

小鼠白细胞免疫分型 30 色

摘要

流式细胞仪已经成为基础科学研究和临床研究领域的常规使用仪器。作为一个功能强大的检测工具，流式可以分析不同免疫细胞亚群，帮助我们了解免疫系统的整体情况。由于流式细胞仪技术不断革新，目前新型的流式细胞仪可以支持多种颜色，能够同时鉴定多种细胞。在本应用简报中，为了检测感染流感的小鼠肺部、脾脏和纵膈淋巴结中的免疫细胞分布，基于五激光的 Agilent NovoCyte Penton 流式细胞仪设计了 30 色的免疫分型实验方案。

简介

随着技术的发展，目前的多色流式细胞仪能够通过复杂而精密的多色实验方案同时评估多个免疫细胞群。Agilent 与时俱进，推出配备五种激光器 (UV, 349 nm; violet, 405 nm; blue, 488 nm; yellow-green, 561 nm; and red, 637 nm) 和 30 个荧光检测器的 NovoCyte Penton 流式细胞仪，可以从一个生物样本中获得尽可能多的信息。通过 30 个不同荧光，就可以实现在一管样品中通过一次采集来分析多个细胞亚群。

法国马赛吕米尼免疫中心 (CIML) 的科学家设计了一个包含 Penton 所有检测通道的实验方案，用来深入研究感染流感的小鼠的免疫系统，并全面了解感染后小鼠的免疫细胞亚群分布。30 色的免疫分型实验模板的设计充分考虑了 Marker 的表达、荧光强度、光谱的重叠以及 Agilent NovoCyte Penton 的通道配置从而选择了合适的荧光染料抗体。使用 NovoExpress 软件对数据进行了分析，发现三个淋巴器官的免疫细胞分布存在差异。

实验部分

实验材料

- RPMI-1640 Medium (GIBCO, 21875034)
- Fetal Calf Serum, FCS (Biowest, S1810-500)
- DNase I (Sigma-aldrich, 10104159001)
- Collagenase II (Sigma-aldrich, C5138)
- UltraPure 0.5 M EDTA, pH 8 (Invitrogen, 15575-038)
- 1X RBC Lysis Buffer (eBioscience, 00-4333-57)
- FACS Buffer (PBS 1x, 0.5% BSA, 2 mM EDTA)
- Brilliant stain buffer (Becton Dickinson, 563794)
- 流式抗体 (Table 1)
- Agilent NovoExpress 软件
- Agilent NovoCyte Penton 流式细胞仪

所有动物实验都是在 C57Bl6 小鼠上进行，用 5 PFU 的流感病毒 (PR8, H1N1) 感染 8 周的小鼠。感染 35 天后小鼠被安乐死，提取脾脏、肺部和纵膈淋巴结。并用 10 mL 的 1x PBS 进行肺部灌注。

组织制备

肺和脾脏：

1. 将器官组织放入加入 3 mL 5% FCS 的 RPMI 中，其中含有 45 μ L 的 DNase I (150 μ g/mL) 和 30 μ L 的胶原酶 II (500 μ g/mL)
2. 用 OctoGentleMacs (Miltenyi) "m_lung-01_02" 程序解离器官组织
3. 程序结束后在 37 °C 条件下静置 30 min，在 OctoGentleMacs (Miltenyi) 上再次运行 "m_lung-01_02" 程序
4. 加入 30 μ L 的 EDTA (0.5 mM) 混匀后静置 2 min
5. 用细胞筛 (70 μ m) 过滤解离后的细胞悬液
6. 加入培养基补液至总体积为 15 mL
7. 4 °C，400 g 下离心 7 min
8. 弃去上清液
9. 用 3 mL 的红细胞裂解液 1X RBC 重悬细胞悬液，静置 5 min
10. 加入培养基补液至总体积为 15 mL
11. 4 °C，400 g 下离心 7 min
12. 弃去上清，将细胞重悬于 500 μ L 含有 10% Fc Block + 20% Brilliant Stain Buffer 的 FACS 缓冲液中，置于冰上保存

淋巴结：

1. 手动解离细胞
2. 用细胞筛 (70 μ m) 过滤细胞悬液
3. 加入培养基补液至总体积为 15 mL
4. 4 °C，400 g 下离心 7 min
5. 弃去上清，将细胞重悬于 200 μ L 含有 10% Fc Block + 20% Brilliant Stain Buffer 的 FACS 缓冲液中，置于冰上保存

样品制备：

1. 在冰上 10 min 后，计数后取 3×10^6 个细胞
2. 4 °C，400 g 下离心 7 min 将细胞沉淀下来
3. 用 50 μ L 的抗体混合液重悬每个样品 (表 1)
4. 37 °C 避光孵育 30 min
5. 孵育结束后加入 150 μ L FACS 缓冲液
6. 4 °C，400 g 下离心 7 min 将细胞沉淀下来
7. 用 200 μ L PBS 洗涤细胞
8. 4 °C，400 g 下离心 7 min 将细胞沉淀下来
9. 将细胞重悬于 100 μ L Live Dead Fixable blue (用 PBS 1/1000 稀释)，在室温 (RT) 下避光静置 15 min
10. 孵育结束后加入 150 μ L FACS 缓冲液
11. 4 °C，400 g 下离心 7 min 将细胞沉淀下来
12. 重悬细胞后在 NovoCyte Penton 流式细胞仪上采集样品

Table 1. Agilent NovoCyte Penteon 流式细胞仪上 30 色免疫分型实验使用的抗体，按通道排列，每种抗体的检测激光器和通道以及每种抗体的浓度和其他产品细节如下表

Laser	Filter	Specificity	Fluorochrome	Clone	Vendor	Part Number	Dilution	Amount Added to 3 × 10 ⁶ Cells (50 μL)
349	445/45	Live/Dead Fixable Blue	BUV395		Invitrogen	L23105	1/1000	0.05
	525/45	MHC-II	BUV496	M5/114.15.2	Becton Dickinson	750281	1/800	0.0625
	586/20	CD3	BUV563	17A2	Becton Dickinson	741319	1/400	0.125
	615/20	gdT	BUV615	GL3	Becton Dickinson	751183	1/200	0.25
	667/30	CD88	BUV661	20/70	Becton Dickinson	750080	1/400	0.125
	725/40	CD43	BUV737	S7	Becton Dickinson	612840	1/200	0.25
	780/60	NKp46	BUV805	29A1.4	Becton Dickinson	742066	1/100	0.5
405	445/45	XCR1	BV421	ZET	BioLegend	148216	1/400	0.125
	525/45	CD103	BV480	M290	Becton Dickinson	566118	1/200	0.25
	586/20	TCRb	BV570	H57-597	BioLegend	109231	1/200	0.25
	615/20	Siglec H	sb600	eBio440c	Thermo Fisher Scientific	63-0333-82	1/200	0.25
	667/30	CD11b	BV650	M1/70	BioLegend	101259	1/400	0.125
	725/40	CD8b	sb702	53-6.7	Thermo Fisher Scientific	67-0081-82	1/400	0.125
	780/60	CD69	BV786	H1.2F3	Becton Dickinson	564683	1/200	0.25
488	525/45	SiglecF	BB515	E50-2440	Becton Dickinson	564514	1/400	0.125
	586/20	CD45	Spark 574	30F11	BioLegend	103184	1/200	0.25
	615/20	CD4	BB630-P	GK1.5	Becton Dickinson	Prototype	1/400	0.125
	667/30	CD90.2	PerCP	30H12	BioLegend	105322	1/200	0.25
	695/40	Ly6G	BB700	1A8	Becton Dickinson	566435	1/800	0.0625
	725/40	CD62L	BB755	MEL-14	Becton Dickinson	Prototype	1/400	0.125
561	586/20	B220	SYG570	RA36B2	BioLegend	103286	1/400	0.125
	615/20	CD172a	AF594	P84	BioLegend	144020	1/400	0.125
	667/30	CD25	PE Cy5	PC61	BioLegend	102010	1/200	0.25
	695/40	CD11c	PE Cy5.5	N418	Thermo Fisher Scientific	35-0114-82	1/400	0.125
	725/40	CD19	PE-AF700	1D3	AAT-bioquest	ATB10194100	1/400	0.125
	780/60	NK1.1	PE-Cy7	PK136	BioLegend	108714	1/100	0.5
637	667/30	CD64	AF647	X54-5/7.1	BioLegend	139322	1/200	0.25
	695/40	IgD	SPARK 685	11-26c.2a	BioLegend	405750	1/1000	0.05
	725/40	CD44	APC-R700	IM7	Becton Dickinson	565480	1/400	0.125
	780/60	Ly6C	APC-Cy7	HK1.4	BioLegend	128026	1/800	0.0625

结果和讨论

流式细胞仪在基础研究和临床检测中早已被认定为是异质细胞群表型分析的金标准。随着流式细胞仪的发展，新型的仪器都增加了激光器和检测通道，扩大了实验室和临床的检测能力。另外，通过增加激光器和检测器的数量，可以在一个样品中检测更多的细胞表面标记物，通过表型标记更精准地鉴定目标细胞。免疫分型利用靶向细胞表面标记物的荧光抗体标记细胞，使流式细胞仪能够可视化的分析细胞。本应用资料设计的 30 色的免疫分型实验模板，充分应用了 NovoCyte Penton 流式细胞仪的 30 个检测器。

这个实验方案主要目的是评估感染流感病毒小鼠的免疫细胞的分布。具体来说，分析了三个器官：肺、脾和淋巴结的免疫细胞分布。还精确分析了 T 细胞亚群，比较在病毒感染期间在这三个器官中的分布差异。三个器官的细胞分析都使用相同的设门策略，方便数据的比较。Table 1 中列出了检测抗体的克隆、检测通道、供应商信息和每种抗体的用量。

本应用资料中使用的 30 色流式细胞仪方案通过检测细胞表面标记物的表达以及 T 细胞的激活状态来鉴定三个器官中的免疫细胞类型。该实验中，将 50 μ L 的抗体混合液加入 3×10^6 个细胞中。染色后，使用 NovoCyte Penton 流式细胞仪和 NovoExpress 软件采集和分析数据。我们将在下面内容中详述免疫细胞亚群分析的圈门策略。

流式的数据分析首先用正向散射 (FSC) 和侧向散射 (SSC) 进行初始圈门，去除细胞碎片。通过 FSC-A 和 FSC-H 设门去除粘连的细胞，然后用 Live/Dead Fixed Blue 死细胞染色试剂圈出活细胞，并进行进一步分析。圈出 CD45+ 的白细胞，并进一步利用 CD19 和 MHC II 对 CD45+ 细胞进一步圈门，双阳的这一群为 B 细胞。用 IgD 和 B220 进一步对 B 细胞进行分析，结果表明大约 61.39% 的 B 细胞是 Naïve B 细胞。

用 CD11b 和 Ly6G 对 CD19- 的细胞进一步分析，其中 CD11b 和 Ly6G 的高表达这一群是中性粒细胞 (6.23%)，其余细胞则是非中性粒细胞，进一步对这群细胞分析，X 轴为 CD11b，将 Y 轴改为 Siglec F，圈出肺泡巨噬细胞 (high Siglec F, low CD11b) 和嗜酸性粒细胞 (high Siglec F, high CD11b)。而 Siglec F- 的细胞群被进一步分析，因为 T 细胞几乎不表达 Siglec F。

为了区分 T 细胞和其他细胞，采用了 CD3 和 CD90 设门，然后用 CD3+CD90+ 细胞来精确圈出 T 细胞亚群。而 CD3-CD90- 的细胞将被进一步分析以确定其中的免疫细胞组成。

通过 NK1.1 和 NKp46 的高表达圈出 NK 细胞，而低表达的 Not NK 细胞通过 Siglec H 和 B220 双阳来圈出浆细胞样树突状细胞 (pDC)。从 not pDC 细胞中圈出 CD43^{low}Ly6C^{high} 的单核细胞群，其余细胞设门圈出 CD88+ 和 CD64+ 的巨噬细胞，而 CD88-CD64- 的细胞通过 MHC II 和 CD11c 设门，图的右上角双阳区域的细胞为树突状细胞 (DC)。通过对 XCR1 (一种专门在 cDC1 上的趋化因子受体) 的表达区分两种类型的经典型树突状细胞 (cDC)，经典 I 型树突状细胞 (cDC1) 和经典 II 型树突状细胞 (cDC2)。

为了深入了解 T 细胞的激活状态和感染期间在三个淋巴器官中的分布，我们对 T 细胞 (CD3+CD90+ 细胞) 进行了更深层的分析。其中表达 $\gamma\delta$ 受体的 T 细胞占 3.3%，其余的 T 细胞通过 CD4 和 CD8 的表达被分为两组：CD4+CD8- 和 CD8+CD4-。在 CD4+CD8- 细胞中分析 CD25，只有不到 2% 是调节性 T 细胞 (1.66%)，其余的细胞通过 CD62L+ 和 CD44+ 来区分 CD4+ 记忆细胞 (CD44+CD62L+) 和活化的 CD4+ 细胞 (CD44+CD62L-)。然后通过 CD103+CD69+ 的表达来识别组织驻留记忆 T 细胞 (Trm)。CD8+CD4- 细胞采用类似的设门策略来区分 CD8+ 记忆 (CD44+CD62L+)、活化 (CD44+CD62L-) 和 Trm (CD103+CD69+) 细胞。

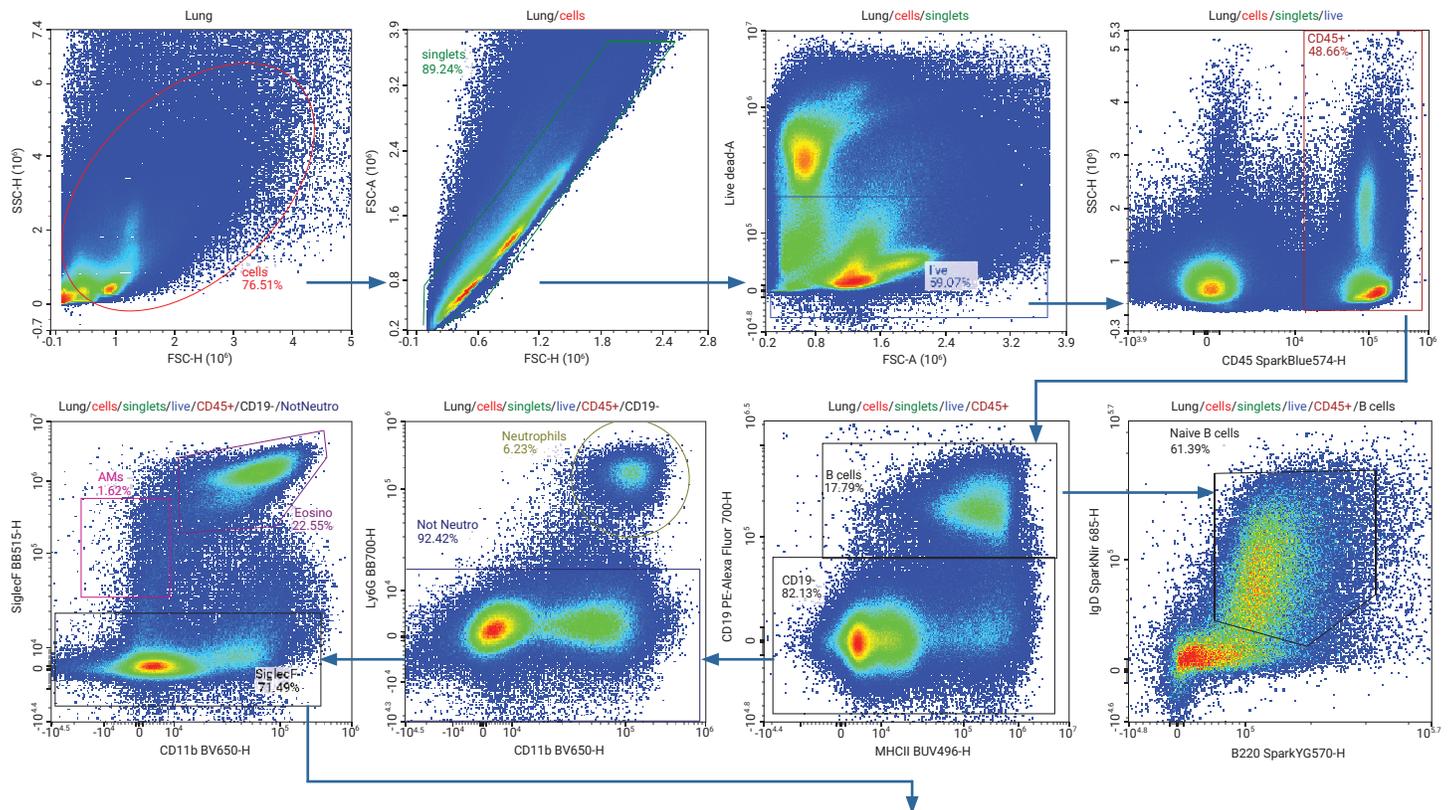
虽然 Figure 1 展示的是肺部样本的数据，但为了便于比较三个器官的免疫细胞分布和激活情况，三种组织样品的分析使用了相同的圈门策略。对比三个器官中的免疫细胞亚群比例发现某些细胞群的分布有明显的差异 (Figure 2)。在这项研究中，细胞群比例是指该细胞亚群在其上级细胞群中的百分比。

直接比较三个器官的 T 细胞分布显示，与肺 (62%) 和脾 (54%) 相比，淋巴结的 T 细胞比例增加 (90%)。CD8 T 细胞分布表现也相似，尽管比例仅轻微较高 (54% vs 43%)。有趣的是，这一现象在其他细胞群中发生了明显的变化。中性粒细胞在淋巴结中相对于肺和脾大大减少 (分别为 1:10:20 的比例)。同时，pDC 细胞在淋巴结中的分布增加，在肺中的分布很少，在脾中没有分布。嗜碱性粒细胞如预期的那样，在三个器官中都有少量存在，但相对于其他两个器官，在肺中的分布有少量的增加 (0.32% vs 0.01%)。因此，只需一次采集，就可以基于 30 个检测参数很容易地对各器官的白细胞免疫分型快速分析。

在数据采集过程中，NovoExpress 软件可以检测每个样本的绝对计数 (events/ μL)。图 3 显示了流感病毒感染后小鼠肺部 T 细胞亚群的绝对计数，仔细观察 T 细胞在肺部的分布，发现活化的 CD4+ 和 CD8+ 细胞的浓度 (events/ μL) 最高，虽然二者数据不完全相同，但也没有很大的差别。而其他 T 细胞亚群的浓度都相对较低。有趣的是，CD8+ Trm 细胞比 CD4+ Trm 细胞的浓度高一个数量级。

总结

Agilent NovoCyte Penteon 流式细胞仪能够满足研究人员在一次采集中研究多个重要参数，这在细胞免疫分型中占据一大优势。通过 5 个激光器和 30 个检测器，可以从一个样品中获得更多的信息，节省了宝贵的生物材料。另外仪器的绝对计数功能提供了关于细胞亚群更多的信息。在这份应用简报中，三个淋巴器官的样品分析应用了相同的设门策略，对比了 T 细胞的分布，并能深入了解流感感染期间的免疫系统。NovoCyte Penteon 的强大检测能力还满足在同一实验中分析肺、脾和淋巴结中除了 T 细胞的其他免疫细胞亚群。



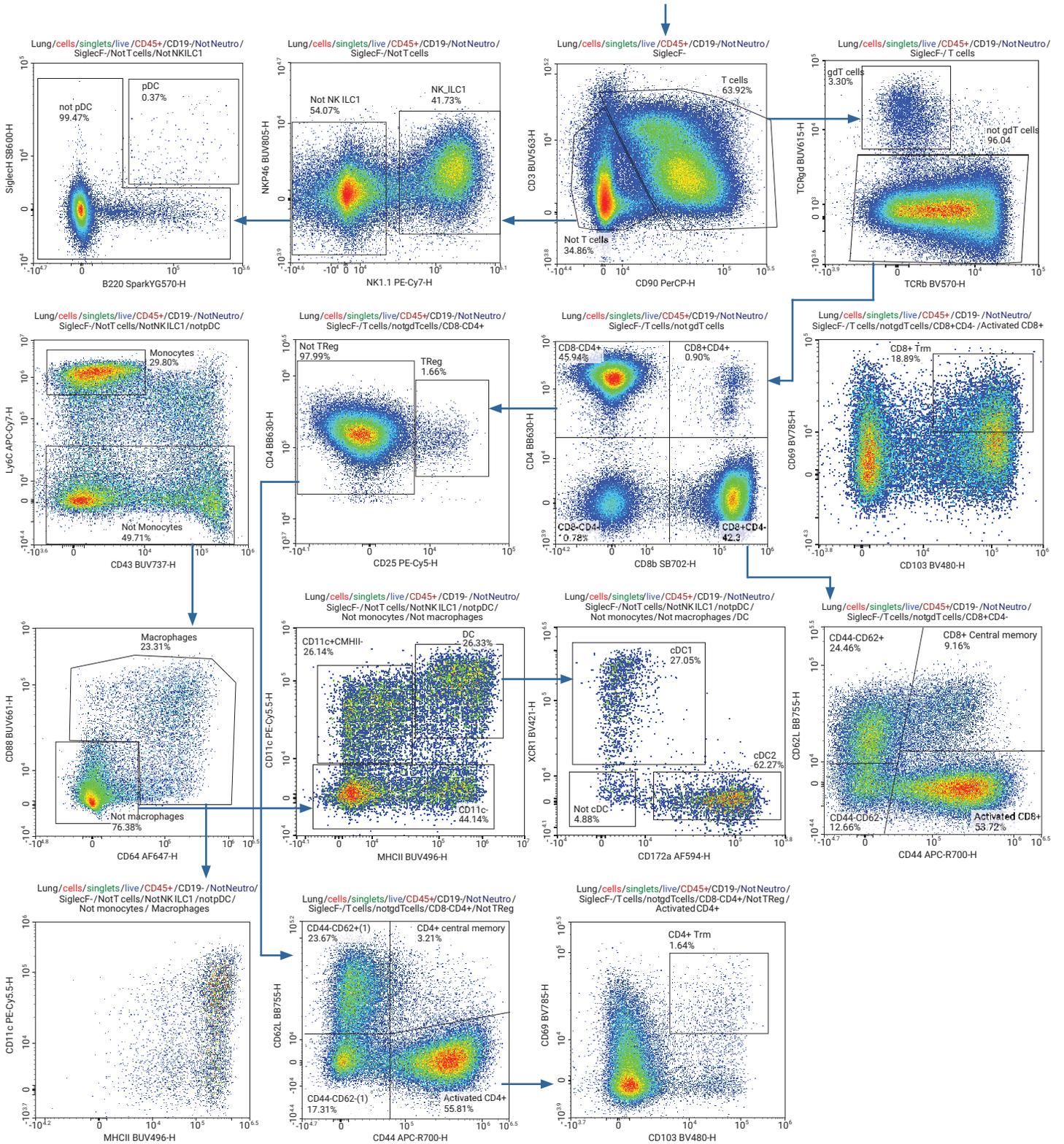


Figure1. 在 Agilent NovoCyte Penton 流式细胞仪的 30 色免疫分型实验中，用来定义细胞各亚群的圈门策略。图中展示的是肺部样本的数据，但脾脏和淋巴结组织样品的分析使用了相同的圈门策略。抗体染色后，在 NovoCyte Penton 上采集样本，使用 Agilent NovoExpress 软件分析数据，并利用逐级设门策略来鉴别所有主要的细胞亚群

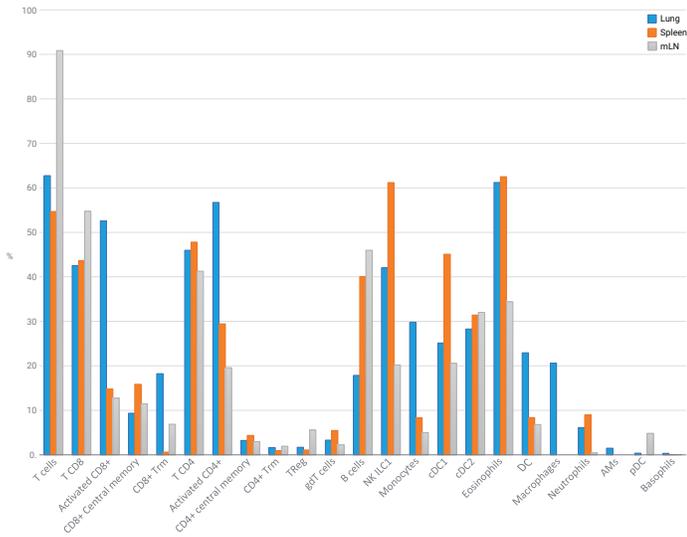


Figure 2. 30 色实验方案中肺、脾和纵隔淋巴结三个器官组织样本的主要细胞亚群的比例 (% parent)

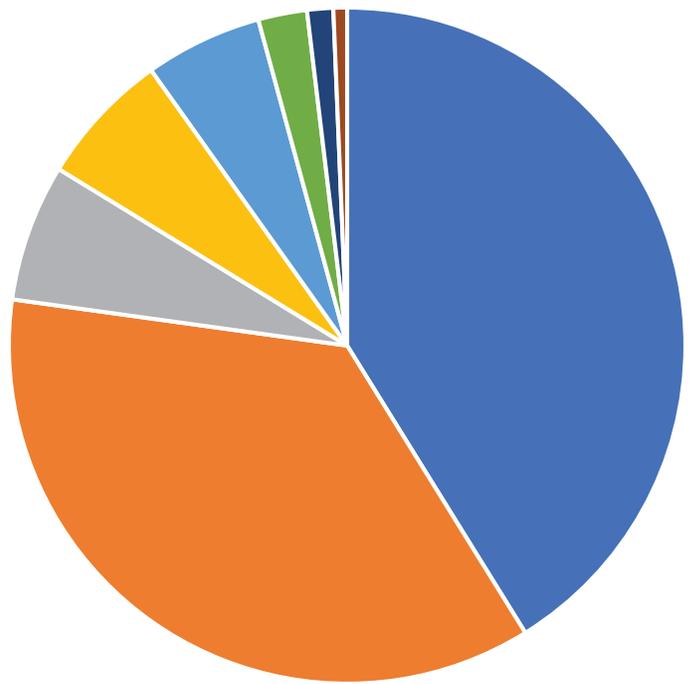


Figure 3. 肺部 T 细胞亚群浓度 (events/ μ L) 的扇形分布图

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn



微信搜一搜

安捷伦细胞分析

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2023
2023年7月5日，中国出版
5994-6556ZHCN

