

■ 概述

生物实验中，常需对溶液体系中的可溶性蛋白进行定量检测，如细胞培养上清或血清血浆中的细胞因子含量的定量分析。Cytometric Bead Array (CBA)，即微量样本多重蛋白定量技术，是一个基于流式细胞检测系统的多重蛋白定量检测方法，能够同时对单个样品中的多个指标进行检测。

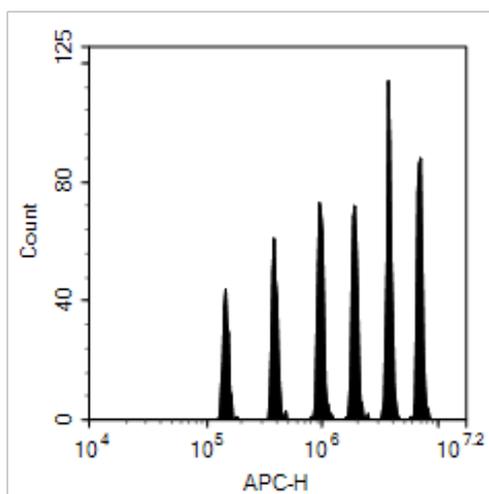
CBA 对样品中的每一个检测指标都有不同的捕获微球，不同的捕获微球上包被有特异的捕获抗体，并具有不同的荧光强度。捕获微球与待测样品溶液混合后，微球上的特异性抗体首先与样品（血清、血浆或细胞培养液）中的相应抗原或蛋白结合，之后与荧光标记的检测抗体形成“三明治”夹心复合物。流式细胞仪对荧光进行检测，实现对样品中的各检测因子的定量分析。

ACEA NovoCyte 流式细胞仪对荧光信号检测的灵敏度高，并且在同时区分多种颜色荧光及不同级别的荧光强度上具有显著优势。这些特性使得 NovoCyte 流式细胞仪可以轻松配合 CBA 技术对溶液体系中的可溶性蛋白进行精确定量检测。图 1 展示了不同捕获微球在 ACEA NovoCyte APC 通道都能得到很好的区分，不同浓度细胞因子在 ACEA NovoCyte PE 通道显示不同的荧光强度，

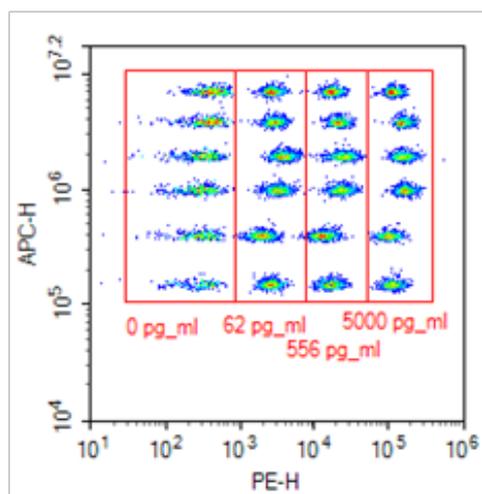
同时标准品的浓度依赖性曲线拟合判定系数 R² 均接近 1。

依鲁替尼 (Ibrutinib) 是一个高选择性的 Brutons tyrosine kinase (BTK) 抑制剂，Ibrutinib 通过与靶蛋白 Btk 活性位点半胱氨酸残基 (Cys-481) 选择性地共价结合，不可逆性地抑制 BTK，并有效地作用于多种免疫细胞，抑制细胞因子的分泌。Ibrutinib 主要用于治疗一种罕见的侵袭性血癌——套细胞淋巴瘤。本应用资料使用 ACEA NovoCyte 流式细胞仪结合 CBA 技术检测 Ibrutinib 对细胞因子分泌的抑制作用。单核细胞由磁珠分选获得，体外 IgG 刺激细胞活化的同时加入不同浓度的 Ibrutinib 进行处理，18 小时后取细胞培养上清，用 CBA Human Inflammatory Cytokines Kit (BD, Cat No. 551811) 处理样本及标准品，在 NovoCyte 流式细胞仪上检测。使用 FCAP Array V3.0 软件对导出的 FCS 文件进行数据分析，获得对照及 Ibrutinib 处理后细胞培养上清中 IL-8、IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF、IL-12p70 等细胞因子的浓度。结果显示，Ibrutinib 有效地抑制原代单核细胞分泌 IL-8、IL-6 及 TNF- α ，对三种细胞因子的抑制 IC₅₀ 值分别为 2.5 μ M、0.28nM 及 0.69nM (图 2)。

A



B



ACEA NovoCyte 流式细胞仪应用资料

—CBA 技术检测



C

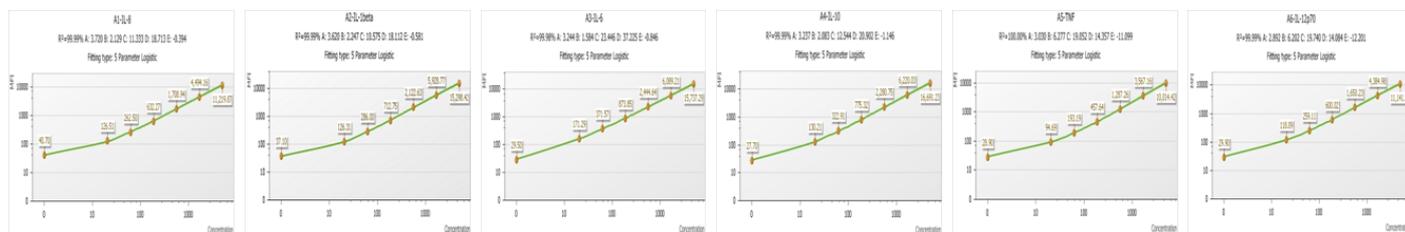
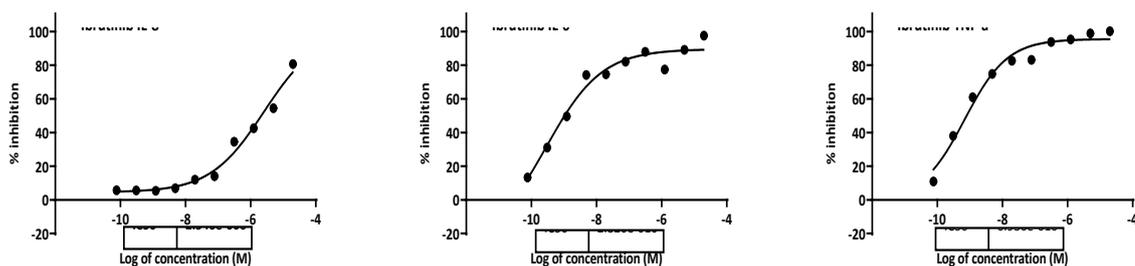


图1. ACEA NovoCyte 流式细胞仪检测 CBA 标准品。A. 包被不同捕获抗体的微球在 APC 通道 (Ex 640nm / Em 675nm) 的直方图, 从右到左 6 个峰依次为包被 IL-8、IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF、IL-12p70 捕获抗体的微球。B. 梯度稀释的标准品在 PE 通道呈现梯度荧光强度, 对应梯度细胞因子浓度。C. FACS Array V3.0 软件分析 ACEA NovoCyte 流式细胞仪检测梯度稀释的标准品数据, 得到各个细胞因子的标准曲线。

A



B

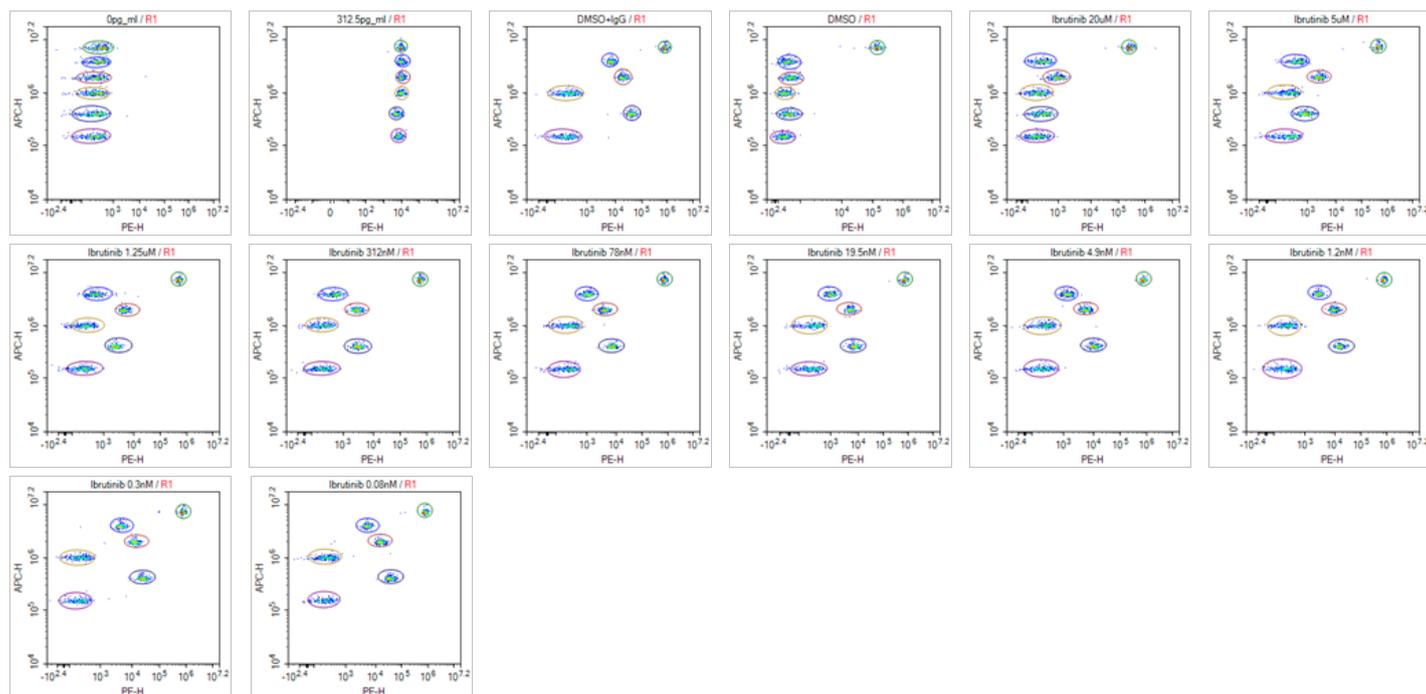


图2. Ibrutinib 有效地抑制原代单核细胞分泌 IL-8、IL-6 及 TNF- α 。A. Ibrutinib 抑制 IL-8、IL-6 及 TNF- α 的浓度依赖性曲线。Ibrutinib 抑制 IL-8、IL-6 及 TNF- α 的 IC₅₀ 值分别为 2.5 μ M, 0.28nM 及 0.69nM。B. 不同浓度 Ibrutinib 作用下的细胞因子含量检测流式 CBA 图谱。

