

CD4 单阳参考品辅助检测九色标记人血样品的流式分析技术

徐晓雪

(首都医科大学中心实验室, 北京 100069)

摘要:目的 探索流式多色分析中确定检测器最优参数的客观方法。方法 以 BD FACSymphony 流式细胞仪检测 CD3、CD4、CD8、CD25、CD27、CD45RA、CD56、CD127、CD197 九色标记人外周血样品, 选用中等表达强度各荧光素标记 CD4 单阳对照品, 以递增检测参数重复分析获得各通道检测器性能曲线, 计算获得流式仪器检测优化参数, 再以优化参数完成样品检测和补偿调节。结果 补偿前检测群体模糊不清, 无法确定检测数据质量; 补偿后可见细胞群体的位移, 各通道荧光溢漏扩散均较理想, 阴性、阳性群体区分明显, 各细胞群体指标显示清晰。结论 在多参数流式分析中可以采用适当强度光谱匹配的单阳样品客观、快速的确定检测参数, 进而完成补偿调节, 可避免操作人员主观判断失误, 提高检测质量。

关键词:流式细胞术; 荧光补偿; 单细胞分析; 荧光定量; 淋巴细胞

中图分类号: Q2-33

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2021.20.022

文章编号: 1006-1959(2021)20-0090-04

Flow Pattern Analysis Technique for CD4 Single-positive Reference Substance-assisted Detection of Nine-color Labeled Human Blood Samples

XU Xiao-xue

(Central Laboratory of Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: **Objective** To explore the method to determine the optimal parameters of detector in polychromatic flow cytometry. **Methods** CD3, CD4, CD8, CD25, CD27, CD45RA, CD56, CD127, CD197 in human peripheral blood were detected by BD FACSymphony flow cytometry. CD4 single positive control was labeled with moderate expression of each fluorescein. The performance curve of each channel detector was obtained by repeated analysis with increasing detection parameters. The optimized parameters of flow cytometry instrument were calculated, and then the sample detection and compensation adjustment were completed with the optimized parameters. **Results** The detection group before compensation was ambiguous and did not determine the quality of detection data. After compensation, the displacement of cell population was visible, and the fluorescence leakage diffusion of each channel was ideal. The negative and positive groups were clearly distinguished, and the indicators of each cell population were clear. **Conclusion** In the multi-parameter flow pattern analysis, the single-positive sample with appropriate intensity spectrum matching can be used to determine the detection parameters objectively and quickly, and then complete the compensation adjustment, which can avoid the subjective judgment error of operators and improve the detection quality.

Key words: Flow cytometry; Fluorescence compensation; Single cell analysis; Fluorescence quantification; Lymphocytes

流式细胞术是利用流体聚焦原理, 高速检测流体中单个细胞或微颗粒多种荧光标记参数的技术, 具有高速、定量、单细胞多参数的特点, 常用来分析血液细胞、培养细胞等复杂细胞群体中多种细胞标志物的表达差异, 可以帮助医学工作者了解细胞的分化、增殖和功能状态^[1]。随着流式细胞仪的发展和标记荧光的丰富, 流式检测可以同时检测的指标不断增多, 流式多参数检测使检测数据的信息量成倍增加, 不同检测指标可以互相印证, 数据可靠度大幅提升。同时还可以节省实验样品和试剂, 减少样品制备步骤、大大提高流式实验的效率, 成为流式技术的重要发展方向, 应用范围不断扩大。目前, 已经出现了超过 20~30 色的流式分析方案, 多参数流式技术是医学科研与临床中重要的单细胞分析技术之一^[2]。但是, 多参数流式技术检测影响因素复杂, 各项检测参数调节范围大, 操作主观性强, 常规

简单分析的手动调节方式无法满足检测要求, 需要更加客观科学的设定检测参数才能获得理想的结果。基于此, 本文以 FACSymphony 流式细胞仪检测九色标记人外周血实验为例, 详细介绍在多参数流式仪上客观分析多色样品的方法。

1 材料与方法

1.1 试剂和材料 多种荧光标记 CD4 抗体参考品试剂盒, BV480 标记 CD3 抗体, BUV395 标记 CD4 抗体, PERCPY5.5 标记 CD8 抗体, PECY7 标记 CD25 抗体, BV711 标记 CD27 抗体, BB515 标记 CD45RA 抗体, APC-R700 标记 CD56 抗体, AF647 标记 CD127 抗体, BV786CD197 抗体, 溶血素, 染色缓冲液, 洗涤缓冲液, 流式染色缓冲液, CST 质控微球(以上试剂购自美国 BD 公司)。材料: 人静脉血 5 ml, 采自健康志愿者。

1.2 主要仪器 BD FACSymphony 流式细胞仪(美国 BD 公司), 台式冷冻离心机 Allegra X-15R(美国贝克曼公司)。

1.3 样品制备

1.3.1 人外周血全血细胞表面抗体标记九色样品制

基金项目: 首都医科大学基础-临床科研合作基金项目(编号: 17JL78)

作者简介: 徐晓雪(1978.12-), 女, 河北遵化人, 硕士, 副主任技师, 主要从事实验技术研究

备 取 200 μ l 全血,加入推荐用量的 BV480 标记 CD3 抗体,BUV395 标记 CD4 抗体,PERCPY5.5 标记 CD8 抗体,PECY7 标记 CD25 抗体,BV711 标记 CD27 抗体,BB515 标记 CD45RA 抗体,APC-R700 标记 CD56 抗体,AF647 标记 CD127 抗体,BV786CD197 抗体和染色缓冲液,室温避光孵育 30 min,加入 5 ml 溶血素,室温溶血 10 min,离心洗涤 300 g,5 min,2 次,加入洗涤缓冲液重悬至 500 μ l。

1.3.2 九色单阳样品与空白对照制备 每个单阳样品管加入 200 μ l 全血,分别加入推荐用量的 BV480 标记 CD3 抗体,BUV395 标记 CD4 抗体,PERCPY5.5 标记 CD8 抗体,PECY7 标记 CD25 抗体,BV711 标记 CD27 抗体,BB515 标记 CD45RA 抗体,APC-R700 标记 CD56 抗体,AF647 标记 CD127 抗体,BV786CD197 抗体和染色缓冲液,室温避光孵育,溶血素,离心洗涤同上,加入洗涤缓冲液重悬至 500 μ l。另取 200 μ l 全血样品,不加入荧光抗体,仅溶血素,离心洗涤同上,加入洗涤缓冲液重悬至 500 μ l,作为空白样品。

1.3.3 人外周血全血细胞九色 CD4 单标样品制备 每个单阳样品管加入 200 μ l 全血,分别加入与检测样品相同荧光素标记的参考品试剂盒中的 CD4 抗体,即 BV480 标记 CD4 抗体,BUV395 标记 CD4 抗体,PERCPY5.5 标记 CD4 抗体,PECY7 标记 CD4 抗体,BV711 标记 CD4 抗体,BB515 标记 CD4 抗体,APC-R700 标记 CD4 抗体,AF647 标记 CD4 抗体,BV786CD4 抗体和染色缓冲液,均采用推荐用量,室温避光孵育,溶血素,离心洗涤同上,加入洗涤缓冲液重悬至 500 μ l。

1.4 仪器校准 仪器保持维护良好状态下运行 CST

质控追踪程序,校准仪器基本参数稳定。

1.5 仪器最佳检测器电压确定 逐个分析各色标记 CD4 单阳样品,目标检测器参数从 300 开始,每次递增 30,直到 600 或者检测信号接近检测器上限停止,读取各样品阴性、阳性群体荧光中位数值,计算各检测通道的信噪比,以信噪比最高的检测器电压值做为本通道最佳检测电压。

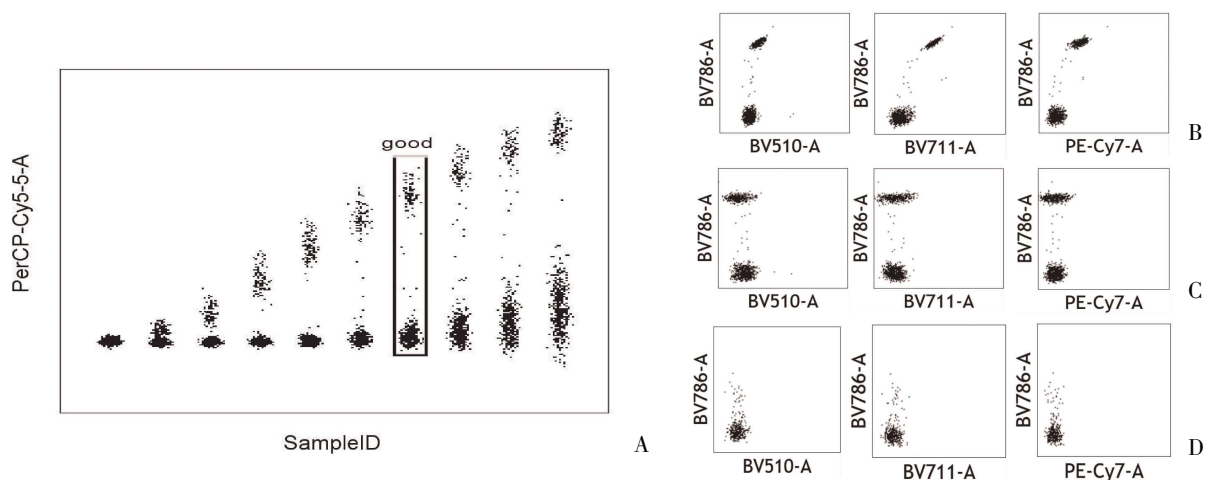
1.6 根据染色样品确定最佳实验检测电压 在初步检测参数下运行 9 色样品,检查各通道信号强弱是否适合,对于荧光强度超出检测范围的通道要下调检测电压保证信号位于检测器的线性采集窗口内,调整后确定为最佳检测参数,完成九色样品采样。

1.7 CD4 单阳计算补偿参数 建立仪器自动补偿程序,分别获取阴性对照样品和九个 CD4 单标样品,准确选取淋巴细胞群和各 CD4 单阳群,运行补偿计算程序,计算并保存补偿参数。

1.8 九色单阳对照验证补偿参数 将补偿参数赋值给之前获取的 9 色样品数据,在新补偿参数下采集 9 例检测抗体标记单阳样品,验证补偿条件无误,确定补偿参数。

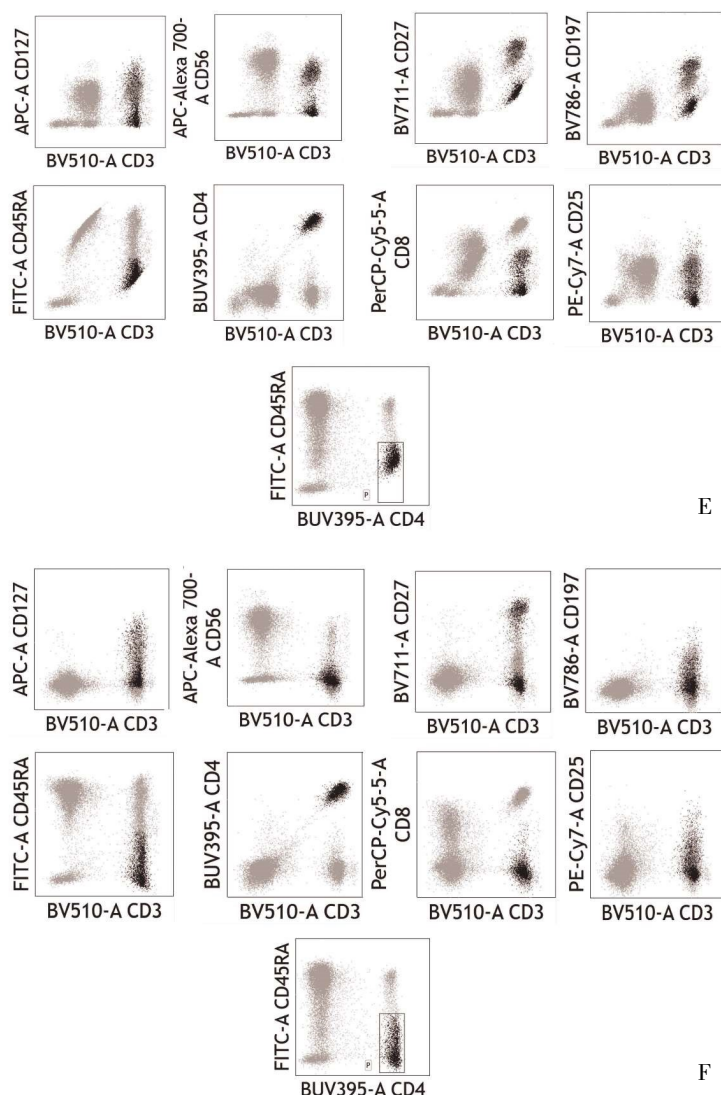
2 结果

检测显示,补偿前群体模糊不清,无法确定检测数据质量,使用确定好的补偿参数对 9 色样品数据进行荧光补偿,补偿后见图 1,其中蓝色门圈选 CD4+CD45RA-辅助 T 淋巴细胞的效应群体,对比补偿前后图可见细胞群体的位移。此方法获取的 9 色标记数据,各通道荧光溢漏扩散均较理想,阴性、阳性群体区分明显,各细胞群体指标显示清晰,可完成无重复采集的多色样品分析。



注:A:最佳电压的确定;B:BV786 标记 CD4 单阳对照用于补偿前;C:BV786 标记 CD4 单阳对照用于补偿后;D:BV786 标记 CD197 单阳用于补偿验证;E:未补偿数据;F:补偿数据

图 1 CD4 单阳参考品辅助检测九色标记人血样品



注:A:最佳电压的确定;B:BV786 标记 CD4 单阳对照用于补偿前;C:BV786 标记 CD4 单阳对照用于补偿后;D:BV786 标记 CD197 单阳用于补偿验证;E:未补偿数据;F:补偿数据

图 1(续)

3 讨论

多参数流式检测具有参数多、速度快、影响因素多、分析难度大、数据质量要求高等特点^[3],在流式实验中是检测难度最高的一类。通常在多色流式检测时,需要实验人员在采样的短暂过程中,凭借经验对多个参数完成人为设置。本实验中,可以看到在检测过程中,即使是在最优的检测参数下,操作者也只能观察到未经补偿的杂乱群体,既无法判断分群情况,更无法估计荧光溢漏扩散的情况。因此,通常是手动调节参数后采集少量样品,运行补偿程序,采集单阳对照,计算补偿后代入预试,根据补偿后群体分布情况调整电压,往往需要反复调整多次,才能使数据较为理想,但是既浪费样品,又耗费时间,并且由于主观分析的随意性和调整时间的局限,往往不能达到最佳的检测参数。对于流式多色检测,指标众多,群体数量巨大,检测中要求尽可能清楚区分所

有的群体,就必须注重溢漏扩散的干扰。溢漏扩散主要来自于检测器的干扰信号,只有使用信噪比尽可能高的检测参数才能得到更小的溢漏扩散,才能最大限度的将阳性和弱阳性群体从背景中分离出来^[4,5]。本方法利用了流式仪器通道的性能特点,利用 BD 公司的 CD4 抗体参考品试剂盒,预先利用光谱匹配,阳性明确的单色样品,分析确定各不同检测参数下检测通道的性能表现,选取各通道的最佳检测参数,在实际检测中以最优参数为参考,仅需要对少数超出界限的通道进行微调,降低检测参数至检测器线性范围上限即可,大大地减少了多色分析中实验人员的主观分析步骤,不需要反复多次上样,节约样品,可有效提高数据质量。

本研究采用的参考样品为人血细胞抗 CD4 单阳性标记样品,在人免疫细胞表面分布的蛋白标志物中,CD4 分子数量中等,是良好的阳性参考,可以

代表一般的检测指标状态,并且是实验室常用抗体,容易获得。本次使用的组合参考品试剂盒中 CD4 抗体为同一克隆,且抗体均经过滴定,反应条件一致,由 CD4 单阳标品检测得到的检测通道信噪比最佳检测电压是检测器的物理参数^[6],每台仪器都有固定的数值,理论上适合所有指标的检测,可以作为多色分析的初设参数,但一些极高表达指标有可能产生超出检测器线性范围的荧光信号,这时信号无法准确补偿,因此检测中需要确保检测信号线性度,只需要在上样过程中根据样品信号的实际情况,快速将超限通道的电压降低,使信号进入检测器线性范围,微调之后的检测电压即是适合本实验指标的最佳检测参数。对于低表达指标一般不需要调高检测器电压,因为反而会使信噪比下降,降低通道的分辨力^[7]。在上述样中仅需对少数超限通道调低电压即可,不需要反复上样,节省了样品细胞和时间。

使用优化后的参数完成采样后样品数据仍无法直接分析,由于流式仪器通道之间的荧光渗漏,各通道的信号互相混杂无法准确辨认,需要准确的计算补偿^[8,9]。荧光补偿是对不同通道之间荧光渗漏的调整操作,目的是尽可能将通道中的漏光排除,保证各通道信号的特异性,在多色分析中对于一个数据给予不同的补偿参数可能会得到完全不同的分析结果,因此补偿数据也很关键^[9]。一般流式检测常用单阳样品,确定各通道的漏光与检测信号荧光的比例进行补偿,但是在多参数流式实验中通常会包括一些表达量低或者阳性比例低的指标,如 CD127、CD25、CD197,这些指标的检测通道和漏光通道上的信号较弱,不容易获得满意的补偿数据,因此往往使用较强的单阳样品代替(如补偿微球)。本研究使用相同荧光素标记的 CD4 单阳代替,虽然抗体标记蛋白不同,但是荧光素相同(同一厂家),光谱稳定,可以替代使用。同时,由于各色的 CD4 标记细胞为相同群体,补偿时的细胞荧光本底更为一致,结果与使用补偿微球计算的结果近似,且检测信号分布在线性范围之内,避免了微球补偿时阳性群体信号超出检测器线性范围的情况^[10,11]。为了使计算的补偿参数更加匹配检测样品的实际情况,本次使用检测抗体标记的单阳样品代入补偿值验证,对有明显偏差的通道可手工微调,使补偿与各单阳样品标记吻合,再将修正的补偿应用到多色数据上,即可获得清晰的补偿后数据。

本实验采用优化的检测参数一次完成 9 色样品的分析与补偿,分析结果群体区分清晰,避免了传统主观调试的反复上样调整,节省了细胞样品,可以保证检测通道达到理想的信噪比和分辨力,同时简便可靠的计算补偿,提高多色数据质量,方便操作者快

速准确的完成多参数流式的检测。

综上所述,通过对相同光谱的一系列 CD4 标记单阳参考样品以递增检测参数重复分析,获得各通道检测器性能数据,依据流式细胞仪的检测器性能特点,简便快速的确定各通道最佳检测参数,避免操作者主观判断失误,结合自动补偿和补偿验证步骤,确保准确合理的补偿,提高流式多色数据分析的质量,使流式分析的结果更加准确、客观,同时节省细胞样品。

参考文献:

- [1]梁智辉,胡豫.流式细胞术—从基础研究到临床医学应用[M].武汉:华中科技大学出版社,2019:51-52.
- [2]Maciorowski Z, Chattopadhyay PK, Jain P. Basic Multicolor Flow Cytometry [J]. Curr Protoc Immunol, 2017 (117):5.4.1-5.4.38.
- [3]Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies [J]. Eur J Immunol, 2017, 47(10):1584-1797.
- [4]Giesecke C, Feher K, von Volkmann K, et al. Determination of background, signal-to-noise, and dynamic range of a flow cytometer: A novel practical method for instrument characterization and standardization [J]. Cytometry A, 2017, 91 (11):1104-1114.
- [5]Sommer U, Eck S, Marszalek L, et al. High-sensitivity flow cytometric assays: Considerations for design control and analytical validation for identification of Rare events [J]. Cytometry B Clin Cytom, 2021, 100(1):42-51.
- [6]Tighe RM, Redente EF, Yu YR, et al. Improving the Quality and Reproducibility of Flow Cytometry in the Lung. An Official American Thoracic Society Workshop Report [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2019, 61(2):150-161.
- [7]Mazza EMC, Brummelman J, Alvisi G, et al. Background fluorescence and spreading error are major contributors of variability in high-dimensional flow cytometry data visualization by t-distributed stochastic neighboring embedding [J]. Cytometry A, 2018, 93(8):785-792.
- [8]Roederer M. Distributions of autofluorescence after compensation: Be panglossian, fret not [J]. Cytometry A, 2016, 89(4):398-402.
- [9]Lucas F, Gil-Pulido J, LaMacchia J, et al. MiSet RFC Standards: Defining a Universal Minimum Set of Standards Required for Reproducibility and Rigor in Research Flow Cytometry Experiments [J]. Cytometry A, 2020, 97(2):148-155.
- [10]Ma Y, Xu X, Li M, et al. Gut microbiota promote the inflammatory response in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus [J]. Mol Med, 2019, 25(1):35.
- [11]Wu X, Yao D, Bao L, et al. Ficolin A derived from local macrophages and neutrophils protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury by activating complement [J]. Immunol Cell Biol, 2020, 98(7):595-606.

收稿日期:2021-01-31;修回日期:2021-04-26

编辑/成森