

# CBA flexset assay protocol

2022-05-31 권정원 작성

## Materials

1. BD CBA flexset (capture, standard, detection) + assay diluent buffer, PE detection reagent, wash buffer, setup bead (A1, A9, F1, F9, PE-F1) (이건 따로 사야함)
2. Sample
3. 96-well V bottom
4. FACS tube
5. 분석 동글이 (나이랑 교수님이 가지고 있음)

## Methods

1. 내가 보고자 하는 모든 사이토카인의 standard beads (한 vial에 하나씩 들어있음) 를 tube 에 옮긴 후 4ml 의 assay diluent buffer를 넣고 15분간 RT에 둔다.
2. Standard를 dilution 할 tube를 준비하여 assay diluent를 500ul씩 넣어둔다.
3. blank, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, top (원액)으로 serial dilution 한다.
4. Capture bead의 양을 계산하여 준비한다. (샘플은 total 50ul가 필요한데, 50x니까 샘플 당 1ul 필요, 하지만 아까워서 30개 샘플 기준으로 20-23ul 정도씩 씬)  
총 bead volume: (standard 10개 + 샘플수) x 50ul
5. Flex volume (5X): 샘플당 1ul씩 사용 (하지만 우리는 더 적게 사용)  
각 Flex bead volume: (standard 10개 + 샘플수) x 1ul
6. Diluent volume: 총 bead volume - (각 Flex bead volume x Flexset 개수)  
Ex) (35 test x 50ul) - (35 test x 5) = 1750 - 175 = 1575 ul diluent buffer 필요, 하나의 tube에 mixture 로 준비한다.
7. PE detection reagent를 동일한 과정으로 준비한다.
8. 준비한 mixed capture beads를 50ul씩 assay tube (96 well v bottom) 에 넣는다.
9. Dilution한 standard와 sample을 50ul씩 assay tube (96 well v bottom) 에 넣는다.

10. 1시간 RT incubation
11. PE-detection reagent 를 50ul 씩 넣고 잘 섞어준 후 2시간 RT incubation
12. 1ml의 wash buffer를 넣은 후 2000rpm, 5분 centrifuge.
13. 상층액을 제거하고 300ul 의 wash buffer 를 넣는 FACS tube에 가져간다.
14. Set up bead 에서 각각 25ul를 따서 wash buffer 200ul 넣어서 FACS에 가져간다.

FACS (LSRII 장비 사용, 아무거나 상관없음)

1. Set up bead로 장비 세팅
2. 각 bead 당 300 event 씩 recording

Set up 과정

1. Tube 5개 준비: A1, A9, F1, F9, PE-F1
2. Parameter 지정(Log): FSC-A, FSC-W, SSC-A, SSC-W, PE-A, APC-A, APC-Cy7
3. Plot: FSC-A/SSC-A, APC-APC-Cy7, PE histogram
4. Event to display: 500 events
5. A9 tube 로 setting: FSC/SSC mean값을 30,000으로 설정 → voltage 조정 (FSC 200, SSC 200, PE 450, Apc-cy7 380, APC 400으로 함) → Dot plot이 점으로 한군데 모이게 조정 후 beads gating (P1) → Stat view 에서 모든 형광 mean 값 보이게 한 후 mean 값을 160,000으로 설정
6. PE-F1 tube: PE mean 값을 65정도로 설정
7. Compensation 진행: F1(unstained), F9 (APC), A1(APC-Cy7)