

细胞亚群的识别与分析是流式细胞术的重要应用之一，尤其体现在该技术可在同一样本中同时识别多种分子标志物。因此，多色流式细胞术是血液样本免疫表型分析的最常用方法之一。

在某些应用中，同时使用多个标记物在单个样本中进行分析与使用少量标记物在多个样本中多次分析相比，前者来说能简化实验流程并节约抗体用量，在实验设计上也无需考虑多次分析时的内参抗体问题，因此多色分析显然比多次分析来说会更强大更有效。当然，这需要有一台功能强大的流式细胞仪，具备在同一样本中能够实现多种颜色的识别和分析的功能。

这里我们介绍 ACEA NovoCyte3130，一台体积紧凑的配备 3 个激光器具有 13 个荧光通道同时检测能力的高性能流式细胞仪，结合 13 色荧光标记物，对人血样本进行免疫分析的具体案例。

在该实验中，选择合适的对照及优化抗体浓度非常重要。在这里，通过利用 NovoExpress 软件对 T 细胞、B 细胞亚群和其他白细胞进行数据采集和分析，结果表明，利用 NovoCyte 结合 13 色抗体组合能够完成高度复杂的流式实验，获取到高质量的结果。

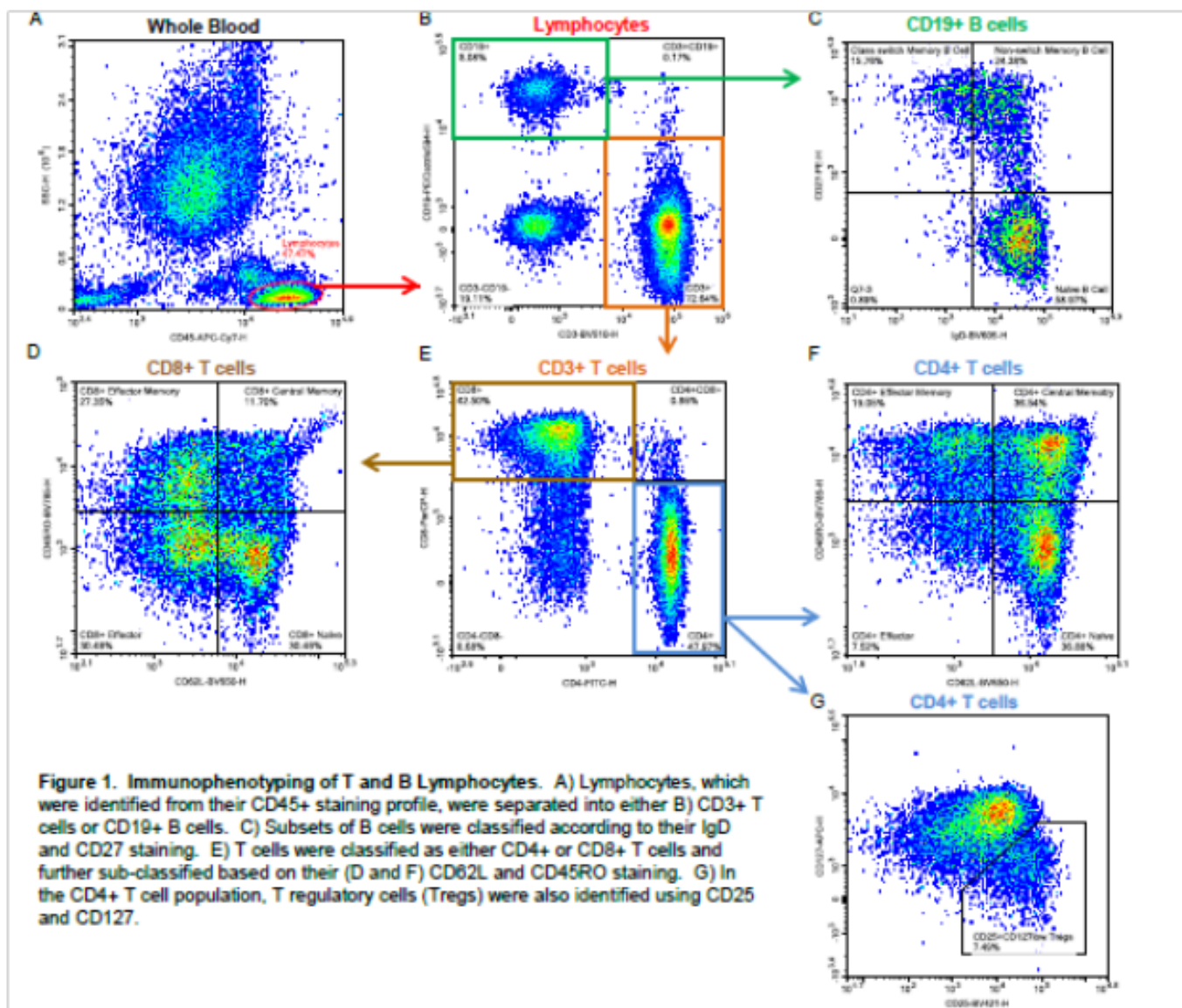


图 1 . T 细胞及 B 细胞淋巴亚群分析。A) 通过 CD45 确定淋巴细胞亚群, 进而区分 B) CD3+T 细胞和 CD19+B 细胞。C) B 细胞亚群根据 IgD 和 CD27 进行分类。E) T 细胞又可分为 CD4+ 和 CD8+T 细胞, 二者又可基于 CD62L 和 CD45RO 进一步分类 (D 和 F)。在 CD4+T 细胞群中, 通过 CD25 和 CD127 可区分出调节性 T 细胞 (Tregs)。

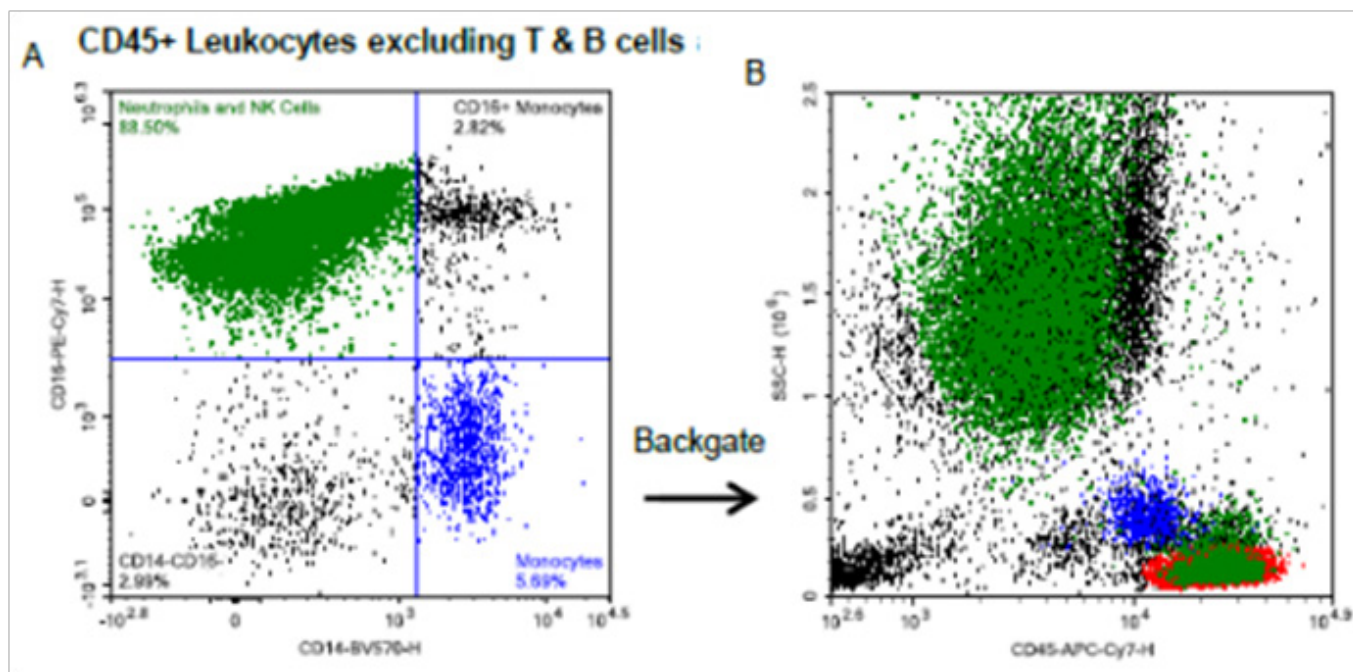


图 2. 淋巴细胞亚群和非淋巴细胞亚群免疫表型分析。

A) 通过 CD45+ 圈门确定中性粒细胞和 NK 细胞群, 并排除了 CD16+/CD14- 的 T 淋巴细胞和的 B 细胞。单核细胞的分析仍然使用该细胞群, 其中 CD14+ 单阳性和 CD14+/CD16+ 双阳性细胞群为单核细胞。

B) A 图中的细胞群是通过对 B 图的 CD45 vs SSC 进行反向圈门得到。

### 方法：

1、向人外周血血样本中加入如下表所示的荧光标记混合抗体, 共 13 种荧光抗体, 表中详细描述了全部 13 种抗体的种类和所选用的荧光素及在 NovoCyte3110 上使用的荧光通道。

13-color Antibody Panel			
Laser	FL channel on NovoCyte	Format	Specificity
405nm	VL1	BV421	CD25
	VL2	BV510	CD3
	VL3	BV570	CD14
	VL4	BV605	IgD
	VL5	BV650	CD62L
	VL6	BV785	CD45RO
488nm	BL1	FITC	CD4
	BL2	PE	CD27
	BL3	PE/Dazzle 594	CD19
	BL4	Per CP	CD8
	BL5	PE-Cy7	CD16
640nm	RL1	APC	CD127
	RL2	APC-Cy7	CD45

- 2、室温避光孵育 30 分钟。加入 2ml 1XRBC ( 红细胞裂解液, ACEA Biosciences ) 混匀, 孵育 15 分钟以裂解红细胞。
- 3、样本洗涤后用 1% 多聚甲醛固定, NovoCyte3110 上机检测。使用 NovoExpress 软件的自动补偿功能: 先用微粒样品获取单管补偿值, 再将各通道补偿应用到血液样本。为确保圈门的准确性同时采用了 FMO ( Fluorescence Minus One ) 对照。

### 结论:

ACEA NovoCyte3130 为艾森生物智能化流式细胞仪的最高端配置, 配置了三个带 TEC 精确温控功能的全固体激光器及十三个荧光通道, 再加上强大的集仪器控制、数据采集及数据分析于一体的软件 NovoExpress, 同时易于使用的一键开关机、免调电压及自动补偿等实用功能, 使得复杂的亚群分析变得非常简单, 既能得到高质量的实验分析结果同时也大大节约了实验时间和试剂的消耗。

### 参考文献:

Maecker TH, McCoy JP, and Nussenblatt R. Nature Immunol. 2012 Feb 17; 12(3): 191–200

