

## 技术与方法

# HRP与TMB显色用于流式细胞仪MoFlo Astrios<sup>EQ</sup> 单细胞分选的方法探索

符蓉 张小翠\*

(上海交通大学医学院基础医学公共技术平台, 上海 200025)

**摘要** 该文应用流式细胞仪MoFlo Astrios<sup>EQ</sup>结合辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)与四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)混合显色原理, 进行单细胞分选的方法探索。结果显示: 分选不同数量的微球或者细胞导致两者显色反应呈现深浅不一的蓝色, 而未分选的对照组为无色,  $D_{650}$ 值提示组间具有显著性差异; 分选微球和分选细胞组间无显著差异。研究表明, 该方法能够快速判断实际分选得到的微球或细胞数与理论设置是否吻合, 为后续单细胞分选提供判断依据。另外, 整个验证过程不需要额外的大型仪器, 试剂常规、廉价, 可作为今后单细胞分选实验的辅助手段。

**关键词** 流式细胞仪; 定量分选; 单细胞分选; HRP; TMB

## An Exploration of HRP and TMB Colorimetric Method of the Flow Cytometry MoFlo Astrios<sup>EQ</sup> on Single-Cell Sorting

Fu Rong, Zhang Xiaocui\*

(Core Facility of Basic Medical Sciences, College of Basic Medical Sciences of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China)

**Abstract** A single-cell sorting method was explored using flow cytometry MoFlo Astrios<sup>EQ</sup> combined with the colorimetric principle of horseradish peroxidase and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. The results showed that sorting of different calibration beads or cells resulted in a different blue change of the two chromogenic reaction, while the unsorted control groups were colorless, which were significantly different between the groups in  $D_{650}$  value. However, sorting calibration beads or cells have not significant difference. It concluded that the method could quickly judge whether the actual number of beads or cells sorted into microtiter plate wells in accordance with the theoretical setting, and provide accurate information for the single cell sorting. In addition, the whole verification process did not require large-scale or special instruments and the reagent was cheap, which could be used as an auxiliary means for single cell sorting experiments in the future.

**Keywords** flow cytometry; quantitative sorting; single-cell sorting; horseradish peroxidase; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

随着细胞生物学领域研究的不断进步, 科研人员越来越认识到针对细胞群体的研究并不能满足目

前的科研需求, 从而对于单个细胞的研究越来越深入, 包括单细胞PCR、单细胞基因测序、细胞个体

收稿日期: 2018-07-10

接受日期: 2018-10-26

\*通讯作者: Tel: 021-63846590-778057, E-mail: zhangcui1986921@163.com

Received: July 10, 2018

Accepted: October 26, 2018

\*Corresponding author. Tel: +86-21-63846590-778057, E-mail: zhangcui1986921@163.com

网络出版时间: 2018-11-29 14:30:51

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181129.1430.004.html>

差异性研究、转录组学研究等<sup>[1]</sup>。获取单个细胞的方法有很多,包括连续稀释法、显微操作法、激光捕获显微切割术等<sup>[2]</sup>,而其中流式细胞分选术凭借自身高精度、高通量、多参数等优势成为应用最多的单细胞分离方法之一<sup>[3]</sup>。

如何判断单细胞分选的准确性是流式细胞术中的一个技术难点。目前,常规手段是通过显微镜观察孔板内是否有分选的细胞以及分选细胞的数量和状态,这样不仅费时费力,还可能造成人为误差。有研究者在微孔板板盖上预分选肉眼可见的液滴,但并不能直观判断分选的单细胞是否落在孔板内<sup>[4]</sup>;Evans等<sup>[5]</sup>应用流式细胞仪结合高分辨细胞成像仪来观察分选后单细胞的情况,这不仅需要额外的仪器辅助,也需要耗费一定的时间去检测。

辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)通过H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化有机或无机复合物。人工合成的四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)可作为检测血液内过氧化物酶活性的一个底物,目前被常规用于ELISA实验。两者混合后由无色变成蓝色,可以通过肉眼识别,也可用多功能微孔板检测仪读取TMB在650 nm处的光吸收值<sup>[6-7]</sup>。

本文应用MoFlo Astrios<sup>EQ</sup>流式细胞仪及HRP与TMB的显色反应,结合96孔板、384孔板、96孔PCR板、8联排PCR管,对微球和HEK293T细胞进行了定量分选,旨在探讨分选单个微球或细胞的准确性,为后续实验提供一个简单、方便、快捷的方法,达到在短时间内直观判断单细胞分选准确性的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 材料与试剂 人胚胎肾细胞HEK293T源自上海交通大学基础医学院病理与生理学系;荧光微球(calibration beads)购自美国Beckman Coulter公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)与四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)购自美国Thermo公司;DMEM培养基、胎牛血清(FBS)和胰酶均购自美国Gibco公司;96孔板、384孔板、96孔PCR板和8联排PCR管均购自美国Axygen公司。

1.1.2 主要仪器 流式细胞仪(MoFlo Astrios<sup>EQ</sup>)购自美国Beckman Coulter公司;倒置显微镜(ECLIPSE Ti)购自日本Nikon公司;多功能微孔板检测仪(Synergy Neo)购自美国Biotek公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养与样本制备 人胚胎肾细胞HEK293T采用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养,并置于37 °C、含5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度的培养箱内,2~3天传代1次;分选前选取对数生长期细胞,用0.25%胰酶消化,制备成单细胞悬液,调整细胞浓度为1×10<sup>6</sup>/mL,并用40 μm的滤网过滤,置于冰上待用。整个过程均在超净台内操作。

1.2.2 流式细胞仪调试 MoFlo Astrios<sup>EQ</sup>是一款空气中激发的超高速流式分选系统,鞘液为高压灭菌的Dulbecco's磷酸盐缓冲液(DPBS)。仪器开机后运行液流系统,手动调节千分尺和平衡台的旋钮,保证液流垂直对齐;打开激光器,调节千分尺使得活动图像与参考图像相似,完成激光光斑的测定;上样荧光微球,针对每项参数进行荧光强度优化,打开质控(QC)键,自动执行质检;通过“Definition”选项,设置96或384孔板分选参数,选择最优分选液流,点击“Drop Delay”按钮,执行液滴延迟计算。

将调试用的孔板(含板盖)置于分选输出架上,按下“Home”键与“End”键,CyClone板会自动移动到A1和其对角线的孔两个位置,为了分选精确定位,还需预分选微球或细胞至板盖上,观察板盖上液滴是否在该孔的中央,如果有偏移,还需对孔板位置进行微调。打开“Summit 6.2”软件,建立散点图前向角散射光强度(forward scatter, FSC)和侧向角散射光强度(side scatter, SSC),圈出目标群体,通过FSC、SSC的高度(H)、宽度(W)、面积(A)去除碎片、死细胞和黏连体。采用单细胞(Single)-0.5液滴(Drop)分选模式,低流速上样,保证样品与鞘液0.3 psi的压力差。

1.2.3 96孔板分选 96孔板每个孔内预先加入50 μL TMB底物,待分选上样管PBS中加入10 μL微球,加入适量HRP并调节其浓度为400 μg/mL。以列为单位,一块板设置每列分选5、3、1、0个微球,重复两次;另一板设置每列分选1、0个微球,重复两次。分选完毕后,避光静置30 min,拍照,并使用多功能微孔板检测仪读取TMB在650 nm处的光吸收值。

更换培养细胞用的96孔板,每孔中加入100 μL DMEM培养基,调整细胞浓度为1×10<sup>6</sup>/mL,设置孔板分选细胞数为1。分选完毕后加盖取出96孔板,倒置显微镜下观察,统计含单细胞的孔数,继而置于培养箱中培养,7天后观察细胞的生长情况。

1.2.4 384孔板分选 384孔板每个孔内预先加入

10  $\mu\text{L}$  TMB底物, 待分选上样管PBS中加入10  $\mu\text{L}$  微球, 加入适量HRP并调节其浓度为50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。以列为单位, 一块板1~12列设置每列分选5、3、1、0个微球, 13~24列设置每列分选5、3、1、0个细胞, 分别重复两次; 另一块板1~12列设置每列分选1、0个微球, 13~24列设置每列分选1、0个细胞, 分别重复五次。分选完毕后, 避光静置15 min, 拍照, 并使用多功能微孔板检测仪读取TMB在650 nm处的光吸收值。

**1.2.5 PCR管分选** 96孔PCR板每个孔内预先加入10  $\mu\text{L}$  TMB底物, 待分选上样管PBS中加入10  $\mu\text{L}$  微球, 加入适量HRP并调节其浓度为50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。以列为单位, 分别设置每列分选5、3、1、0、1、0个微球, 重复一次。分选完毕后, 避光静置15 min, 拍照。8联排PCR管内预先依次加入10  $\mu\text{L}$ 、5  $\mu\text{L}$ 、3  $\mu\text{L}$ 、2  $\mu\text{L}$ 、1  $\mu\text{L}$  TMB底物, HRP浓度为50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。设置分选5、3、1、0个微球, 重复1次。分选完毕后, 避光静置5~15 min, 拍照。

**1.2.6 统计学分析** 实验数据均来自于1次实验的

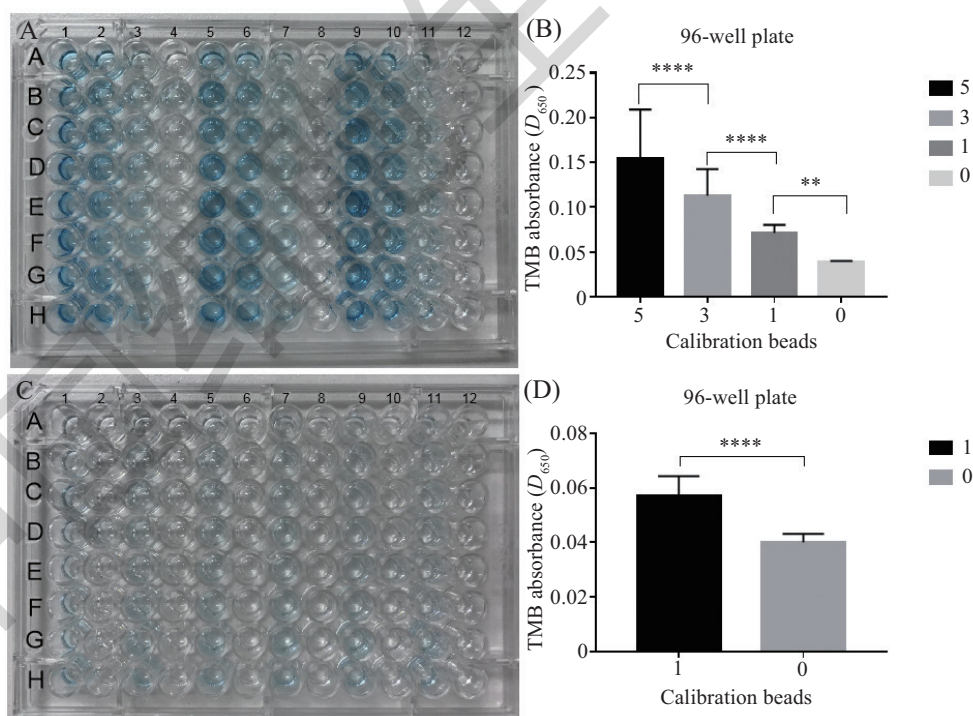
至少3个重复或至少3个以上的独立实验, 并选取具有代表性的数据或图像进行展示。实验数据采用GraphPad Prism 7统计, 统计学分析以*t*-test、单因素方差分析为主。其中,  $P < 0.01$ 表示具有统计学差异,  $P < 0.0001$ 表示具有显著性统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 96孔板分选结果

分选完成且避光处理后, 可清晰观察到孔内液体颜色由透明转变为蓝色, 且随微球个数减少而颜色变浅。分选5个微球的孔, 颜色较深为深蓝色; 分选3个微球的孔, 颜色略浅为蓝色; 分选1个微球的孔, 颜色最浅为浅蓝色; 不分选微球的孔, 液体为透明色(图1A和图1C)。微孔板检测仪读取TMB在650 nm处的光吸收值并统计作柱状图(图1B和图1D), 统计结果提示, 分选5、3、1、0个微球的孔, 组间有显著性差异。

HEK293T单细胞分选后显微镜观察, 含单细胞的孔数平均为93个, 得孔率为96.9%; 7天后观察细胞



A: 以列为单位分选5、3、1、0个微球, 避光处理30 min, 孔内TMB与HRP反应呈蓝色; B: 96孔板内TMB在650 nm处的光吸收值; C: 以列为单位分选1、0个微球, 避光处理30 min, 孔内TMB与HRP反应呈蓝色; D: 96孔板内TMB在650 nm处的光吸收值。\*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

A: 5, 3, 1, 0 beads were sorted into lines followed by a 30 min incubation in the dark, the blue coloration is produced by TMB upon catalysis by HRP; B: TMB relative absorbance values of 96-well plate; C: 1, 0 beads were sorted into lines followed by a 30 min incubation in the dark, the blue coloration is produced by TMB upon catalysis by HRP; D: TMB relative absorbance values of 96-well plate. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。

图1 96孔板分选微球结果与TMB在650 nm处的光吸收值

Fig.1 Calibration beads were sorted into 96-well plates and TMB absorbance at 650 nm

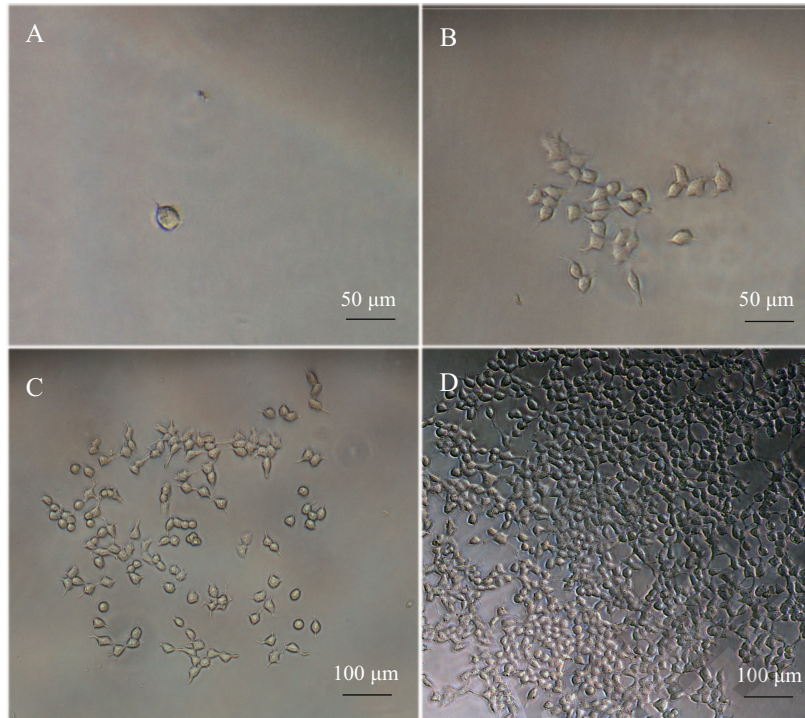


图2 HEK293T单细胞分选后培养1、3、5、7天(A~D)结果图

Fig.2 HEK293T cultured after single-cell sorting for 1, 3, 5 and 7 days (A-D)

克隆数平均为67个, 克隆率为69.8%, 其中36个边缘孔中形成克隆的孔平均为19个, 60个非边缘孔中形成克隆的孔平均为48个。图2为HEK293T培养1天、3天、5天、7天细胞的形态图。结果显示, HEK293T细胞生长状态良好, 不断分裂增殖, 7天后铺满整个孔底。

## 2.2 384孔板分选结果

分选完成且避光处理后, 可清晰观察到1~12列的微球与13~24列的细胞其孔内液体颜色由透明变为蓝色, 且随微球与细胞个数减少而颜色变浅(图3A和图3C)。微孔板检测仪读取TMB在650 nm处的光吸收值并统计作柱状图(图3B和图3D)。统计结果提示, 分选不同数量微球或细胞的孔, 组间有显著性差异( $P < 0.0001$ ); 分选相同数量微球或细胞的孔, 组间并没有显著差异。

## 2.3 PCR管分选结果

96孔PCR板分选完成且避光处理后, 可清晰观察到孔内液体颜色由透明转变为蓝色, 且随微球个数减少而颜色变浅(图4A)。8联排PCR管分选完成且避光处理后, 可清晰观察到孔内液体颜色由透明转变为蓝色, 且随微球个数减少而颜色变浅(图4B)。

## 3 讨论

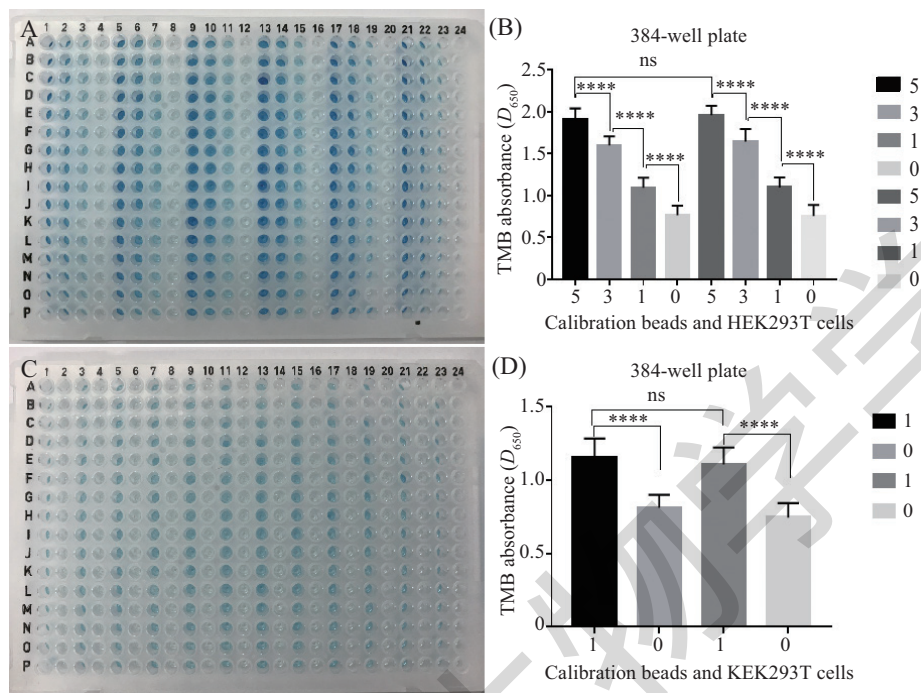
单细胞的精准分离是单克隆细胞培养及后续细胞实验能否成功的前提。MoFlo Astrios<sup>EQ</sup>是一款空气激发的高端流式细胞仪, 能够快速有效地对单个细胞进行分选, 同时要求技术人员具有丰富的理论知识和操作经验<sup>[8]</sup>。分选之前对喷嘴的选择、仪器的调试, 特别是对孔板的精确定位尤为重要, 稍有偏差就可能影响最后的分选结果, 如出现孔里没有细胞或多个细胞的现象<sup>[9]</sup>。

在TMB底物体积恒定的前提下, 分选混有HRP不同数量的微球, 仅需避光静置一段时间, 孔内TMB底物由无色变为深浅不一的蓝色, 这样不仅可以判断微球是否落在孔板中, 还可以确认孔内实际分选微球的数量。相比荧光微球而言, 细胞存在均一性差、黏性大、碎片多等劣势, 实际分选时可能会影响单细胞的得孔率。本实验探索了384孔板分选HEK293T细胞的实验, 对比细胞与微球的显色差异以及TMB在650 nm处的光吸收值, 结果证明两者并无显著性差异。由此说明, 不管是分选微球还是细胞, 通过对仪器的精确调试和参数设置, 结合HRP与TMB的显色反应, 均可准确判断孔板内实际分选的微球或细胞数。另外, 我们选用96孔PCR板与8联

排PCR管进行实验,且在8联排PCR管中底物TMB体积依次减少、难度逐渐增加的情况下,结合HRP与TMB的显色反应,仍然得到了很好的显色结果,为后

续的单细胞PCR实验或测序工作做了很好的铺垫。

仪器精确调试后,结合显色反应判断并确认每个细胞能够达到孔板中央位置。更换培养细胞用的

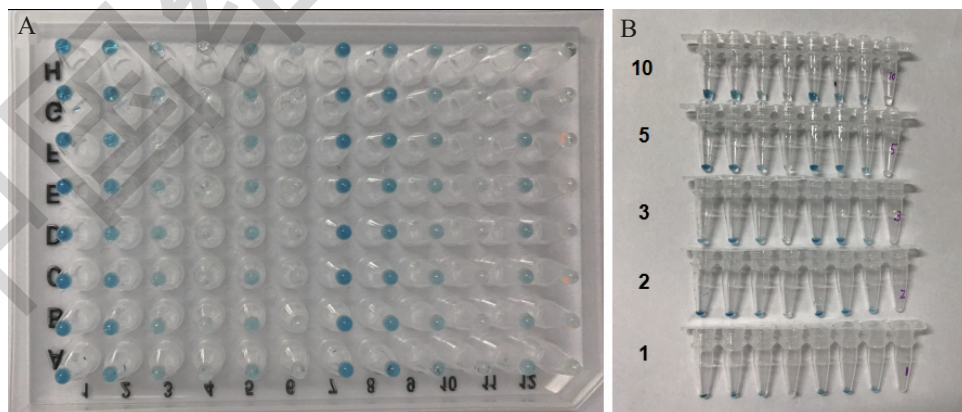


A: 1~12列设置每列分选5、3、1、0个微球,13~24列设置每列分选5、3、1、0个HEK293T细胞; B: 384孔板内TMB在650 nm处的光吸收值; C: 1~12列设置每列分选1、0个微球,13~24列设置每列分选1、0个HEK293T细胞; D: 384孔板内TMB在650 nm处的光吸收值。\*\*\*\* $P < 0.0001$ ; ns: 无显著差异。

A: 5, 3, 1, 0 beads were sorted into 1-12 lines and 5, 3, 1, 0 HEK293T cells were sorted into 13-24 lines; B: TMB relative absorbance values of 384-well plate; C: 1, 0 beads were sorted into 1-12 lines and 1, 0 HEK293T cells were sorted into 13-24 lines; D: TMB relative absorbance values of 384-well plate. \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; ns: not significant.

图3 384孔板分选微球和HEK293T结果与TMB在650 nm处的光吸收值

Fig.3 Calibration beads and HEK293T were sorted into 96-well plates and TMB absorbance at 650 nm



A: 96孔PCR板每个孔内预先加入10  $\mu$ L TMB底物,HRP浓度为50  $\mu$ g/mL,以列为单位设置每列分选5、3、1、0、1、0个微球; B: 8联排PCR管每排预先加入10  $\mu$ L、5  $\mu$ L、3  $\mu$ L、2  $\mu$ L与1  $\mu$ L TMB底物,HRP浓度为50  $\mu$ g/mL,设置每孔分选5、3、1、0个微球。

A: 96-well PCR plates were prepared with 10  $\mu$ L in each well and HRP concentration of 50  $\mu$ g/mL. 5, 3, 1, 0, 1, 0 beads were sorted into lines; B: 8-Strip PCR Tubes were prepared with 10  $\mu$ L, 5  $\mu$ L, 3  $\mu$ L, 2  $\mu$ L and 1  $\mu$ L TMB and HRP concentration of 50  $\mu$ g/mL. 5, 3, 1, 0 beads were sorted into lines.

图4 96孔PCR板与8联排PCR管分选微球结果图

Fig.4 Calibration beads were sorted into 96-well PCR plates and 8-Strip PCR Tubes

96孔板分选HEK293T单个细胞,完成后显微镜下观察,得到单细胞的孔数平均为93孔,得孔率为96.8%,7天后统计克隆率为69.8%,这与细胞本身及存活难易有着直接影响,当然也和细胞培养有一定关系。另外,研究发现,96孔板边缘孔克隆率低于非边缘孔的现象,这种称之为边缘效应,具体表现为贴壁细胞在培养板边缘孔和非边缘孔分布不均匀<sup>[10]</sup>。造成这种现象的原因有很多,其中最主要的是热梯度现象和边缘孔的蒸发效应<sup>[11-12]</sup>,以上两种因素都可能影响边缘孔细胞的贴壁过程,从而影响细胞生长速率、代谢和分化<sup>[13]</sup>。因此,做单克隆细胞培养实验时,尽量把细胞分选在孔板非边缘区,以得到较高的克隆率。

细胞的分选过程与液流状态息息相关,而液流是一个实时流动的状态<sup>[14]</sup>,即使当时验证显色成功,也不能完全保证接下来的单细胞分选同样顺利。我们设想是否能够摸索出培养基中加入TMB底物的适宜体积,待分选细胞中加入HRP的适宜浓度,在不影响后续细胞培养或者实验的前提下,达到分选单细胞后即时显色、实时统计单细胞分选准确率的目的,真正做到显色反应与单细胞分选融合。

本文结合HRP与TMB的显色反应,探讨了一种可以快速验证单细胞分选准确性的方法。我们尝试对微球与HEK293T细胞进行定量分选,选择常用的96孔板、384孔板、96孔PCR板与8联排PCR管四种规格的孔板,通过显色反应不仅可以肉眼直接观察不同数量微球或细胞的显色差异,也可以从多功能微孔板检测仪读取TMB在650 nm处的光吸收值判断实际分选获得的细胞数,得到后续是否进行单细胞分选依据,为单细胞分选技术的应用奠定了基础。

致谢——

感谢贝克曼库尔特公司刘晓萍对本文实验方法的指导。

### 参考文献 (References)

- Rinke C, Lee J, Nath N, Goudeau D, Thompson B, Poulton N, *et al.* Obtaining genomes from uncultivated environmental microorganisms using FACS-based single-cell genomics. *Nat Protoc* 2014; 9(5): 1038-48.
- Xu X, Hou Y, Yin X, Bao L, Tang A, Song L, *et al.* Single-cell exome sequencing reveals single-nucleotide mutation characteristics of a kidney tumor. *Cell* 2012; 148(5): 886-95.
- Wang Y, Navin NE. Advances and applications of single-cell sequencing technologies. *Mol Cell* 2015; 58(4): 598-609.
- 刘锡娟, 丁慧荣, 张宏. FACS Aria流式细胞仪96孔微孔板单个细胞分选方法的优化和应用. *生物学通报*(Liu Xijuan, Ding Huirong, Zhang Hong. Optimization and application of the flow cytometry FACS Aria on single-cell sorting in 96-well plate. *Bulletin of Biology*) 2010; 45(3): 51-4.
- Evans K, Albanetti T, Venkat R, Schoner R, Savery J, Miro-Quesada G, *et al.* Assurance of monoclonality in one round of cloning through cell sorting for single cell deposition coupled with high resolution cell imaging. *Biotechnol Prog* 2015; 31(5): 1172-8.
- Van Weemen BK, Schuurs AH. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett* 1971; 15(3): 232-6.
- Holland VR, Saunders BC, Rose FL, Walpole AL. A safer substitute for benzidine in the detection of blood. *Tetrahedron* 1974; 5(51): 3299-302.
- 张小翠, 谷浩, 赵犇鹏, 符蓉, 于卓. 小鼠骨髓造血干细胞的分离纯化及电镜观察. *中国细胞生物学学报*(Zhang Xiaocui, Gu Hao, Zhao Benpeng, Fu Rong, Yu Zhuo. Isolation and purification of bone marrow hematopoietic stem cells in mice and electron microscopy observation. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2018; 40(4): 568-72.
- 张小翠, 符蓉, 赵犇鹏. 流式细胞仪MoFlo Astrios<sup>EQ</sup> 96孔板单细胞分选方法的条件优化. *上海交通大学学报(医学版)*[Zhang Xiaocui, Fu Rong, Zhao Benpeng. Condition optimization of the flow cytometry MoFlo Astrios<sup>EQ</sup> on single-cell sorting in 96-well plate. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science)*] 2018; 38(7): 769-74.
- Vital-Reyes VS, Rodríguez-Burford C, Oelschläger DK, Grizzle WE. Cell density influences the effect of celecoxib in two carcinoma cell lines. *Biotech Histochem* 2006; 81(1): 51-4.
- Burt SM, Carter TJ, Kricka LJ. Thermal characteristics of microtitre plates used in immunological assays. *J Immunol Methods* 1979; 31(3/4): 231-6.
- Oliver DG, Sanders AH, Hogg RD. Thermal gradients in microtitration plates. Effects on enzyme-linked immunoassay. *J Immunol Methods* 1981; 42(2): 195-201.
- Napione L, Pavan S, Veglio A, Picco A, Boffetta G, Celani A, *et al.* Unraveling the influence of endothelial cell density on VEGF-A signaling. *Blood* 2012; 119(23): 5599-607.
- 闵智慧, 程韵枫. 第三代流式细胞分选仪及96孔板分选单个细胞的方法及参数优化. *中国临床医学*(Min Zhihui, Cheng Yunfeng. Method and parameter optimization of the third-generation flow cytometry sorter and 96-well plate in single cell sorting. *Chinese of Clinical Medicine*) 2016; 23(6): 846-50.