

使用信号增强剂改善抗体在 MILO 上的表现



MILO 进行单细胞 WESTERN 分析

作为全球首台 **单细胞 Western** 平台, **Milo** 每次可对 ~1000 单细胞进行蛋白靶点的免疫检测, 为蛋白水平的种群异质性提供无与伦比的新视界¹。事实上, **Milo** 的数据频繁出现在某些世界顶级期刊上, 包括 *Nature* 和 *Science*²。作为一个开放平台, **Milo** 不局限于特定抗体。在 **Simple Western** 和传统 **Western** 上验证过的抗体多数适用于 **Milo** (验证过的抗体列表参见 **Milo** 抗体数据库), 但也有少数抗体信号弱或没信号。为了提高这些抗体的信号, 在紫外捕获前用 0.25 M 甘氨酸-盐酸溶液 (信号增强剂) 置换 **Lysis/Run buffer**, 可能有助于增强信号, 甚至于检测到默认条件检测不到的信号。本文将向您展示在 **Milo** 上如何使用信号增强剂优化某些弱信号的抗体。

材料和方法

升级 MILO 控制软件

使用信号增强剂前, 需要升级 **Milo** 控制软件——用于控制加载芯片的裂解、电泳和紫外捕获。该软件版本升级到 2.3.0 (Beta) 后能够支持编程多达 4 个自定义脚本, 方便在紫外捕获前置换 **Lysis/Run Buffer**。

以下是升级 **Milo** 控制软件的步骤。

1. 从网站: <https://www.proteinsimple.com/scout/downloads/> 下载安装指南和 **Milo** 控制软件, 并拷贝到 U 盘上
2. 将 U 盘插入 **Milo** 右后方的插槽内。
3. 遵照安装提示操作。
4. 在安装完成后, 重启 **Milo**。
5. 确认软件版本号是 2.3.0。

| 名称 | 供应商 | 货号 |
|--|---------------------------|------------|
| 10 ⁶ /mL NALM Cells (included in the Milo Training Kit) | ProteinSimple | 035-119 |
| scWest Kit | ProteinSimple | K600 |
| Milk-Free Antibody Diluent | ProteinSimple | 043-524 |
| Glycine-HCl | Sigma-Aldrich | G2879-500G |
| Rabbit anti-β-Actin Antibody | Cell Signaling Technology | 8457 |
| Mouse anti-β-Actin Antibody | Cell Signaling Technology | 3700 |
| Rabbit anti-β-Actin Antibody | Cell Signaling Technology | 4970 |
| Mouse anti-β-Tubulin Antibody | Genscript | A01717 |
| Rabbit anti-β-Tubulin Antibody | Novus Biologicals | NB600-936 |
| Goat anti-GAPDH Antibody | Novus Biologicals | NB300-320 |
| Rabbit anti-AKT1 Antibody | Cell Signaling Technology | 2938S |
| Donkey anti-Goat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 | Thermo Fisher Scientific | A-11055 |
| Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 555 | Thermo Fisher Scientific | A-31572 |
| Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647 | Thermo Fisher Scientific | A-31571 |

表 1. 本研究所用试剂。所有一抗用 Milk-Free Antibody Diluent 1:10 稀释。所有二抗用 Milk-Free Antibody Diluent 1:20 稀释。

本研究所用试剂见 表 1 所示。

配制信号增强剂

以去离子水溶解甘氨酸-盐酸至终浓度 0.25 M，配制成信号增强剂，pH 应该在 2 左右。信号增强剂可以室温稳定保存两周。每张 Milo 芯片需要 15 mL 试剂。

Milo 控制软件使用信号增强剂的编程

Milo 全新控制软件让用户可以创建多达 4 个脚本，自定义裂解、电泳和紫外捕获参数。使用信号增强剂需要创建两个脚本，一个仅用于执行裂解和电泳，另一个仅用于执行紫外捕获。这样方便在电泳和紫外捕获之间置换溶液。以下示例将介绍如何操作，但具体参数（如裂解和电泳时间）可能根据细胞类型和靶点而有所不同。

- 如 图 1 所示，在 Milo 上创建两个脚本，一个仅用于裂解/电泳，另一个仅用于紫外捕获。
 - 选中 **Setup** (设置) 选项，输入合适的 **Lysis** (裂解) 和 **Electrophoresis** (电泳) 参数，**UV Capture** (紫外捕获) 设为 “0 s”。
 - 按下 **Scripts** (脚本) 选项，然后按下 **Populate 1** 保存裂解/电泳程序。
 - 选中 **Setup** 选项，**Lysis** (裂解) 和 **Electrophoresis** (电泳) 设为 “0 s”，**UV Capture** (紫外捕获) 设为 “240 s”。电泳电压可以保留 “240 V” 不变。
 - 随后再次选中 **Scripts** (脚本) 选项，按下 **Populate 2** 保存紫外捕获程序。

- 如果您想运行新程序，请在 **Scripts** 选项中按下 **Disabled** 按钮，它将会变成 **Enabled**，并且 **Run** 设置上方会出现 4 个按钮（图 1）。
- 如果您想运行保存的程序，请按下对应数字的按钮来加载保存的程序。图 1 展示的是按下 1 后的程序设置。
- 请遵照标准流程准备芯片，并在芯片上沉降细胞。具体方法请参考 *product insert of the scWest Kit*。
- 按下 1 加载裂解/电泳程序。然后，将芯片放入 Milo， 并加入 Lysis/Run Buffer，快速盖上盖子并按下 Run。
- 分离结束后，打开 Milo，取出带有芯片的电泳槽，小心将 Lysis/Run Buffer 倒入废液中。芯片因为表面张力将保留在电泳槽内。
- 将电泳槽放回 Milo 中，加入 15 mL 信号增强剂并关闭盖子。然后，按下 2 并按下 Run 运行紫外捕获程序。
- 紫外捕获结束后，按照标准程序进行芯片清洗和免疫杂交。

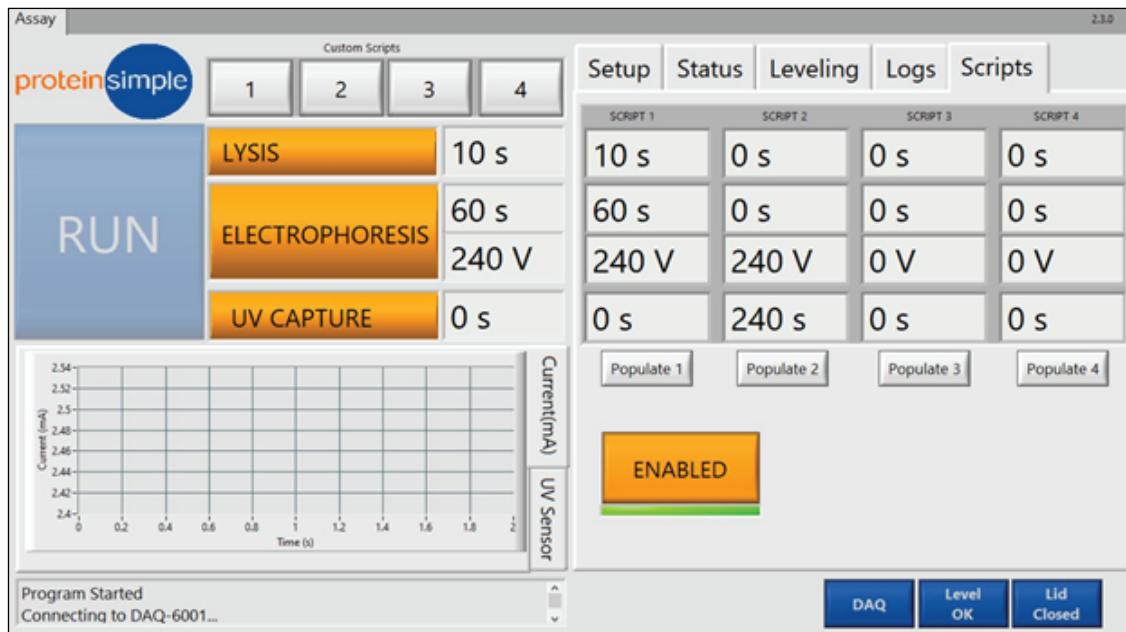


图 1. Milo 全新控制软件让用户可以创建多达 4 个自定义脚本。在裂解和电泳之后，紫外捕获之前加入信号增强剂。图中显示的脚本 1 和 2 可以串联使用，以便于在电泳和裂解之后，紫外捕获之前进行溶液置换。

测试信号增强剂

Cell Signaling Technology 公司的 β -Actin 抗体（货号 8457）是一个在其他应用（包括 Western blot, 免疫荧光和流式细胞术）中被验证过的抗体，但是在 Milo 的默认实验条件下无法检出。按照上述材料和方法，在紫外捕获前加入信号增强剂，可以在 ScoutTM 软件中检出较强信号（图 2）。这是一个在默认条件下未检出，但用信号增强剂检出信号的好示例。需要指出的是，并不是所有抗体都一定符合这个规律。

某些抗体在 Milo 上有信号，但是信号弱或弥散，这让 Scout 软件数据分析很困难。发生这种情况时，信号增强剂可以增强抗体信号，示例是来自 Cell Signaling Technology 公司的另一个 β -Actin 抗体（货号 3700）（图 3）。需要指出的是，并不是所有抗体都一定符合这个规律。

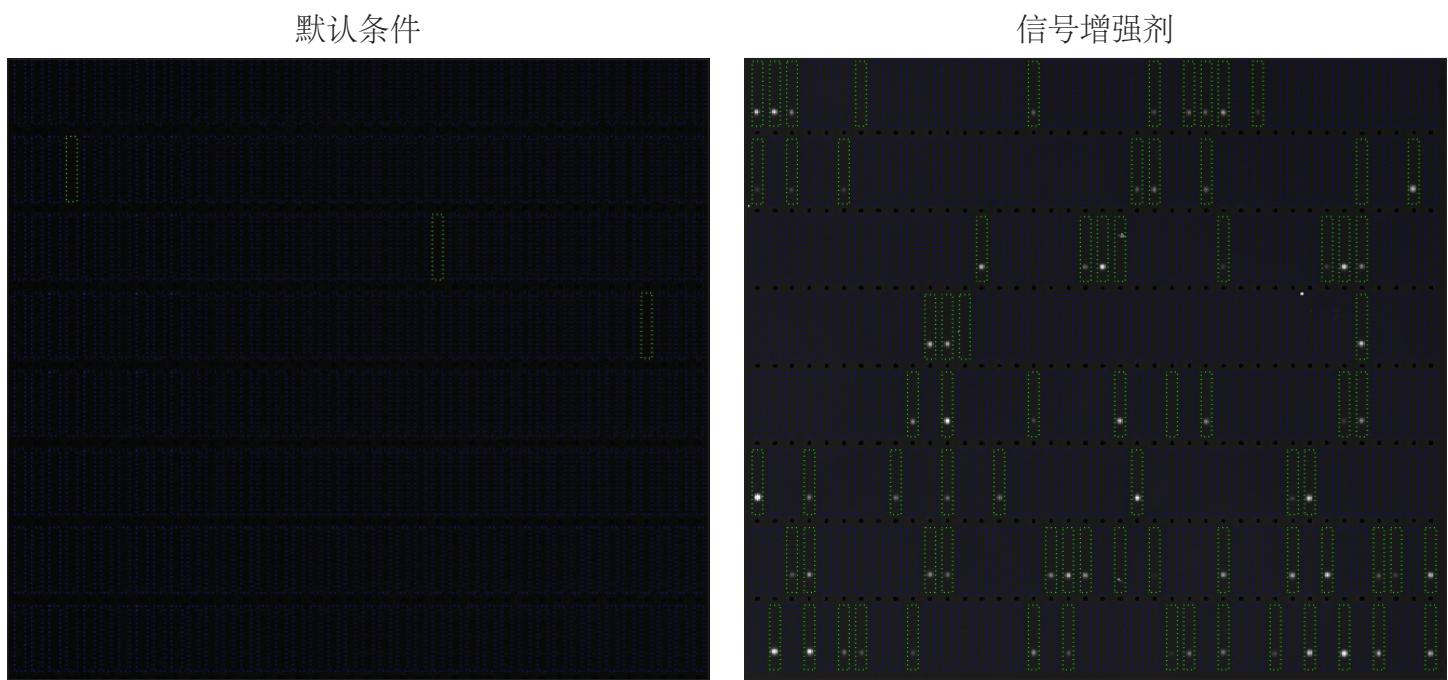


图 2. β -Actin 抗体 (Cell Signaling Technology, 货号 8457) 在默认条件下没有信号 (左)。同一个抗体使用信号增强剂后检出信号 (右)。左图 Scout 软件图像对比度 0 - 65494, 右图对比度 41 - 65535。

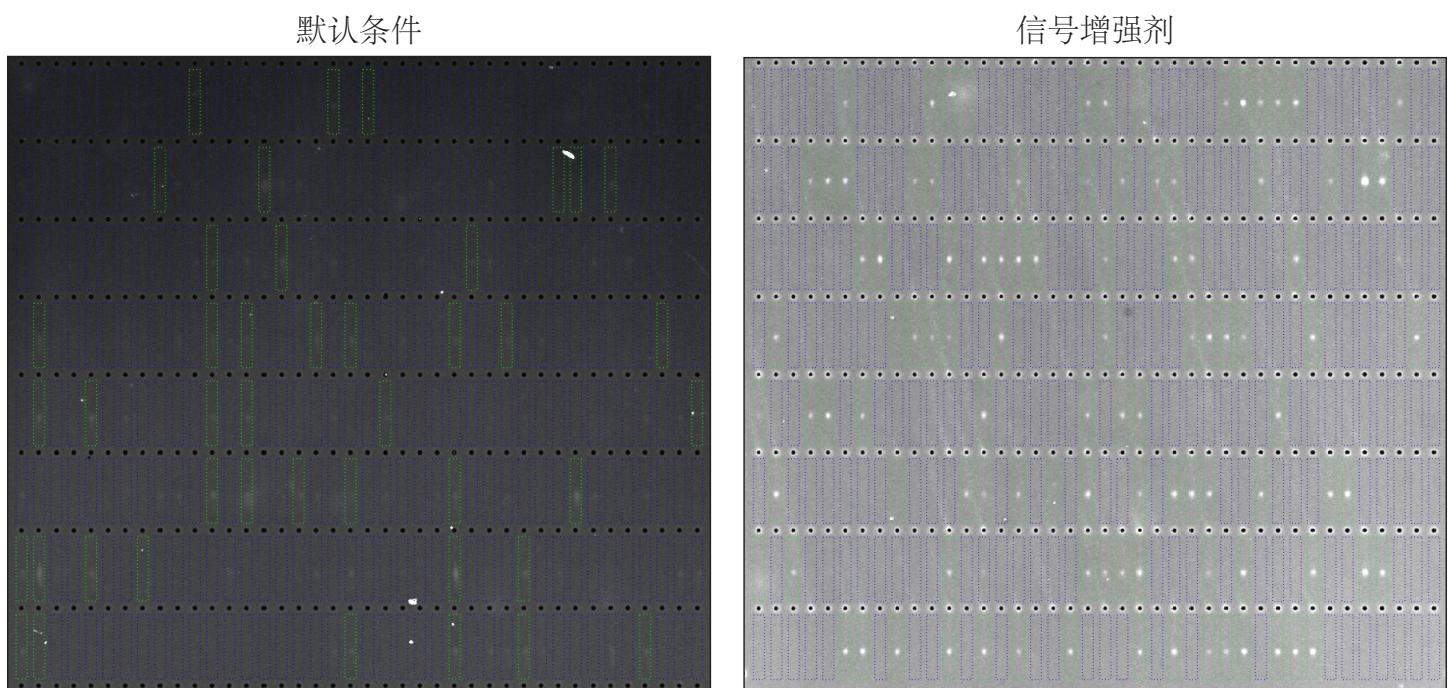


图 3. β -Actin 抗体 (Cell Signaling Technology, 货号 3700) 使用信号增强剂后 (右) , 信号比默认条件 (左) 明显增强。左图 Scout 软件图像对比度 12 - 10742, 右图对比度 133 - 10863。

最后，我们比较了 7 个抗体在默认实验条件和使用信号增强剂条件下的峰面积、信噪比 (SNR) 和背景 (图 4)。图 2 中使用信号增强剂后， β -Actin 3 (Cell Signaling 货号 8457) 得到的峰面积和 SNR 都非常清晰，而使用默认实验条件则看不到任何峰 (图 4)。 β -Actin 2 (Cell Signaling 货号 4970) 在默认实验条件下，即便芯片上可以看到很弱的峰，但 Scout 软件在 SNR 阈值默认为 3 的设置下检测不到条带。而使用信号增强剂后，这些弱峰在芯片上变得更清晰，也更容易被 Scout 软件通过峰面积和 SNR 检测到 (图 4)。对于其他测试的抗体，对比默认实验条件，使用信号增强剂后峰面积和 SNR 都有改善 (图 4)。

因为含有 ~1000 或更多细胞的样本可能存在高度生物学差异，代表标准差的误差线较宽，在有些情况下两种实验条件存在重合，但是峰面积和 SNR 的平均值，使用信号增强剂组是稳定高于使用默认实验条件组的。对于测试的全部 7 个抗体，相较于默认实验条件，使用信号增强剂后峰面积和 SNR 的增加倍数如表 2 所示。增加倍数为 ∞ 的抗体表示使用默认实验条件 Scout 软件阈值默认为 3 的设置下检不出信号。信号增强剂和默认条件的背景差异和抗体有关，信号增强剂并不一定会增强背景信号 (图 4)。

| 靶点 | 抗体供应商 | 货号 | 峰面积增加倍数 | SNR 增加倍数 |
|--------------------|---------------------------|-----------|----------|----------|
| GAPDH | Novus Biologicals | NB300-320 | 15.37 | 11.39 |
| β -Tubulin 1 | Genscript | A01717 | 8.83 | 4.66 |
| β -Tubulin 2 | Novus Biologicals | NB600-936 | 1.65 | 3.83 |
| β -Actin 1 | Cell Signaling Technology | 3700 | 3.09 | 2.41 |
| β -Actin 2 | Cell Signaling Technology | 4970 | ∞ | ∞ |
| β -Actin 3 | Cell Signaling Technology | 8457 | ∞ | ∞ |
| AKT1 | Cell Signaling Technology | 2938S | 1.98 | 1.48 |

表 2. 使用信号增强剂后峰面积和 SNR 增加倍数。 β -Actin 2 在默认实验条件下，当 Scout 软件 SNR 阈值默认为 3 时，软件测不到清晰的峰。但是，可以在芯片上看见弱峰信号 (SNR 值低于 3)。

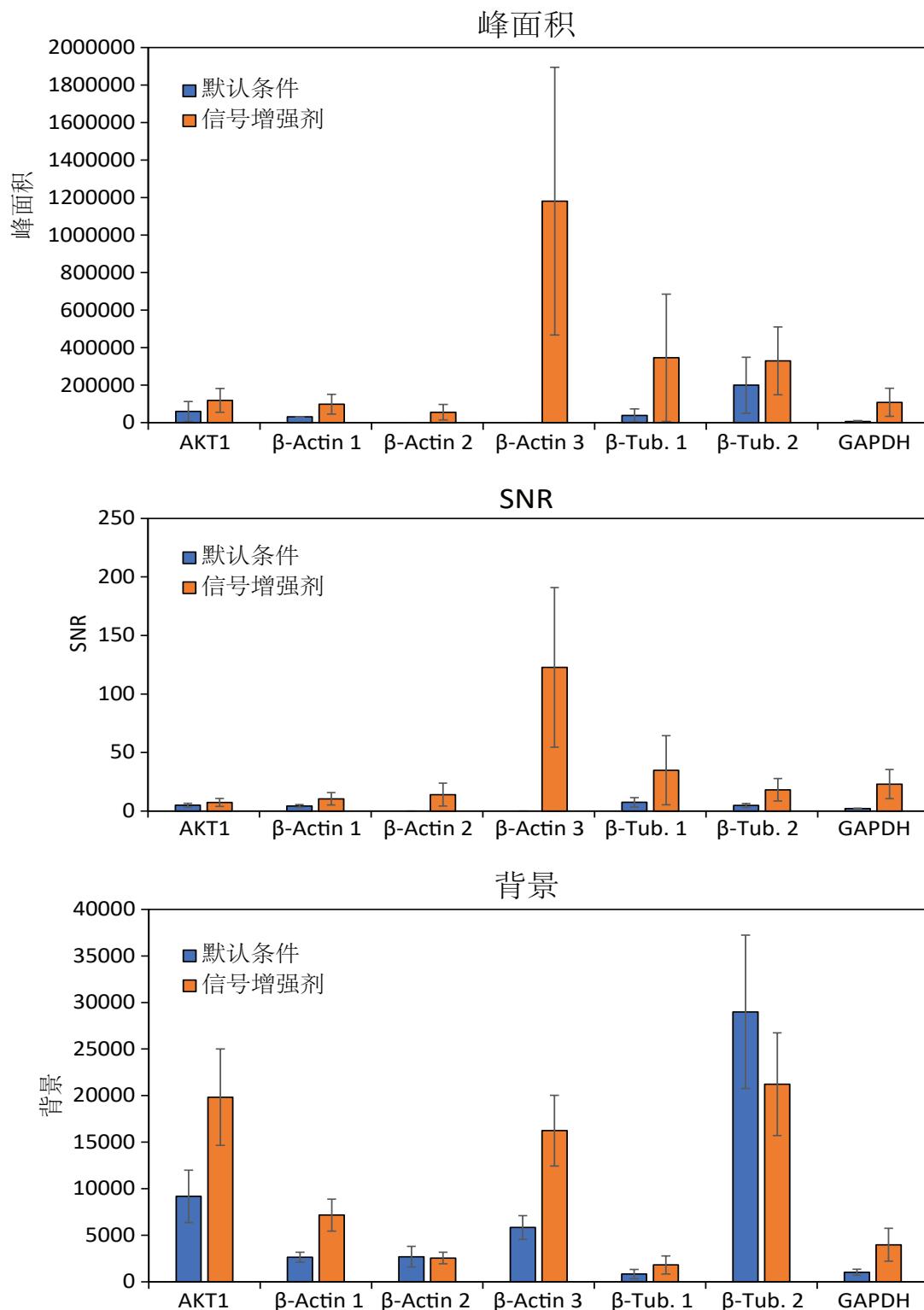


图 4. 使用默认实验条件和信号增强剂后峰面积、SNR 和背景的对比。β-Actin 1, β-Actin 2 和 β-Actin 3 分别对应 Cell Signaling Technology 货号 3700, 4970 和 8457。β-Tubulin 1 和 β-Tubulin 2 分别对应 Genscript 货号 A01717 和 Novus Biologicals 货号 NB600-936。默认实验条件下 β-Actin 2 在 Scout 软件 SNR 阈值默认为 3 的设置下检测不到条带。然而芯片上可以看到弱信号。误差线代表平均值的标准差。

增加发现可用抗体的概率

Simple Western 和传统 Western blots 适用的抗体多数也适用于 Milo。当您想检测一个新靶点时，可以参考 [Milo Antibody Database](#) 来确定之前是否该靶点有在 Milo 上验证过的抗体，从而节省您筛选新抗体的时间和精力。抗体数据库里未列出的抗体也可能适用于 Milo，但有时其他应用如流式细胞术或传统 Western blot 验证过的抗体，在 Milo 上可能信号弱或没信号。本文提供的在紫外捕获前用信号增强剂置换 Lysis/Run Buffer 的方法旨在帮助您优化这部分抗体。信号增强剂可能改善甚至产生之前检测不到的信号。但需要指出的是，信号增强剂并不能改善抗体功能，只是增加了您找到可用抗体的概率。

参考文献

1. [Protein Expression Heterogeneity with Milo, the First Single-Cell Western System](#), Application Note, ProteinSimple, a Bio-Techne Brand
2. [Simple Western and Single-Cell Western are Proven Technologies](#), Publication Spotlight, ProteinSimple, a Bio-Techne Brand



[了解更多](#) | [询价](#)

WHERE SCIENCE INTERSECTS INNOVATION™

在 ProteinSimple，我们正在改变科学家分析蛋白质的方式。我们的创新产品组合有助于研究人员揭示有关蛋白质的新见解，提高他们对蛋白质功能的理解。我们使前沿研究能够揭示蛋白质在疾病中的作用，并提供新的方法来开发和分析基于蛋白质的治疗方法。我们通过消除常见的蛋白质分析工作流程挑战，助力您的下一个研究发现。

需要更多信息请联系我们：
Toll-free: 4000 863 973

info@proteinsimple.com
proteinsimple.com

bio-techne®
bio-techne.com

R&D SYSTEMS **NOVUS** **TOCRIS** **proteinSimple** **ACD** **exosomed[®]**

Global info@bio-techne.com bio-techne.com/find-us/distributors TEL +1 612 379 2956 North America TEL 800 343 7475
Europe | Middle East | Africa TEL +44 (0)1235 529449 China info.cn@bio-techne.com TEL +86 (21) 52380373

For research use or manufacturing purposes only. Trademarks and registered trademarks are the property of their respective owners.