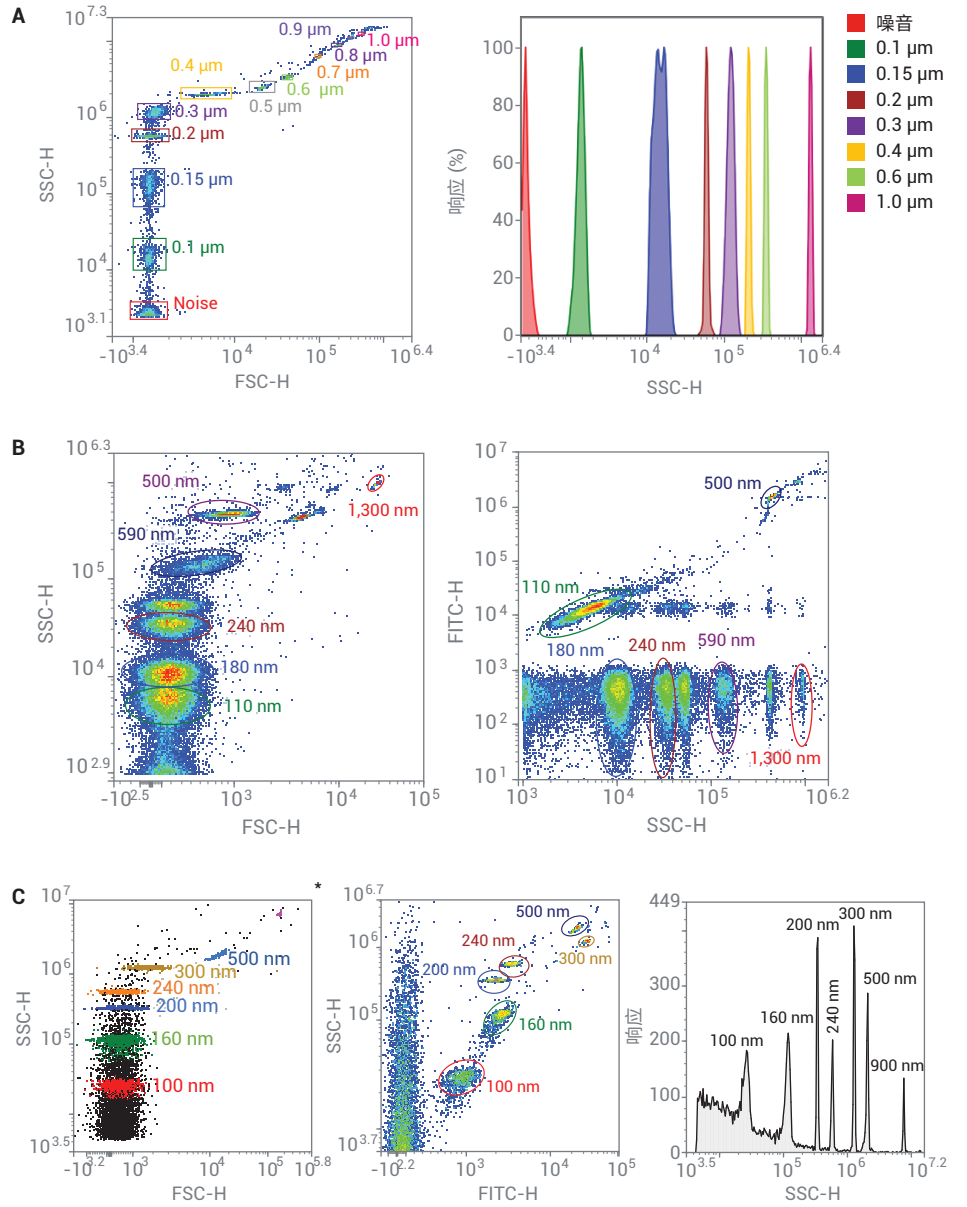


图 1. Agilent NovoCyte Advanteon 流式细胞仪检测小颗粒微球。使用 3 种商品化的小颗粒微球来证明 NovoCyte Advanteon 流式细胞仪侧向角散射 (SSC) 的高灵敏度：不同大小空白标准微球 (NIST-traceable size standards, Bang's laboratories) (A), ApogeeMix 微球 (B) 和 BioCyteX Megamix-Plus (C)。很容易从背景中分辨出小到 100 nm 的颗粒。仪器设置：SSC-H 增益 1000, FSC-H 增益 1000, 阈值 SSC-H 高于 1000

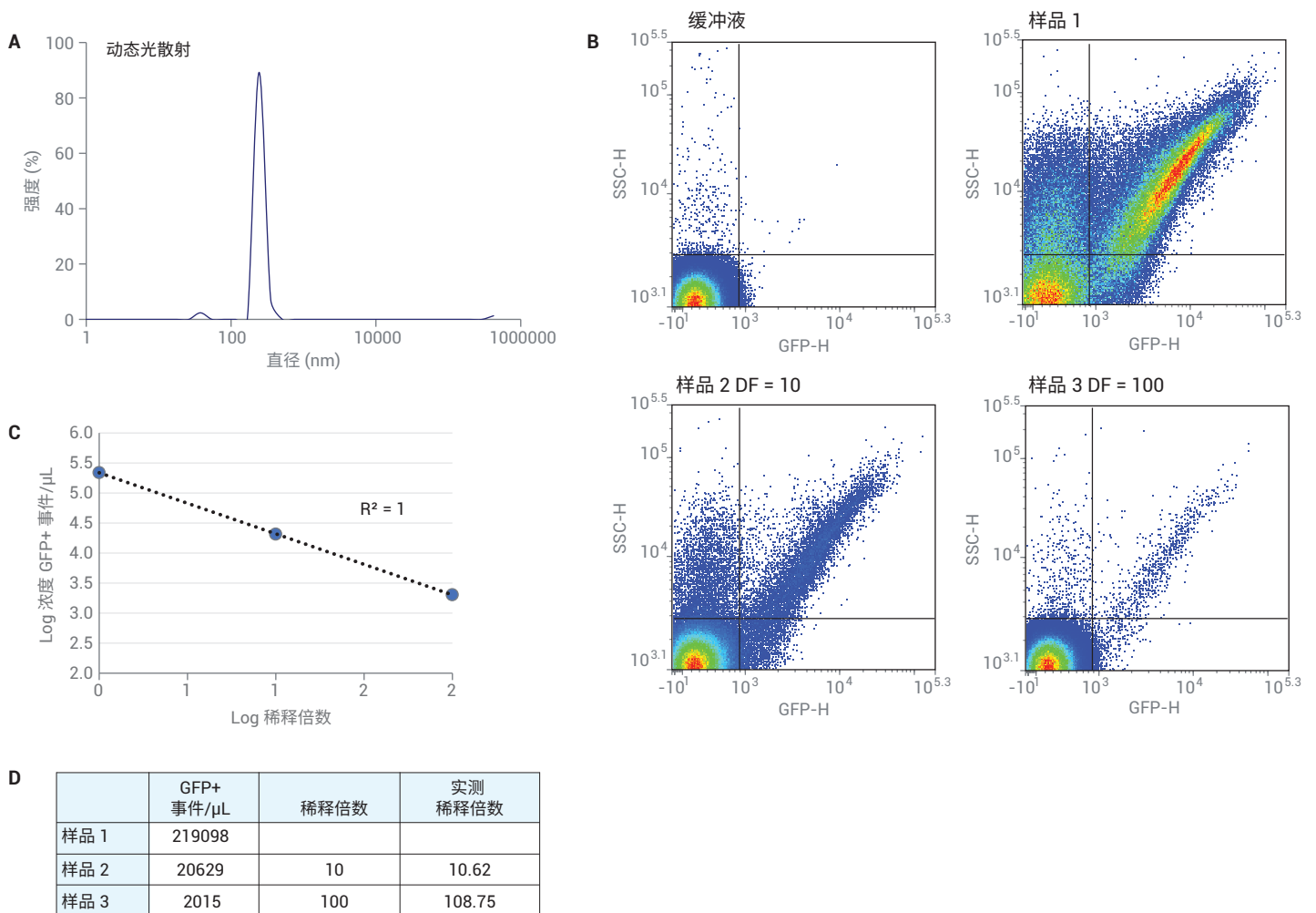


图 2. 使用 Agilent NovoCyte Advanteon 流式细胞仪检测 MLV 诱导的脂质颗粒。(A) 利用动态光散射来检测脂质颗粒大小。(B) 连续稀释的脂质颗粒的 GFP-H 与 SSC-H 关系图。样品 1: 1:1000, 样品 2: 1:10000, 样品 3: 1:100000。(C,D) GFP+ 事件绝对计数的线性, 通过连续稀释的样品的体积计数得到, (C,D) 稀释倍数与 GFP+ 事件浓度的线性曲线。仪器设置: SSC-H 增益 900, 阈值 FITC-H 高于 220, 14 μL/min

血小板活化增加血浆中 EV 的释放

血小板活化后会释放促凝血的 EV, 例如在血栓形成或炎症反应过程中。这些颗粒大小为 50 nm–1 μm 不等, 然而, 大多数血浆来源的 EV 大小为 100–250 nm。

为了诱导 EV 的释放, 使用 ADP 活化血小板。活化之后, 使用超速离心法分离所有 EV, 然后用 anti-CD9、anti-CD61 抗体和膜联蛋白 V 对 EV 进行染色标记 (图 3)。

CD61 是一种非常常见的血小板表面受体, 可识别血小板来源的 EV, 而膜联蛋白 V 和 CD9 通常用作 EV 的通用标志物。使用 ADP 活化血小板后, EV 浓度增加了 5 倍多 (图 3H)。通过表达的 CD9 测得的 EV 浓度最高 (图 3A 和图 3B)。大多数 CD9+ EV 也表达膜联蛋白 V 和 CD61, 证实它们来源于血小板。通过 CD61 或膜联蛋白 V 的表面表达测得的 EV 浓度较低, 表明血浆中的 EV 具有异质性。为了

确认检测到的颗粒是膜囊泡, 而不是蛋白聚集物或其他非膜性结构, 将样品与去垢剂 Triton-X 孵育 1 小时, 以破坏质膜并消除样品中存在的任何囊泡。经 Triton-X 处理后, 之前检测到的 EV 消失, 仅存在背景事件, 表明检测到的事件为 EV。总之, 使用 NovoCyte Advanteon 流式细胞仪, 通过血小板或 EV 特异性标志物能够轻松检测到血小板来源的 EV。

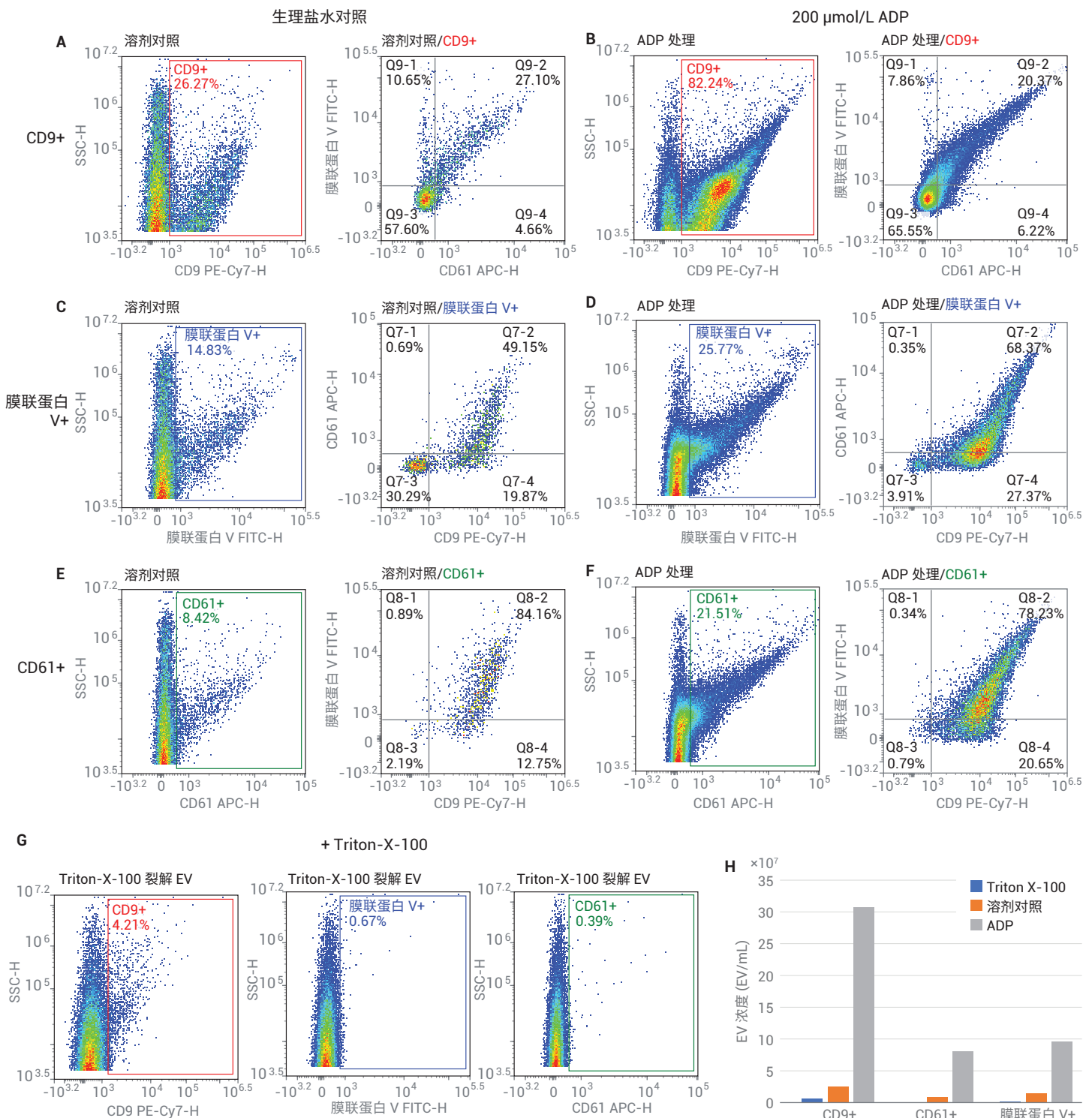


图 3. 通过流式细胞术能够分析血小板活化后增加的 EV 释放。使用柠檬酸钠采血管采集供体血样。单独使用 200 $\mu\text{mol/L}$ ADP 或生理盐水处理全血 30 分钟。然后离心分离 EV: 2500 $\times g$ 离心 15 分钟 (2 次), 然后将上清液在 110000 $\times g$ 下离心 90 分钟 (2 次)。接着用 $\alpha\text{CD9 PE-Cy7}$ 、 $\alpha\text{CD61 APC}$ 抗体和膜联蛋白 V FITC 染色。在生理盐水处理的对照 (A、C、E) 或 ADP 处理的样品 (B、D、F) 中, 通过 CD9 (A、B) 和膜联蛋白 V (C、D) 以及 CD61 (E、F) 鉴定 EV。(G) 分析已鉴定出的 EV, 考察是否共表达其他 EV 标志物 (A-F, 右图)。取一部分囊泡用 1% Triton-X-100 在冰上孵育 1 小时。(H) 本文所述条件下获得的 EV 浓度图。仪器设置: SSC-H 增益 1000, 阈值 SSC-H 高于 1000

结论

各种细胞都会释放 EV，在生物体液和细胞培养上清液中均发现了 EV。它们很容易获得和携带重要的生物信息。它们是癌症、传染病和病理状态的潜在生物标志物，表明它们在疾病研究中具有重要价值。Agilent NovoCyte Advanteon 流式细胞仪配备了先进的检测器，具有高灵敏度的 SSC 和荧光检测功能，克服了传统流式细胞仪进行小颗粒检测的许多挑战。

参考文献

1. Shao, H. *et al.* New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles. *Chem. Rev.* **2018**, *118*(4), 1917–1950
2. Aatonen, M. T. *et al.* Isolation and Characterization of Platelet-Derived Extracellular Vesicles. *J. Extracell. Vesicles* **2014**, *3*
3. Osteikoetxea, X. *et al.* Differential Detergent Sensitivity of Extracellular Vesicle Subpopulations. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*(38), 9775–9782
4. Becker, A. *et al.* Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-To-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell* **2016**, *30*(6), 836–848
5. Xu, R. *et al.* Extracellular Vesicle Isolation and Characterization: Toward Clinical Application. *J. Clin. Invest.* **2016**, *126*(4), 1152–1162
6. Aatonen, M. T. *et al.* Isolation and Characterization of Platelet-Derived Extracellular Vesicles. *J. Extracell. Vesicles* **2014**, *3*

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。