

流式细胞仪分析 T 淋巴细胞亚群

张鲁榕 孔宪涛 张 浩 葛依工 马 健

(第二军医大学附属长征医院, 上海)

龙振洲 马树俊 田渭涛

(北京医科大学微生物与免疫学教研室)

提 要

用 EPICS C 型流式细胞仪分析微量全血法染色的 T 淋巴细胞亚群, 关键是分辨、抓准淋巴细胞群; 用 Bitmap 划好分析区; 用阴性对照组调好 LGFL 的 PMT 和 Gain 后, 应相对固定之, 保证分析条件相一致; 选好荧光二抗; 尽早分析样品。

T 淋巴细胞亚群在机体细胞免疫的调控和效应中起主导作用, 检测 T 细胞亚群已成为基础和临床研究中观察免疫状态的重要指标。近年, 国外趋于用流式细胞仪代替荧光显微镜检测 T 细胞亚群。我们使用流式细胞仪分析 T 细胞亚群已近二年。现将分析要点介绍如下:

材 料 与 方 法

一、材料

1. 样品 肝素抗凝全血 0.4 ml, 在对照管、OKT₃、OKT₄、OKT₈ 管中各加 0.1 ml。

2. 试剂 OKT McAb (北京医科大学微生物与免疫学教研室提供)、FITC-羊抗小鼠 IgG (自制)、小鼠 IgG (自制)、细胞洗液 (NaCl 8.47g、K₂PO₄ 4.11g、KH₂PO₄ 1.36g、NaN₃ 0.1 g、小牛血清 20 ml, 加蒸馏水至 1000 ml)、红细胞溶解液 (KHCO₃ 1.0g、NH₄Cl 8.3g、EDTA-Na₂ 37 mg, 加蒸馏水至 1000 ml)、固定液 (25% 戊二醛 3.2 ml、葡萄糖 2.0 g, 加无血清细胞洗液至 100 ml)。

3. 仪器 EPICS C (Electronics Program Individual Cell Sorter, Clinical type) 系美国 Coulter 电子仪器公司产品。

二、方法

1. 样品制备方法 在各实验管中加入 0.1 ml OKT McAb (1:1000 稀释), 在对照管中加入等量小鼠 IgG, 置 30℃ 45 min 后, 加入细胞洗液 3 ml, 1,000 r/min 离心 2 分钟, 洗去未结合抗体, 反复二次。摇匀管底沉淀细胞, 加入 0.1 ml FITC-羊抗小鼠 IgG, 置 30℃ 45 min。再加入红细胞溶解液 3 ml, 见红细胞悬液变为真溶液时, 立即 1000 r/min 离心 2 分钟, 弃血红蛋白上清液, 离心洗涤细胞二次, 恢复体积至 0.5 ml, 加入固定液 20 μ l, 上 EPICS C 分析。

2. EPICS C 分析测定法 细胞悬液样品经 45 μ m 尼龙膜滤入样品管。选用氩激光, 波长 488 nm, 功率 250 mW。测定前, 用荧光小球 (beads) 校正仪器至前向散光 (FLS) 和绿色荧光 (GFL) 的 CV% 均在 3% 以下。冲洗样品管道后, 输入样品, 调节样品液与鞘液之间压力差为 5—10 Psi (随细胞浓度而定), 使细胞样品液以稳定的层流通过 76 μ m 喷嘴, 与高度聚焦的激光束垂直交汇。接收每个细胞与激光相遇后产生的二种散射光 (FLS 和 90° LS) 和绿色荧光 (波长 > 515 nm, < 530 nm), 经

计算机处理,以 90° LS (90° 散射光)为横轴,FLS 为纵轴,二维图象显示细胞群分布。用 Bitmap 程序划出淋巴细胞群密集区,定为分析范围。改变接收绿色荧光的光电倍增管电压(PMT)或增益(Gain),使对照管的对数绿色荧光(LGFL)在频道(channel)60以下的细胞数占总计数细胞的97%以上,把LGFL计算区的下限游标置于频道60左右,以将对照管所示的非特异荧光的97%以上作为本底扣除。实验管的计算区为频道60—255范围,电子计算机自动计出抗体反应阳性细胞的百分率(反映淋巴细胞中该亚群的比率)、LGFL 峰值所在的频道数(反映每个细胞上抗原量的多寡)及总计细胞数。

结 果

一、 90° LS $\times$ FLS 分析血细胞群 由于红细胞及细胞碎片、淋巴细胞、单核细胞及粒细胞在细胞大小、胞内颗粒的多少等物理参量上不同,故产生不同强度的 90° LS 和 FLS,在 90° LS $\times$ FLS 的二维图象上分为四群,见图1。

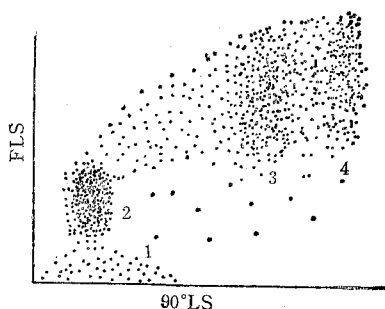
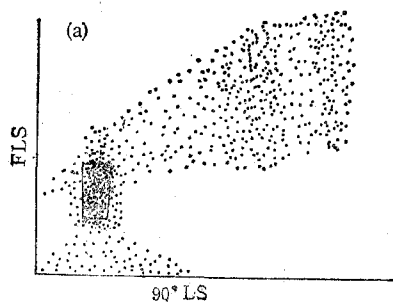


图1 在 90° LS $\times$ FLS 二维图象上全血细胞的分解

1.红细胞及碎片 2.淋巴细胞群 3.单核细胞群 4.粒细胞群

二、Bitmap 程序划定分析范围的大小对测定值的影响 同一份样品,用 Bitmap 在淋巴细胞群上划定不同大小的分析区,显示的结果不同。限于淋巴细胞密集区(图2a)时,OKT₃ 阳性细胞率为74.57%;分析区划在淋巴细胞的外缘(图2b)时,则 OKT₃ 为60.46%,二者差异显著 ($P < 0.01$)。

三、淋巴细胞不同亚群的峰值道数不一 加入过饱和量的 OKT McAb 和等量 FITC-羊抗小鼠 IgG,共育时间和洗涤条件等完全一

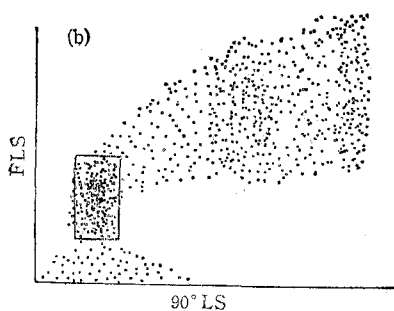
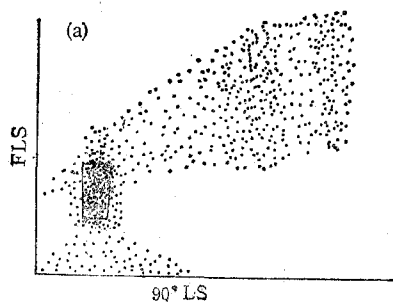


图2

(a) 分析区限于淋巴细胞密集区 (b) 分析区划在淋巴细胞群外缘

样,所得的不同 OKT 亚群的峰值道数却不一样(见图3a、b、c),OKT₃⁺ 亚群的峰值道数最高,OKT₃⁺ 亚群次之,OKT₃⁺ 亚群最低。峰值道数正比于每个受测细胞上的荧光强度,后者又反映抗原量的多少。

四、不同 FITC-羊抗小鼠 IgG 对非特异性荧光强度的影响 同一份血样品,分两管,在其它染色条件相同的情况下,各加入等量的、先后两批制备的 FITC-羊抗小鼠 IgG (荧光素

和蛋白质结合比率 F/P 分别为 5.98、2.34)。在相同的分析条件下,测得的阴性本底有所差异,落入阳性计算区的细胞率分别为1.05%、5.98% ($P < 0.05$),以 F/P 比值高的荧光二抗为优。示意见图4a、b。

五、EPICS C 的精确性和重复性 取5个样品,各测定5次(结果见表1),变异系数在0.72—3.2%,可见仪器的重复性和精确性良好。

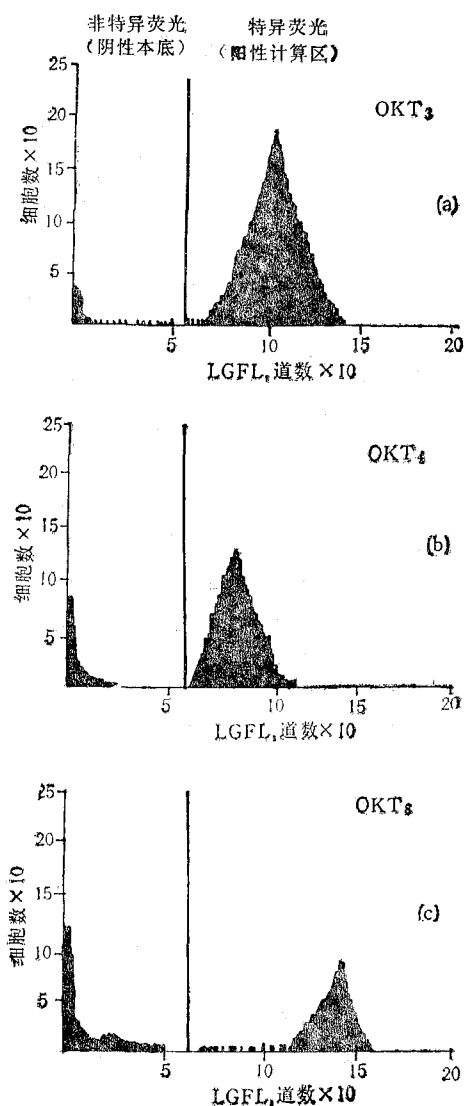


图3 不同 OKT 亚群的峰值道数不一

表1 EPICS C 的精确性和重复性试验

样品	A	B	C	D	E
测次					
1	89.88	66.11	44.81	37.93	14.15
2	89.87	66.77	46.54	36.83	14.42
3	88.78	65.31	45.34	38.93	15.04
4	89.88	67.24	45.44	37.73	14.63
5	88.58	65.77	45.14	39.03	15.33
C.V. (%)	0.72	1.11	1.4	2.4	3.2

六、样品放置时间对测试结果的影响 同一份样品于染色处理后4小时、12小时、24小时测定,所得阳性细胞百分率相似;若于48小时、72小时、96小时测定,则百分率降低、峰值

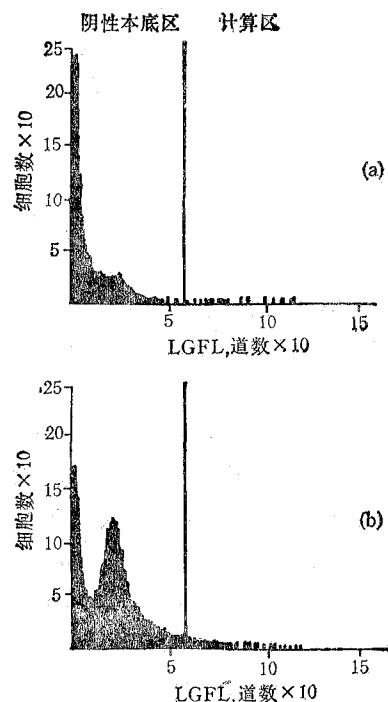


图4 不同批 FITC-羊抗小鼠 IgG 对阴性本底的影响

- (a) F/P 较高的荧光二抗,所得阴性本底较低
(b) F/P 较低的荧光二抗,所得阴性本底较高

道数左移。

讨 论

流式细胞仪技术是当代激光、流体力学、电子计算机、荧光染料、细胞生物学、分子免疫学等学科技术高度发展的产物,在分析细胞表面标志、核酸含量等方面有其独特作用。

Salzman 等^[1](1975)观察到:红细胞、淋巴细胞、单核细胞和粒细胞有不同的光散射性质,借此,可将淋巴细胞与血中其它细胞区分开。在此基础上,Hoffman 等^[2](1980)建立了T淋巴细胞亚群的全血溶解染色及使用流式细胞仪分析结果的方法。实践证明^[3-5],流式细胞仪分析全血染色的T淋巴细胞亚群具有快速、客观、不失真等优点。

使用流式细胞仪分析T淋巴细胞亚群应抓好以下要点:

1. 分辨、抓准淋巴细胞群 在90°LS×FLS二维图象上显示的细胞群的形态因病人不同而

异、因溶血程度不同而异。当淋巴细胞含量相对少,溶血不充分时,淋巴细胞群的显示区往往不清晰,难以把握是否抓准了淋巴细胞群。这时,可用两个方法帮助判断:(1)将 90° LS的PMT的高压调高,观察拟为淋巴细胞群的左侧是否还有别的细胞群,若无,则对,因为在 90° LS上,淋巴细胞处最左侧;在FLS上则在红细胞的上方。(2)试测实验组T细胞亚群,若峰形和百分率与预期的相似,则说明已抓准了淋巴细胞群。

2. 用 bitmap 划好分析区 从图2可见,分析区的大小直接影响分析结果。分析区过大,使某些单核细胞或红细胞计入总数,则阳性细胞百分率相应降低,造成伪值。Bitmap划在淋巴细胞富集区为宜。每份标本均应观察Bitmap是否合适,不合适者应重划。

3. 保证分析条件相一致 T亚群的分析是基于对细胞表面特异抗原的FITC荧光染色,在EPICS上反映为LGFL参量。设置对照组的目的是以此调出作为本底扣除的非特异荧光的强度,使之在大于频道60以上的荧光量小于5%,若大于5%,应缩小LGFL的PMT或Gain,反之,应扩大二者之一。一旦完成阴性对照组LGFL的PMT和Gain设置,则在分析各实验组时不得改动。若遇个别病例阴性

对照的LGFL在计算区中的百分率过高,可以右移该例计算区下限游标,使非特异荧光的百分率降低,在染色条件和分析条件一致时,各亚群有各自特征性峰形和峰值道数,若有变化则应视为所分析样品的固有变化,努力寻求其有值的含义。

4. 选用好荧光第二抗体 由于细胞表面有大量Fc受体,第一抗体和第二抗体的Fc段都有可能与Fc受体结合,干扰分析。选用F/P值较高的荧光二抗或 $F(ab)_2$ 段,有利于降低噪音。

5. 尽早测定标本 随着放置时间延长,膜蛋白的脱落和荧光的淬灭是不可避免的,故样品应尽早分析,最好不超过24小时,48小时后分析的结果已不太可信,72小时后的应弃去。

参 考 文 献

- [1] Salzman, G. C. et al.: *Acta Cytologica*, 1975, **19**, 374.
- [2] Hoffman, R. A. et al.: *Immunology*, 1980, **77**(8), 4914.
- [3] Renzi, P. et al.: *Immunol. Methods*, 1987, **98**, 53.
- [4] Walstra, K. et al.: *J. Immunol. Meth.*, 1985, **97**, 143.
- [5] Iwatani, Y. et al.: *J. Immunol. Meth.*, 1982, **54**, 31.

[本文于1988年2月22日收到]

经验交流

改进的凝胶脱色方法

王大坤

(南京医学院)

SDS-PAGE已成为分析蛋白质组分的一种常用方法。电泳后的凝胶需先染色显带,再行脱色处理,为促进脱色,常需多次更换脱色液。为了省去换液步骤和节省试剂,可采取下面改进的脱色方法。

方法 于脱色平皿内较均匀地撒入适量(0.5—1g)的活性炭粉末,上覆盖一层新华滤纸,在倒入70ml左右的脱色液后,即可将经自来水稍稍冲洗后的染色凝胶转入脱色平皿内,于常温或 37°C 温箱内脱色,在脱色过程中可偶尔摇动一下脱色平皿。

结果 由于经脱色液脱下的染料能被滤纸下的活

性炭粉末吸附,因此,可达到省去换脱色液步骤和节省脱色液的目的。一块 $9.5\text{cm} \times 8.5\text{cm}$ 大小的15mm的厚胶,一般需加入1g左右的活性炭粉末,于常温下(10°C),过夜脱色,可达到较满意的效果。若是薄胶,活性炭粉末的用量可相对少一些,0.5g就足够了。在采用该法脱色时须注意一点,即铺滤纸于活性炭粉末上时,滤纸的边缘最好与平皿口的上沿相齐,以免活性炭粉末随液溢出或荡出而沾到凝胶上,影响外观。

[本文于1988年2月8日收到]