

Single-Cell Western 如何进行洗脱重杂交

简介

细胞异质性的核心是其蛋白质表达和活性的广泛模式，从而体现了个体细胞行为和反应的多样性。了解这种可变性，对于理解人类生物学的复杂性和生物医学研究的进步至关重要



研究人员越来越需要同时获得多种蛋白质信息。细胞信号通路及对新化合物的反应通常都涉及多种关键蛋白。此外，各种疾病的诊断也取决于多种蛋白质的状态。因此，越来越需要一种高灵敏、可定量和可靠的多重 Western 系统。以整个细胞群体为基础的传统技术，会掩盖细胞亚群或罕见事件的变化，面临不足。其他单细胞技术，如流式细胞仪，只容易检测细胞表面蛋白，而细胞内蛋白或磷酸化蛋白的检测受到很大限制；另外，荧光抗体的光谱串扰使检测只能大约达到 12 重靶标。

Milo™单细胞级 Western 使您解锁单细胞蛋白质组，测量蛋白质表达异质性的变化，这是其他技术无法实现的。本技术说明将引导您完成 Milo 的多重检测，为您提供有效剥离的证据和指导，以实现与最强大的流式细胞仪相匹配甚至超越的多重检测能力。

认识 Milo

Milo 为世界首款单细胞 Western 平台。使用细胞大小微孔的 scWest 芯片，可在一次运行中同时执行 1,000 个细胞的 Western 实验。研究人员现在可以同时获得每个细胞中多个靶标的蛋白质表达信息，而不必担心靶点在细胞中的分布。只需将细胞悬浮液加载到芯片上，裂解捕获的细胞，Milo 将对每个单细胞裂解液进行大约 1 分钟、基于分子大小的 SDS-PAGE 分离。接下来，您可使用最喜欢的市售抗体进行检测。

然后使用能够扫描标准玻片的任何扫描仪扫描芯片。最后，Scout™软件会分析您的数据，并创建荧光强度图，显示每种目标蛋白的定量峰。

Milo 多重检测

Milo 基于不同光谱或分子量大小来实现多重检测，一种抗体混合物可被剥离后再杂交另一组抗体。

基于光谱的多重检测依赖于不同种属来源的一抗，然后将一抗与对应种属来源的荧光二抗相匹配即可。例如，通过分别使用驴抗小鼠 Cy3 和驴抗兔 Cy5，可以对小鼠和兔一抗针对的两个靶点进行光谱区分。

基于分子量的多重检测，需要两个靶点分子量相差 30% 以上，以便通过 SDS-PAGE 充分分离。由于分子间有足够的间隙，因此可使用同种属来源的一抗及同种颜色荧光二抗。



Figure 1 显示了基于光谱颜色和分子大小的多重检测策略，实现了单个细胞检测四种蛋白质。分子量接近的蛋白用不同颜色通道进行区分，(如 ERK 和 β -tubulin)，而 β -tubulin 与 L858R 基于分子量差异来区别。

为使 Milo 多重检测性能最大化，您需要洗脱掉上一轮抗体混合物，以便重新杂交新的目标蛋白。其中，洗脱效率是成功的关键。在这里，我们展示了如何使用基础配置双色扫描仪，多次洗脱杂交 MiloscWest 芯片进行多达 10 重至 12 重单细胞 Western 分析，足以媲美高端流式。如使用三色或四色扫描仪，将达到更高的多重检测水平。

使用 Jurkat 细胞，我们用 AML1 兔单克隆抗体（Cell Signaling Technology, PN 4336）进行了五轮洗脱重杂交，然后反复检测 AML1 的表达水平。为计算洗脱效率，使用 Scout 软件分析了洗脱后和洗脱前的信号比例。再用 100% 减去此数值即为洗脱效率。针对 AML1，五轮洗脱的平均洗脱效率为 $98\% \pm 1\%$ ，重杂交效率为 $96\% \pm 16\%$ (Table 1)。在另一组实验中，我们独立测试了一下

鼠单抗 β -tubulin (GenScript, PN A01717)。结果，其平均洗脱效率可达 $99\% \pm 1.1\%$ (Table 2)。 β -tubulin 的前三轮平均重杂交效率为 $84\% \pm 19\%$ ，而在第四轮时有所下降 (Table 2)。两个靶点的洗脱效率保持不变。AML1 没有表现出重杂交变化趋势，而 β -tubulin 在最末轮循环中显示出重杂交效率的下降。

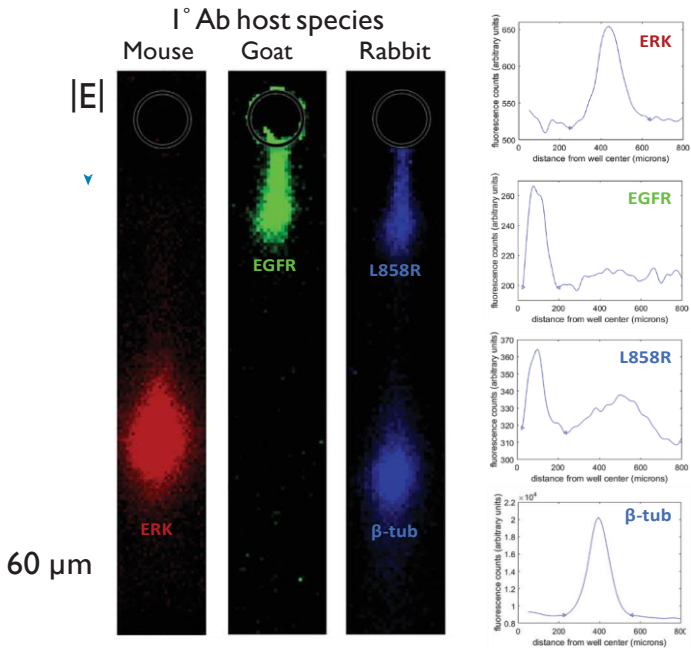


Figure1.单细胞Western 进行多重检测。一个细胞中同时检测了四种蛋白。两种不同的荧光通道用来检测鼠抗 ERK 和羊抗 EGFR，而兔抗 β -tubulin 和兔抗 L858R 通过分子量差异进行同时检测。

AML1	MeDiAN STriPPiNg eFFeCiNCY (%)	MeDiAN rePrOBiNg eFFeCiNCY (%)
Cycle 1	98.5	98.8
Cycle 2	98.8	82.0
Cycle 3	98.4	112.1
Cycle 4	97.9	82.1
Cycle 5	97.2	98.0
Average	98.1	95.7

TABLE 1. AML1 五轮洗脱重杂交效率

β -TuBuLiN	MeDiAN STriPPiNg eFFeCiNCY (%)	MeDiAN rePrOBiNg eFFeCiNCY (%)
Cycle 1	99.4	103.9
Cycle 2	99.4	65.3
Cycle 3	98.9	79.3
Cycle 4	97.9	38.7
Average	99.2	70.5

TABLE 2. β -tubulin 四轮洗脱重杂交效率

洗脱与重杂交

ProteinSimple 建议在杂交扫描后尽快洗脱芯片，但您也可在洗脱前，将芯片存放在 wash buffer 中最多三天。在洗脱之前应避免干燥储存，因为这会降低洗脱效率。一旦洗脱，可立即重杂交或干燥芯片以便长期储存；重杂交之前，一定要给干燥的芯片进行水化。我们在文献中已经证明可进行多达九次的洗脱和再杂交^{1,2}。

材料方法

PrODuCT NAME	COMPANY	PArT NuMBer	DeTAiLS
scWest Kits Includes: • 10X Suspension Buffer • 5X Wash Buffer • Antibody Diluent 2 • Lysis/Run Buffer	ProteinSimple	• K500 • K600 • K700	• Small scWest kit for small cells • Standard scWest kit • Large scWest kit for large cells
5X Wash Buffer	ProteinSimple	R242	Additional wash buffer
scWest chip canisters (4 pack)	ProteinSimple	035-118	Canister for incubation with stripping buffer
Primary antibodies	Various		
Fluorescently-conjugated secondary antibodies	Various		
Trypsin or another dissociation agent	Various		
TABLE 3. Required consumables and reagents. 10-cm Petri dishes (2 per scWest chip)	Various		
Tris-HCl pH 6.8 buffer	Various		
β-mercaptoethanol (β-ME) 14.3 M	Various		
SDS	Various		
Parafilm M	Various		
Aluminum or heat-tolerant tape	Various		
Tube rack for 50-mL tubes	Various		
Heated water bath	Various		

洗脱与重杂交方法

洗脱液组份:

62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)
2% (w/v) SDS (20 g in 1 L)
0.8% (v/v) β-ME (14.3 M)

注意: 可预先制备 Tris-HCl 和 SDS 洗脱储液，但 β-ME 应现用现加。

芯片扫描后应避光保存(如果不立即洗脱，可先置于 Wash Buffer，最多可存放三天)。首先将水浴设为 60° C。内部放置一个管架，并将水位调到没过管架大约 1 厘米的位置。管架上方压上重物或用其他方式将其固定。

注意，接下来的操作均要在通风厨内进行。(如果通风厨足够大，水浴锅也可放进去)。对于每张要洗脱的 scWest 芯片，都要配备一个独立的芯片容器（PN035-118）。每张芯片需要 40 mL 洗脱液与 320 μL β-ME。将芯片插入芯片容器，倒入 40 mL 预混好的洗脱液，拧紧盖子，然后用封口膜缠绕紧密。将芯片容器放入 60° C 水浴锅管架，孵育 90 分钟。

孵育结束后，在通风厨内取出芯片，胶面朝上放入一干净的培养皿。先用 1X Wash Buffer 快速漂洗一次，然后加入 15–20 mL 1X Wash Buffer，摇床振荡洗涤 15 分钟，共四次。洗涤完成后，即可杂交新的抗体。

注意完成整个洗脱和重杂交过程，每张芯片大约需要 200 mL 1X Wash Buffer。尽管标准试剂盒内提供的 Wash Buffer 略有过量，但尚不足以洗脱试剂盒内的所有芯片。可额外订购 5X Wash Buffer (PN R252)。所有垃圾、溶液需按实验室管理规定进行处理。

利用 Scout 计算洗脱效率

对洗脱后信号进行目视检查不是解决洗脱和重杂交问题的可靠方法。由于大多数扫描仪都具有高动态范围，当在具有自动对比度调整的计算机屏幕上显示结果时，具有高达 90% 洗脱效率的数据，看起来将与其原始图像非常相似。

因此，仅通过目视检查，您可能会得出错误的结论。当大部分信号已被移除时，误认为洗脱掉的信号非常少。这种情况下，洗脱方法可能只需略微调整。

即使是具有约 99% 洗脱效率的 scWest 芯片仍然会有一些可见信号 (**Figure 2**)。需使用 Scout 定量确定洗脱是否成功 (效率 > 98%)。

使用 Scout 2.0 计算洗脱效率，请先在洗脱前分析扫描的 scWest 芯片图像。标记检测到的峰值为“剥离前”状态，例如“Target-Before”。洗脱完成后重新加载该芯片图像。为此图像创建 Peak Table 峰值表：依次从菜单中选择：Peak Table → Tag Matching Peaks / Stripping Efficiency。选择“match Target-Before”，然后建立一个新的 Tag “Target-After”，与之前的 Target-Before 进行 match。最后，执行 Perform stripping efficiency calculation。菜单命令可见 **Figure 3**。

洗脱后芯片图像上检测到的任何峰，都将被标记为“Target-After”。对于洗脱后芯片图像上找不到峰值的孔，Scout 将以洗脱前对应峰的起点和终点为积分区间，计算洗脱后此区间上方的信号值。

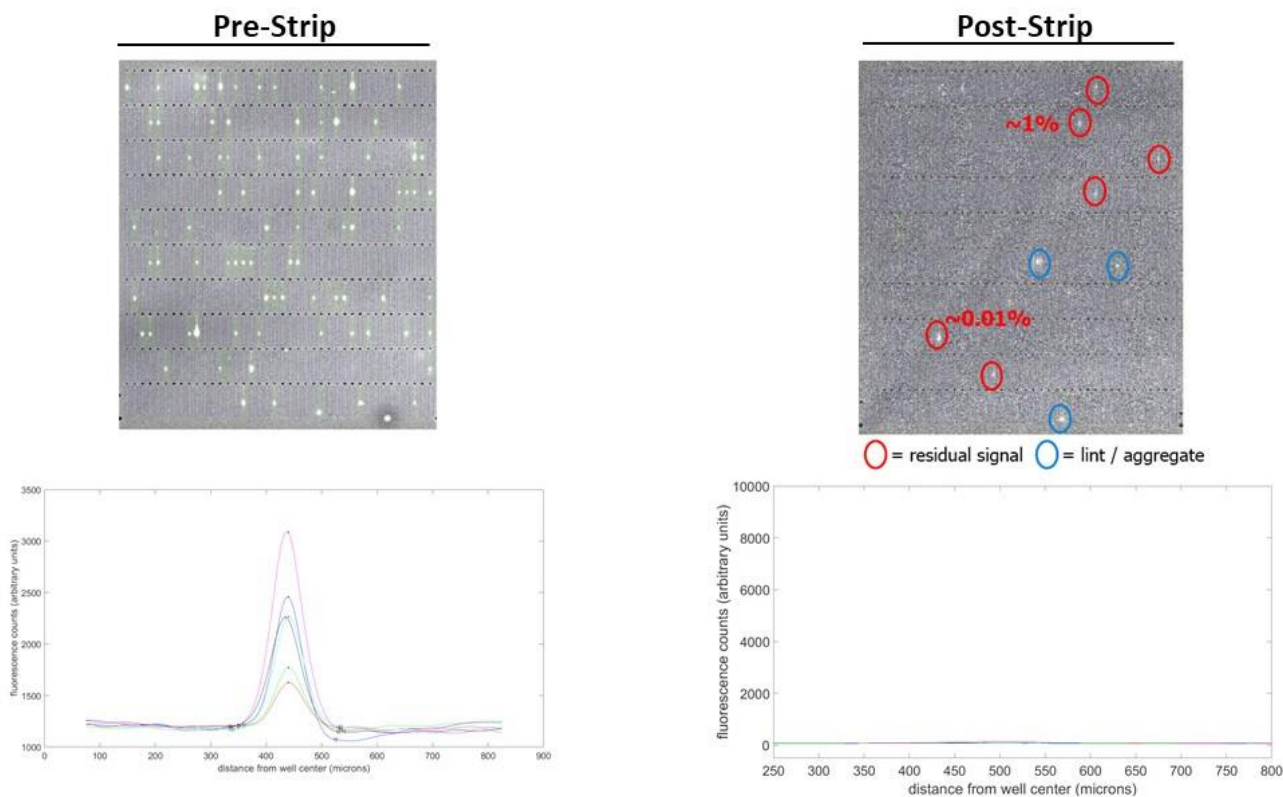


Figure 2. scWest 芯片洗脱前 (左图) 与洗脱后 (右图)。即使达到 99% 的洗脱效率，残留的信号依然是视觉可见的 (红圈)。

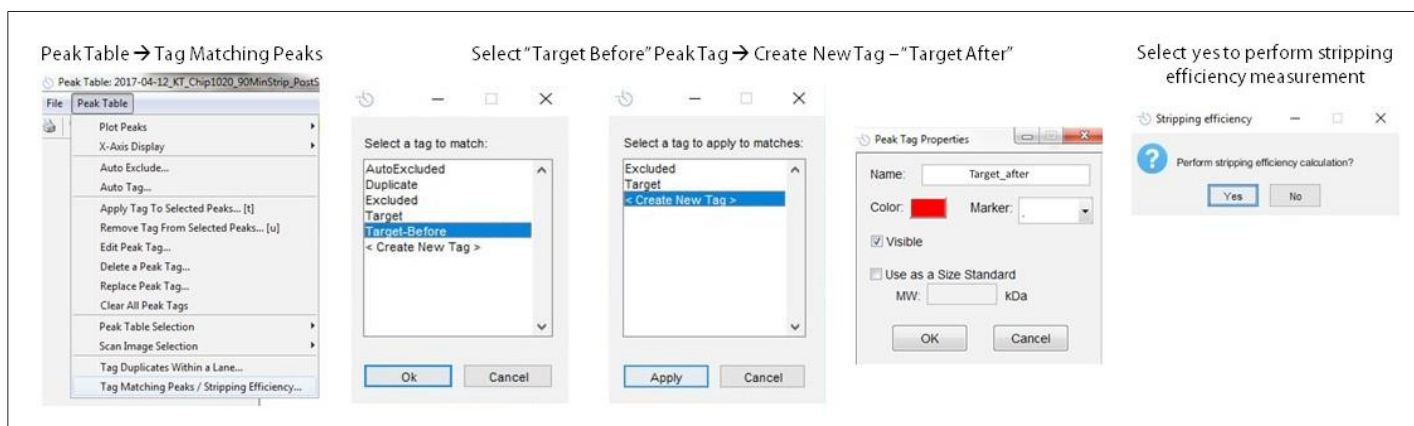


Figure 3. Scout 2.0 软件进行洗脱效率计算的菜单路径。输出结果可参考 Figure 4。

Figure 4 显示了按 **Figure 3** 步骤所计算出的洗脱效率示例数据。由于扫描仪输出强度变化和上文所述的强制计算区域算法（当只剩下基线噪声时，可能导致小的负峰面积），所看到的洗脱效率分布，其中有一些会略高于 100%。

方法开发：策略与建议

多重检测可以为您提供从每份样本中获取最多数据点所需的灵活性。基于光谱和分子量，Milo 每次能实现能实现大约四种不同蛋白质的检测。

打算进行洗脱与重杂交时，我们建议第一次最多检测两个靶点，扫描成像后利用 ProteinSimple 公司的 Scout 软件计算每个靶点的洗脱效率。

在设计最终的多重检测方案时，要注意以下几点：靶点丰度和抗体洗脱效率。洗脱效率与抗体对目标的亲和力有关-低亲和力抗体将具有高洗脱效率，反之亦然。如果靶点丰度和抗体亲和力对于您感兴趣的目标蛋白都相同，那么检测顺序无关紧要。

然而，作为一般规则，最好按蛋白丰度递增的顺序进行检测-先检测低丰度的蛋白；由于洗脱造成的任何靶点损失，都会影响到您最大程度检测到的能力。如果您的蛋白质丰度相似，应首先用较低亲和力的抗体（更高的洗脱效率）探测，以便最小化洗脱后检测到的残留信号。

这些技巧有利于在洗脱重杂交循环中，增加检测到多种蛋白质的概率。**Table 4** 中，我们基于蛋白丰度与抗体亲和力，总结了若干洗脱与重杂交的顺序选择策略。

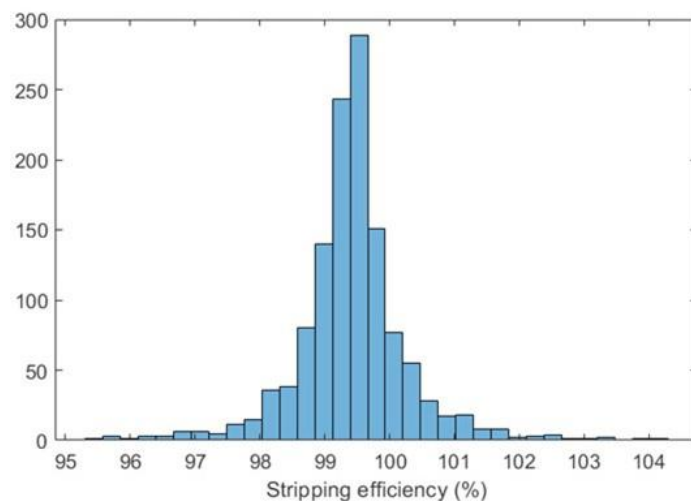


Figure 4. 洗脱效率分布。洗脱前检测到的峰信号数目=1283; 洗脱后数目=89; 强制拟合的峰数目=1194; 平均洗脱效率=99.4%; 95%的峰洗脱效率在97.1%和101.7%之间。

为了验证 AML1 和 β -tubulin 一抗和二抗在洗脱中均被有效去除，我们进行了额外的实验进行测试。在经典的基于膜的洗脱和重印迹中使用的标记二抗，经常会产生残余信号斑点。

然而，在 Milo 中不会出现此现象。**Figure 5** 中可以看到，洗脱后只杂交二抗时，信号十分干净。这表明，AML1 和 β -tubulin 的一抗、二抗在洗脱时均已被剥除干净。针对 AML1 与 β -tubulin，分别计算了一下洗脱后、洗脱并重新孵育二抗后的洗脱效率。请注意，洗脱前干燥存储 scWest 芯片，或者在洗脱缓冲液中未使用新鲜的 β -ME 时，均可能会降低洗脱效率。

利用 Milo 的多重检测性能，我们使用基本款双色扫描仪及两组抗体，展示了经一轮洗脱，共检测四种蛋白的结果。

scWest 芯片分别杂交了 AML1、 β -tubulin、Histone H3 和 ERK (p44/42 MAPK [Erk1/2])。**Figure 6** 展示了先杂交 AML1 和 β -tubulin，洗脱后再杂交 Histone H3 和 ERK 的数据。

使用 Scout，您可以更深入地了解您的多重检测数据。例如，可以揭示多少百分比的细胞共表达了各种目标蛋白。这类信息将十分有用，如可以考察细胞不同群体对药物响应的差异。

本例以 β -tubulin 和 H3 共阳性(Figure 7)的细胞为基础，考察了 AML1 和 ERK 的表达情况，从而可将这些细胞划分成四个不同的类群。

ProTeIN ABuNDANce	ANTIbody STRiPPiNg eFFiCiENcy	DeTeCTiON: CYCLe 1	DeTeCTiON: CYCLe 2
Similar	Similar	Either protein	Remaining protein
Similar	Unequal	High stripping efficiency antibody	Low stripping efficiency antibody
Unequal	Similar	Low abundance protein	High abundance protein
Unequal	Unequal	Low abundance protein	High abundance protein

TABLE 4. Milo 上洗脱与重杂交策略

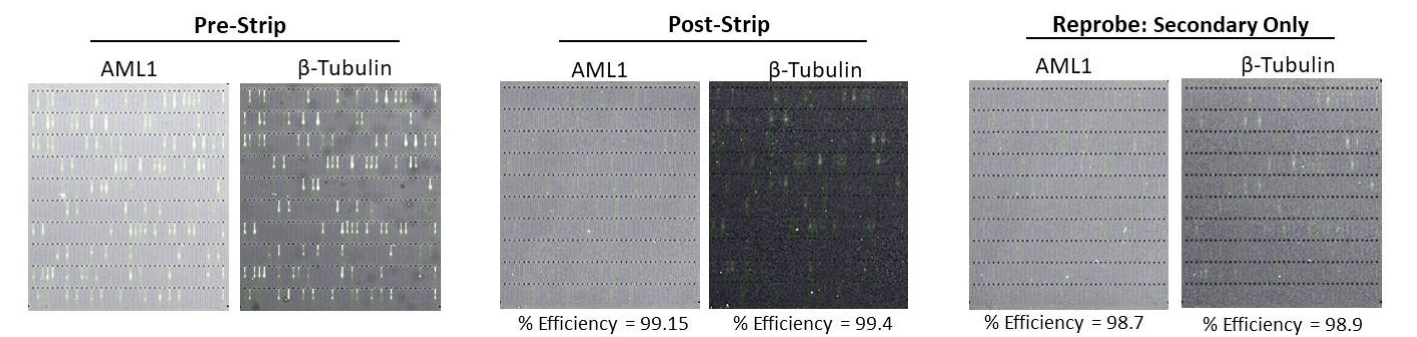


Figure 5. 洗脱前、洗脱后及洗脱后只杂交二抗的 AML1 与 β -tubulin 信号。二抗重杂交后的信号几乎可忽略不计，由此证实上一轮的一抗和二抗均已被剥离干净。AML1 的洗脱效率 = 99.15%，即使重新杂交一轮二抗，仍能达到 98.7%。 β -tubulin 的洗脱效率 = 99.4%，重新杂交一轮二抗，仍能达到 98.9%。

实验优化

虽然很多靶点均可实现有效洗脱，但不同靶点的洗脱及重杂交效率可能有所不同。如果您的靶点洗脱效率较低，则需花些时间进行实验优化。考虑的因素包括延长洗脱时间，提高水浴温度或寻找具有更高洗脱效率的其他抗体。最后，要考虑靶点的检测顺序，为得到最大的多重检测性能，洗脱效率较低的靶点，应放在最后进行杂交。

结论

无论您需要保存有限的样本，比较蛋白质异构体表达、解析蛋白磷酸化形式相对总蛋白的丰度、评估具有相似分子量的蛋白质的丰度，或者只是想用不同的抗体确认以前的结果，Milo 都是一个强大的工具，让您在单细胞级别完成所有这些工作。

猜想在进化，优先级在转换，样品很珍贵，这都使 scWest 芯片的储存再杂交特点十分有用，无论对新靶点发现还是验证性研究，均是如此。

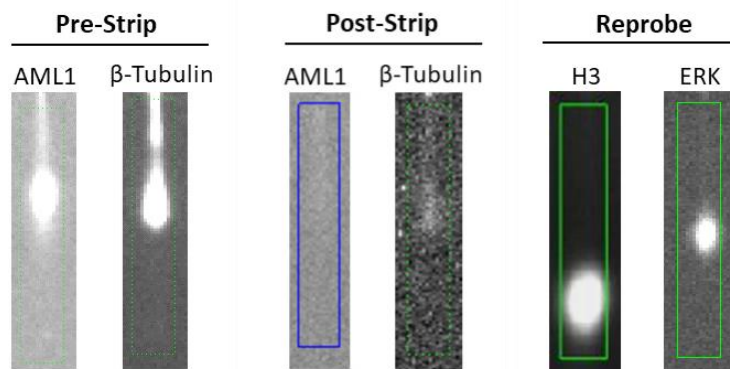


Figure 6. 利用基础二色扫描仪进行四重蛋白检测。同一个泳道中先检测了 AML1 与 β -tubulin，洗脱后进一步检测了 H3 与 ERK。

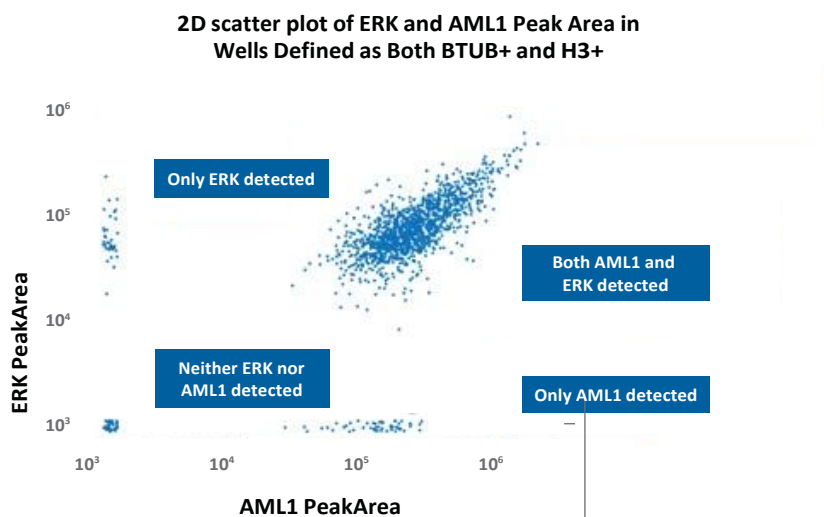


Figure 7. AML1 和 ERK 表达情况 2D 散点图。 β -tubulin 和 Histone H3 表达阳性的细胞先筛选出来，然后在这类细胞里考察 AML1 和 ERK 的表达情况。

参考文献

1. Single-cell western blotting, AJ Hughes, DP Spelke, Z Xu, C Kang, DV Schaffer, AE Herr, *Nature Methods*, 2014; **11**:749-55.
2. Single-cell resolution western blotting, C Kang, KA Yamauchi, J Vlassakis, E Sinkala, TA Duncombe, AE Herr, *Nature Protocols*, 2016; **11**:1508-1530.