

目录

外周血淋巴细胞表面染色 (Immunofluorescence staining of cell surface marker)	1
原理 :	1
材料 :	1
步骤 :	1
检测结果实例 :	1
细胞周期 (Cell Cycle)	2
原理 :	3
材料 :	3
步骤 :	4
质控 :	4
对照 :	4
检测结果实例 :	4
细胞凋亡 (Apoptosis)	6
原理 :	6
材料 :	6
步骤 :	6
检测结果实例 :	7
外周血淋巴细胞免疫染色 : 6C-TBNK 检测	8
原理 :	8
材料 :	8
步骤 :	9
检测结果实例 :	9
外周血淋巴细胞免疫染色 : 4-C TBNK 检测	10
材料 :	10
步骤 :	10
检测结果实例 :	11
HLA-B27 检测	12
原理 :	12
材料 :	12
步骤 :	12
检测结果实例 :	13

外周血淋巴细胞表面标志物染色 (Immunofluorescence staining of cell surface marker)

原理：

对细胞表面蛋白质的染色可以分为直接染色 (DIF) 和间接染色 (IIF) 两种。直接染色是指用直接联有荧光的抗体染色；而间接染色则是采用一抗和细胞表面蛋白先结合，然后再用带有荧光的二抗进行染色。荧光染色的方法在蛋白质检测中使用非常普遍，因为只要采用合适的抗体，几乎任意的蛋白都可以用指定的荧光标记。但是由于各种蛋白表达的峰度和荧光染料自身荧光强度不同，以及临近通道荧光溢漏的问题，多色实验的基本原则是：最强的染料配表达最弱的蛋白，最弱的染料配表达最强的蛋白；如果使用染料的数量不大则应尽量避免使用临近通道。还需要考虑染料之间的溢漏、以及偶联染料易降解的问题。405nm 的紫色激光所激发的新型染料如 BV421、BV605 等为多色实验提供了更多的选择空间。

材料：

人外周血样本 (peripheral blood, PB)

FACS Lysing Solution (细胞裂解液，主要成分为二甘醇和甲醛，1×或 10×，10×的原液要先稀释到 1×后使用)

待检测标志物的荧光标记抗体 (e.g. CD4-PE-Cy7, CD8-PE, CD3-APC)

各抗体对应 isotype (和对应抗体同种属、同亚型、同荧光标记, e.g. isotype-PE-Cy7, isotype-PE, isotype-APC)

步骤：

1. 对照及样本组设置：

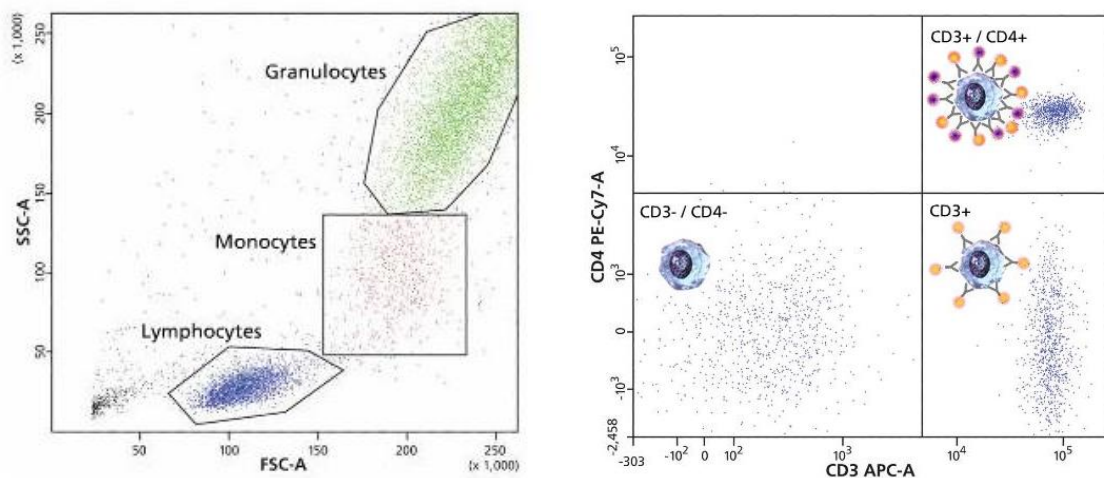
- 阴性对照： PB0 50μL + Isotype PE-Cy7 5 μL + isotype PE 5 μL + isotype APC 5 μL
- 单阳管： PB0 50μL + CD4 PE-Cy7 5 μL + isotype PE 5 μL + isotype APC 5 μL
- 单阳管： PB0 50μL + isotype PE-Cy7 5 μL + CD8 PE 5 μL + isotype APC 5 μL
- 单阳管： PB0 50μL + isotype PE-Cy7 5 μL + isotype PE 5 μL + CD3 APC 5 μL
- 样本管 1： PB1 100μL + CD4 PE-Cy7 10 μL + CD8 PE 10 μL + CD3 APC 10 μL
- 样本管 2： PB2 100μL + CD4 PE-Cy7 10 μL + CD8 PE 10 μL + CD3 APC 10 μL

注意：为确保不同管反应时间一致，操作中应先加抗体再加入外周血样本；抗体具体用量需参照试剂说明，并进行滴度测试。

- 室温下避光孵育 15min。
- 在每管中加入 2mL 1×Lysing Solution，室温下避光孵育 10min
- 将裂解好的外周血离心 1200rpm，5min，去上清液

5. 加入 2mL PBS，混匀
6. 离心 1200rpm，5min，去上清液
7. 加入 500 μ L PBS，混匀
8. 3 小时内上机（如果不能立刻上机，2 $^{\circ}$ C -8 $^{\circ}$ C 避光保存样本）。

检测结果实例：



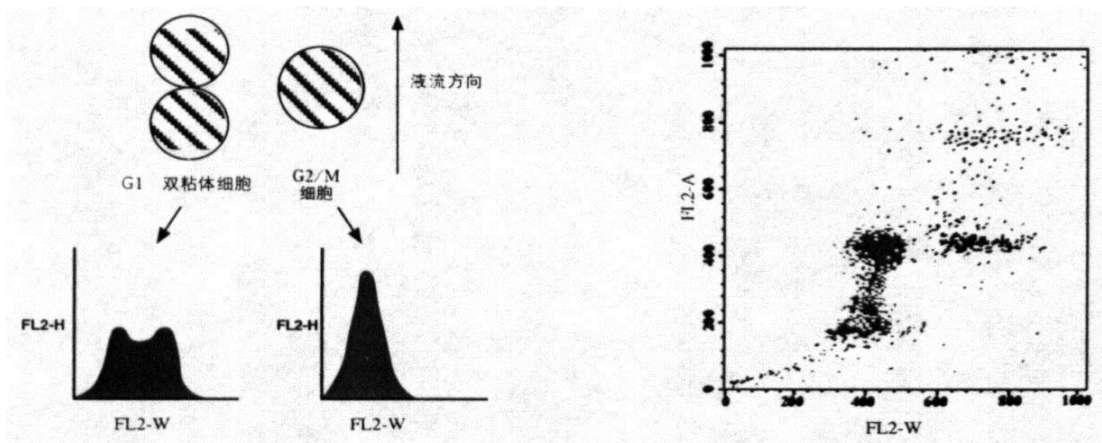
说明：特定的白细胞被 CD3 和 CD4 荧光抗体直接染色并在流式细胞仪上分析。左图中，根据 FSC/SSC 可圈出淋巴细胞；右图中，可以看到以下三种不同的淋巴细胞：左下象限是 CD3/CD4 双阴性的细胞，右下象限则是只表达 CD3 不表达 CD4 的单阳细胞，而位于右上象限是 CD3/CD4 双阳的细胞（辅助 T 淋巴细胞）。

细胞周期 (Cell Cycle)

原理：

细胞在有丝分裂的过程中，核内的 DNA 会进行复制，造成 DNA 含量的变化。如果把处于 G0/G1 期的细胞的 DNA 含量看做 2N 的话，处于 G2/M 期的细胞的 DNA 含量则为 4N。荧光染料碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 是一种核酸特异性染料，染料的荧光强度与结合的 DNA 数量成正比。根据 PI 的这种特性，我们常常用它来揭示细胞内 DNA 倍性的关系，从而推导出细胞群体的周期分布。

然而，流式细胞术只能检测在某一时刻穿过激光的细胞的荧光强度，但无法直接判断在这一时刻到底穿过了几个细胞。如果有细胞粘在一起或是正巧同时穿过激光，流式细胞仪则会读取其整个荧光强度，从而导致对单个细胞 DNA 含量测定上的误差。为了解决这个问题，我们常常做一张以 FL2-W 和 FL2-A (Accuri C6 上无 Width 参数，需使用 FL2-A vs FL2-H 来作图去除粘连体) 分别为横纵坐标的散点图。FL2-W 指的是第二通道 (PI) 里该细胞通过激光的时间，而 FL2-A 指的是第二通道里该细胞的总荧光强度。当细胞粘连时，其总体积与质量变大，导致通过激光时间变长，所以 FL2-W 的值会比单个细胞大出很多。通过这种方式，我们可以将 FL2-W 比较统一 (小) 的细胞用门圈出，以排除粘连体，从而确保周期分析的准确性 (如下图所示)。然后我们就可以在 FL2-A 的直方图上直观地对细胞倍性进行分析统计了。



材料：

- 人外周血样本 (peripheral blood, PB)
- FACS Lysing Solution (细胞裂解液, 1×或 10×, 10×的原液要先稀释到 1×后使用)
- BD™ DNA QC Particles (Cat# 349523)
- BD Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit (Cat# 340242)
 - Solution A (10mL×1) (Trypsin in Spermine Tetrahydrochloride Detergent Buffer)
 - Solution B (8mL×1) (RNase A and trypsin Inhibitor in Spermine Buffer)
 - Solution C (8mL ×1) (Propidium Iodide (PI) in Spermine Buffer)
 - Buffer Solution (50mL×3) (DMSO in Sucrose-Sodium Citrate)

注意：Solution A, B, C 中含有 spermine tetrahydrochloride，对皮肤和粘膜有刺激性；
Solution C 中 PI 有毒，并具有潜在的致癌性；
Buffer Solution 中含有 DMSO，具有潜在的致畸性。
操作时戴手套，注意避免眼睛，皮肤和衣服与以上试剂的接触。
Solution A 和 B 在室温下使用（20°C-25°C），Solution C 要在 2°C-8°C 下避光保存。

步骤：

1. 在 200 μ L 外周血加入 2mL 裂解液，室温下孵育 10min
2. 将裂解好的外周血离心 1200rpm，5min，去上清液
3. 加入 2mL 鞘液，混匀（如不含红细胞样本无需裂红，从此步骤开始，取 10^6 细胞）
4. 离心 1200rpm，5min，去上清液
5. 加入 250 μ L Solution A, 轻轻混匀（**不要涡旋**），室温下 孵育 10min
6. 加入 200 μ L Solution B, 轻轻混匀（**不要涡旋**），室温下 孵育 10min
7. 加入 200 μ L Solution C，混匀，在冰上或者冰箱里避光孵育 10min
8. 将样本用 35-50 μ m 的滤网（300 目）过滤
9. 3 小时内上机（如果不能立刻上机，2°C-8°C 避光保存样本）

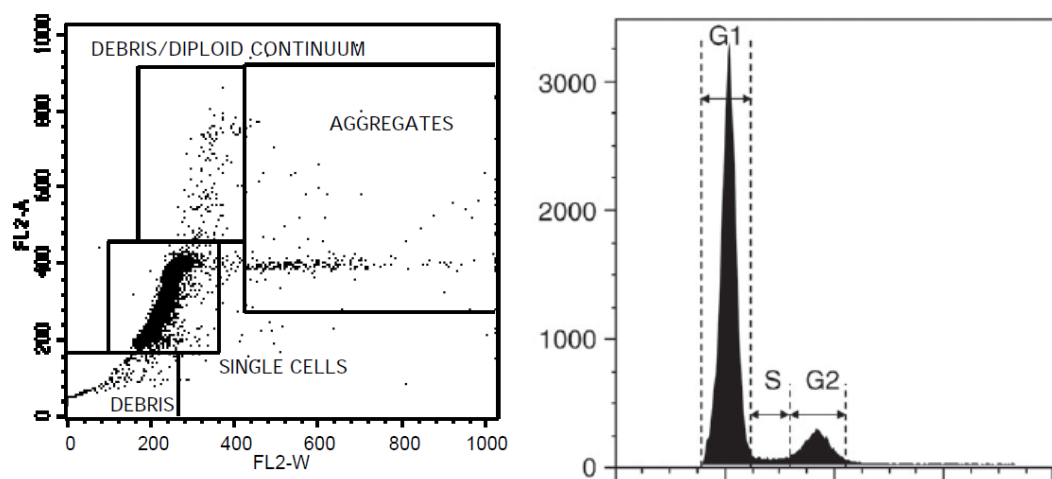
质控：DNA QC 质控试剂盒（Cat# 349523）用于判别仪器性能

1. A 液（chick erythrocyte nucleus，CEN），用于判别 FL2 通道灵敏度（sensitivity）和线性程度（linearity）的性能优劣：取 20 μ L 加入 PI 染色液 1mL，轻轻混匀，避光孵育 10min，上机检测。
2. B 液（calf thymocyte nucleus，CTN），用于判断仪器粘连体识别（doublet discrimination）性能的优劣：取 20 μ L 加入 PI 染色液 1mL，剧烈震荡，避光孵育 10min，上机检测。

对照：

1. 内参：样本内含有已知倍性的细胞亚群
2. 外参（optional）：同类已知倍性的细胞。

检测结果实例：



说明：使用 PI 荧光染料检测细胞周期分布。左图中，利用 FL2-A 和 FL2-W 圈出单个细胞以去除粘连体；右图横坐标为 FL2-A 即 PI 荧光强度（使用线性显示），纵坐标为细胞个数（count）。在右图中可分别划出处于 G0/G1 期、S 期、以及 G2/M 期的细胞，并对其进行统计分析。

细胞凋亡 (Apoptosis)

原理：

细胞程序性死亡/细胞凋亡 (apoptosis) 是机体移除不需要的细胞的一种常见的机制。细胞凋亡早期的标志事件之一是磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 从胞膜内表面到外表面的转移。Annexin V (AV) 和 PS 有很强的亲和力, 所以被荧光标记后常常在流式中被用来检测外翻的 PS。在细胞凋亡后期, 细胞膜与核膜常常会破裂。这种现象在流式中可以用 Propidium Iodide (PI) 检测。PI 是一种核酸特异性染料。当细胞膜完整时, PI 无法穿透胞膜, 故无法对细胞核进行染色。AV 与 PI 共同使用时, 可以对细胞凋亡的各个时期进行检测: 正常活细胞显示 AV 和 PI 的双阴性; 早凋细胞显示 AV 阳性和 PI 阴性; 晚凋细胞则显示 AV 和 PI 的双阳性。然而, 可以被 AV 和 PI 共同染色的细胞并不一定处于凋亡晚期。坏死的细胞在晚期也会被 AV 和 PI 共同染色。所以要想做到对细胞凋亡精确的检测则需要对整个凋亡过程进行监测, 即 AV 阴性 & PI 阴性 → AV 阳性 & PI 阴性 → AV 阳性 & PI 阳性。

材料：

- 人外周血样本
- Pharm Lyse (细胞裂解液, 主要成分为氯化铵、**不含固定剂**, 10×的原液要先稀释到 1×后使用)
- BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (Cat# 556547)
- 10X Annexin V Binding Buffer (50mL×1) 51-66121E
- FITC Annexin V (AV) (0.5mL×1) 51-65874X
- Propidium Iodide (PI) Staining Solution (2.0mL×1) 51-66211E

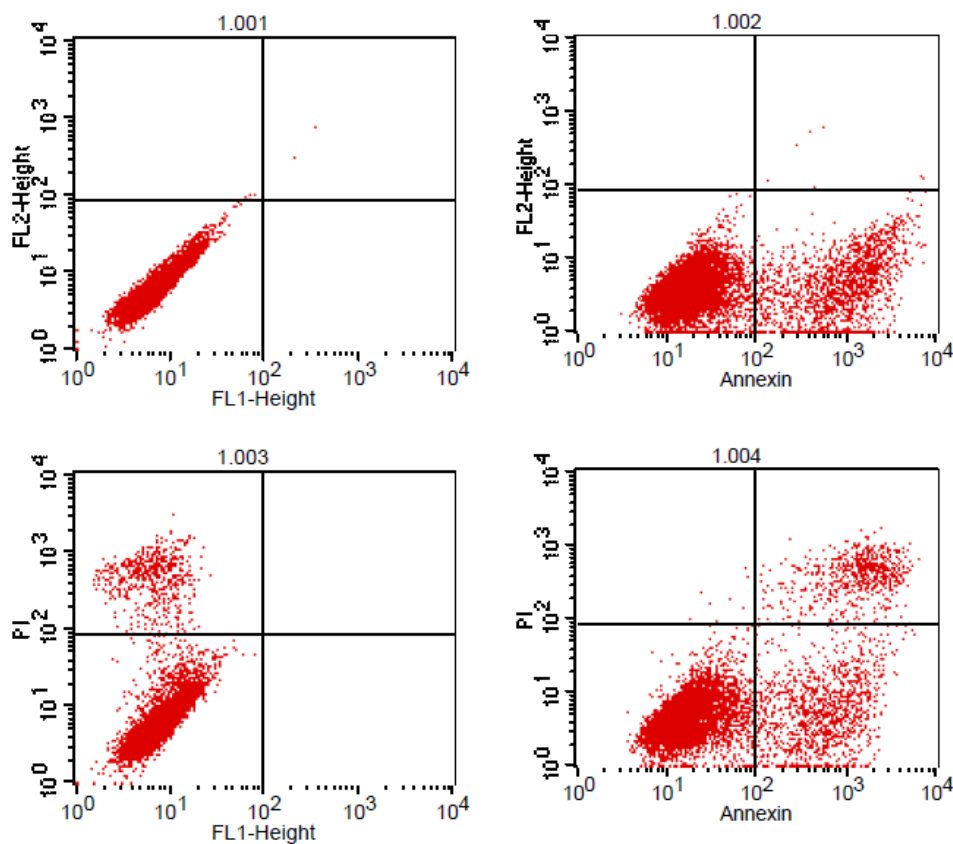
注意：PI 有毒，并具有潜在的致癌性。操作时注意安全，要戴手套。

步骤：

1. 用去离子水将 10×Annexin V 的 Binding Buffer 稀释为 1×。
2. 取外周血 200uL, 在每管中加入 2mL 1×Lysing Solution (PharmLyse), 室温下避光孵育 10min
3. 将裂解好的外周血离心 1200rpm, 5min, 去上清液
4. 加入 2mL PBS, 混匀
5. 离心 1200rpm, 5min, 去上清液
6. 加入 250 μL 1×Binding Buffer, 重悬 (理想终浓度 10⁶ 细胞/mL), 分成 a, b, c, d 和 e 共 5 管各 50uL; 将 abcd 四管以 **50°C水浸泡 30s** (模拟诱导凋亡流程) 后按如下分组加入染料
7. 阴性对照: 不加任何染料
8. 单阳对照: 加入 5μL FITC Annexin V
9. 单阳对照: 加入 5μL PI
10. 样本管 1: 各加入 5μL FITC Annexin V 和 PI

11. 样本管 2（未诱导组）：各加入 5 μ L FITC Annexin V 和 PI
12. 将溶液轻轻地震荡后，避光在室温下（25 $^{\circ}$ C）孵育 15min
13. 分别加入 400 μ L 1 \times Annexin V Binding Buffer，在 1 小时内上机

检测结果实例：



说明：图中横坐标为 AV-FITC，纵坐标为 PI；左上是阴性对照管，用来调节电压和阈值；右上和左下两个样品为单阳标记管，用来调节 FITC 和 PI 荧光通道之间的补偿；右下角为试验样品管。在试验样品管图中：

左下象限是正常活细胞（AV-/PI-）

右下象限为早期凋亡（AV+/PI-）

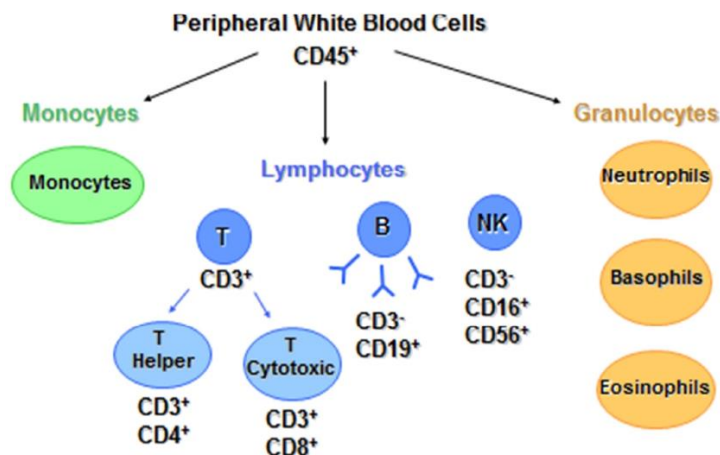
右上象限为晚期凋亡（AV+/PI+）

外周血淋巴细胞免疫染色：6C-TBNK 检测

原理：

人类的淋巴细胞按照表面抗原的表达可以被分成三大类：T 细胞（CD3+），B 细胞（CD19+）和 NK 细胞（Natural Killer 自然杀手）（CD16+CD56+）。这些淋巴细胞表面还会表达一些其他的抗原。根据这些抗原的表达，我们可以对某些疾病做出检测和诊断。例如：CD3+CD4+辅助 T 淋巴细胞的比例和绝对数量是检测 HIV 阶段的重要指标（随着 HIV 的加重，患者血液中 CD3+CD4+淋巴细胞的数量会逐渐减少）；CD3+CD4+淋巴细胞的比例和绝对数量以及 T 细胞和 B 细胞的总量也常常是诊断其他免疫缺失疾病和自免疫疾病的依据；表达 CD3-CD16+/CD56+的 NK 细胞往往对某些肿瘤细胞和被病毒感染的细胞有杀伤力，所以其数量是个体对该症状抵抗力的量化表达。

BD Multitest™ 6-color TBNK 试剂是为 BD FACSCanto™ 和 BD FACSCanto™II 设计的专门测量 T，B 和 NK 细胞比例与总数，T 细胞 CD4 和 CD8 亚群的试剂。（各类细胞绝对数的统计需使用 BD Trucount 的计数管）。



材料：

- 人外周血样本
- BD Multitest™ 6-color TBNK Reagent with BD Trucount Tubes (Cat# 337166) 或
- BD Multitest™ 6-color TBNK Reagent without BD Trucount Tubes (Cat# 644611)
 - CD3 FITC (T 细胞检测)
 - CD16 & CD56 PE (NK 细胞检测)
 - CD45 PerCP-Cy5.5 (淋巴细胞分群)
 - CD4 PE-Cy7 (T 辅助细胞检测)
 - CD19 APC (B 细胞检测)
 - CD8 APC-Cy7 (细胞毒性 T 细胞亚群检测)

注意：试剂中含有叠氮化钠作为防腐剂，请勿吞食。

步骤：

1. 把 50 μ L 外周血加入上样管中。（可以使用一般的流式管，也可以是 Trucount 管子。如果使用 Trucount 的管子，则要确保底部的微粒的完整性。使用 Trucount 管可以算比例和绝对计数，使用一般流式管只能算比例）
2. 在样本中加入 20 μ L BD Multitest™ 6C-TBNK 试剂，用移液枪混匀。
3. 避光在室温下孵育 15min。
4. 避免直射光，在样本中加入 450 μ L 1 \times 的 FACS lysing solution（裂解液），混匀。
5. 避光在室温下孵育 15min。
6. 6 小时（避光室温）内上机。

注意：上机前 FACSCanto、FACSCantoII 和 FACSCanto 10C 要先用 BD FACS 7-color setup beads (335775)在 FACSCanto 临床软件中设置实验条件（电压和补偿）。

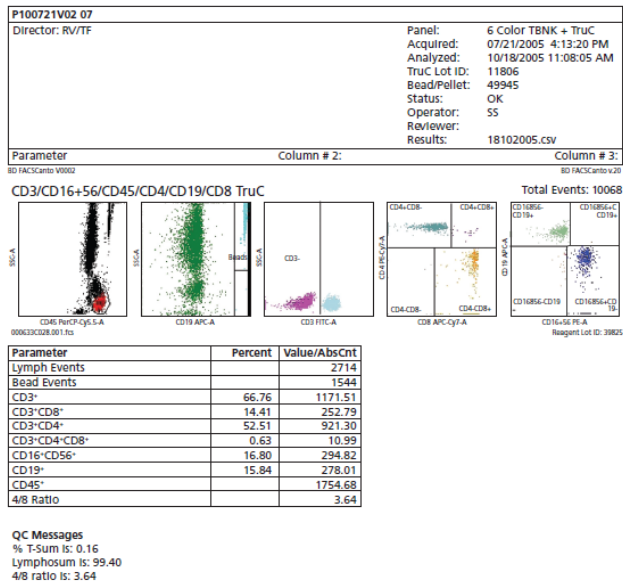
检测结果实例：

Figure 1. Example of data from a BD FACSCanto laboratory report obtained for a BD Multitest 6-color TBNK assay with BD Trucount tubes.

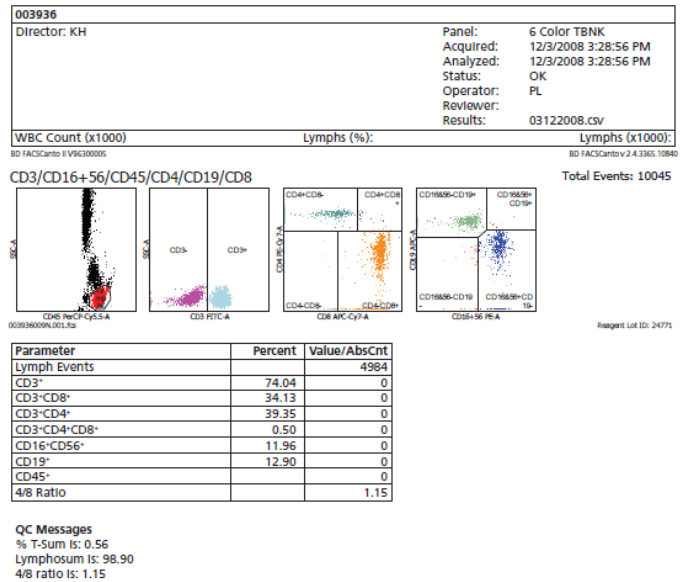


Figure 2. Example of data from a BD FACSCanto laboratory report obtained for a BD Multitest 6-color TBNK assay without BD Trucount tubes.

外周血淋巴细胞免疫染色：4-C TBNK 检测

BD Multitest™ IMK 试剂是为 BD FACSCalibur™, BD FACSCanto™ 和 BD FACSCanto™II 设计的专门测量 T, B 和 NK 细胞比例与总数的试剂。(各类细胞绝对数的统计需使用 BD Trucount 的计数管)。

材料：

- 外周血
- BD Multitest™ 4-color TBNK Reagent with BD Trucount Tubes (Cat# 340504)
 - BD Multitest™ CD3 FITC / CD8 PE / CD45 PerCP / CD4 APC reagent
 - BD Multitest™ CD3 FITC / CD16 PE + CD56 PE / CD45 PerCP / CD19 APC reagent
 - BD FACS™ Lysing Solution
 - BD Trucount™ tubes
- 或
- BD Multitest™ 4-color TBNK Reagent without BD Trucount Tubes (Cat# 340503)
 - BD Multitest™ CD3 FITC / CD8 PE / CD45 PerCP / CD4 APC reagent
 - BD Multitest™ CD3 FITC / CD16 PE + CD56 PE / CD45 PerCP / CD19 APC reagent
 - BD FACS™ Lysing Solution

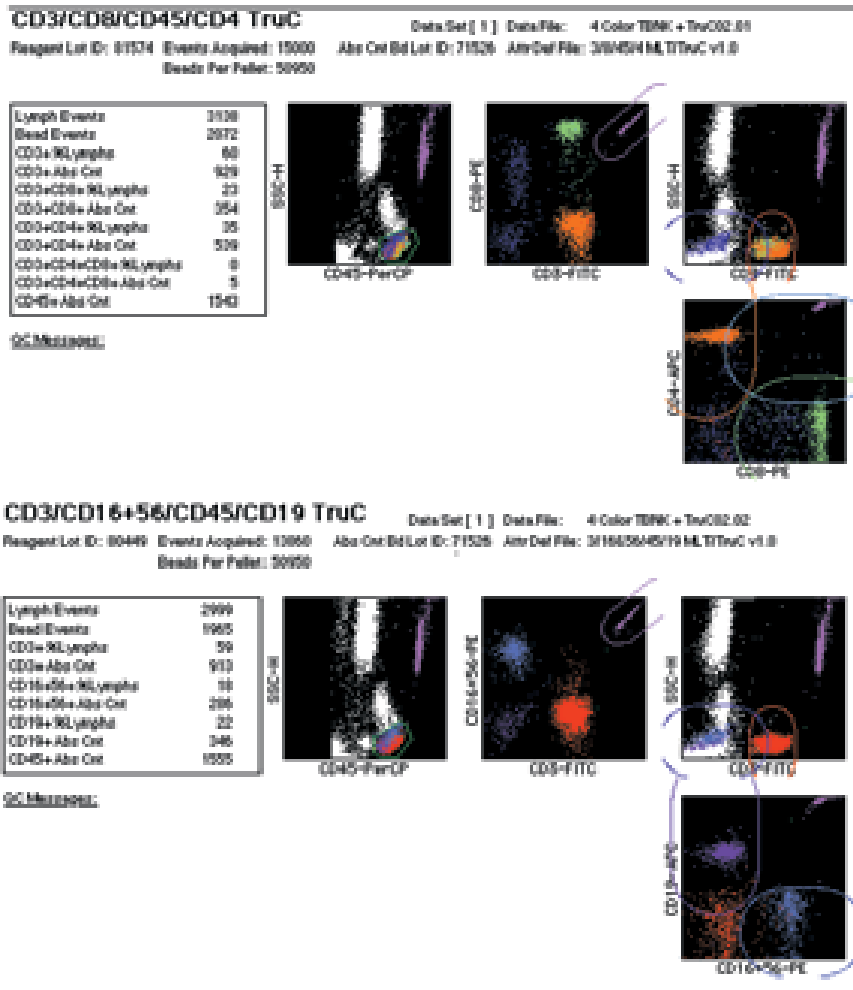
注意：试剂中含有叠氮化钠作为防腐剂，请勿吞食。

步骤：

1. 每一管病人的样品准备两个空的流式管，标记为 A 和 B。
2. 在 A 和 B 管中各加入 50 μL 外周血。(可以使用一般的流式管，也可以是 Trucount 管子。如果使用 Trucount 的管子，则要确保底部的微粒的完整性。使用 Trucount 可以算比例和绝对计数，使用一般流式管只能算比例)
3. 在 A 样本管中加入 20 μL BD Multitest™ CD3/CD8/CD45/CD4 试剂，用移液枪混匀。
4. 在 B 样本管中加入 20 μL BD Multitest™ CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 试剂，用移液枪混匀。
5. 避光在室温下孵育 15min。
6. 避免直射光，在样本中加入 450μL 1×的 FACS lysing solution (裂解液)，混匀。
7. 避光在室温下孵育 15min。
8. 6 小时 (避光室温) 内上机。

注意：上机前 FACSCanto、FACSCantoII 和 FACSCanto 10C 要先用 BD FACS 7-color setup beads (335775)在 FACSCanto 临床软件中设置实验条件 (电压和补偿)。FACSCalibur 要用 BD Calibrite3 和 APC beads (340486, 340487) 在 FACSComp 软件中通过 Lyse/NoWash 质控 (即设置好实验的电压和补偿)。

检测结果实例：



HLA-B27 检测

原理：

HLA-B27 是 MHC class I 的一种。HLA-B27 抗原的表达与强直性脊柱炎以及其他一些免疫性风湿病有很强的关联。90%的强直性脊柱炎病人表达 HLA-B27，而正常人中只有 8%表达。

BD HLA-B27 Kit (Cat# 340183) 可以对裂红后的全血中的 HLA-B27 表达进行快速准确的检测。适用于 BD FACSCantoII，FACSCanto 10C 和 FACSCalibur 流式细胞仪的自动软件。

材料：

- 人外周血样本
- Reagent A，Anti-HLA-B27 FITC/CD3 PE
- Reagent B，10× BD FACS Lysing Solution
- Reagent C，HLA-B27 Calibration Beads

注意：试剂中含有叠氮化钠作为防腐剂，请勿吞食。

步骤：

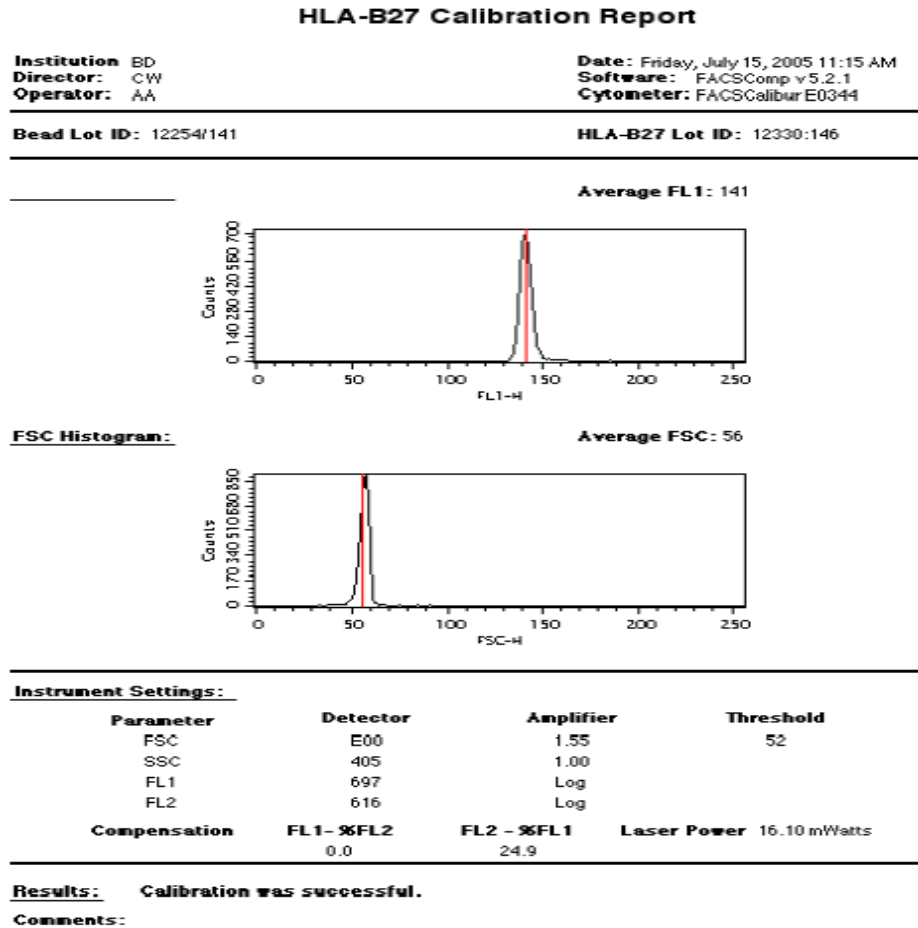
1. 把 30 μ L Reagent A 加入上样管中。
2. 在样本管中加入 50 μ L 全血（ $3.5-9.4 \times 10^3$ WBC/ μ L），用移液枪混匀。
3. 避光在室温下孵育 15-20min。
4. 在样本中加入 2mL 1×的 FACS lysing solution（裂解液），混匀。
5. 避光在室温下孵育 10-12min。（不要时间过长，不然白细胞也会被裂解）
6. 立即离心 1200rpm，5min，去上清液。
7. 加入 2mL PBS，混匀。
8. 离心 1200rpm，5min，去上清液。
9. 加入 500 μ L PBS，混匀。
10. 24 小时（避光 2-8 度）内上机。

注意：

1. 在 FACSCalibur 上需要事先用 BD Calibrite3 和 APC beads（Cat# 340486，Cat# 340487）在 FACSComp 软件中通过 Lyse/Wash 质控。
2. 上机前要准备 HLA-B27 Calibration Beads（Reagent C）：把 HLA-B27 Calibration Beads 混匀；在流式管中加 300 μ L PBS，加 1 滴 HLA-B27 Calibration Beads；上样并使用 FACSComp（FACSCalibur）或 FACSCanto（FACSCanto 和 FACSCantoII）软件进行质控。

检测结果实例：

FACSCalibur



FACSCanto

