人外周血免疫细胞亚群 25 色流式全景分析

Immune Cell Landscape of Human Peripheral Blood by 25 Colors Flow Cytometry

章晶晶, 沈蕾*

上海交通大学医学院, 上海市免疫学研究所, 上海

*通讯作者邮箱: lshen@shsmu.edu.cn

引用格式: 章晶晶, 沈蕾. (2019). 人外周血免疫细胞亚群 25 色流式全景分析. *Bio-101* e1010325.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010325.

How to cite: Zhang, J. J. and Shen, L. (2019). Immune Cell Landscape of Human Peripheral Blood by 25 Colors Flow Cytometry. *Bio-101* e1010325. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010325. (in Chinese)

摘要: 人外周血是最容易获取的人体样本, 在医学类科研工作中至关重要。如何最大化、最高效地观察和利用有限的人外周血标本, 通过一次实验检测得到更多的结果指标, 对现有的实验研究意义重大。因此本文主要描述如何进行 25 色流式检测及介绍相关分析方法, 通过对单个细胞同时检测 25 个参数, 可以实现对外周血各种免疫细胞亚群的全景式描述, 以及对某种细胞亚群的深度表型分析。

关键词: 人外周血, 亚群分类, 25 色流式分析

材料与试剂

材料:

1. 15 ml 离心管 (Corning, catalog number: 430791)
2. 10 ml 移液管 (Corning, catalog number: 4488)
3. 1.5 ml 离心管 (Axygen, catalog number: MCT-150-C)
4. 96 孔圆底板 (Corning, catalog number: 351177)
5. BD Falcon 流式管 (Corning, catalog number: 352052)
6. 70 μ m 滤膜 (Corning, catalog number: 352350)
7. 肝素抗凝管

试剂:

1. Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control Compensation Particles Set (Ms Ig Kpa Comp Bead Set 6Ml, BD Biosciences, catalog number: 552843)
2. Lonsera 乌拉圭 (南美) 特级胎牛血清 (Lonsera, catalog number: S711-001S)
3. Lymphoprep (Stemcell, catalog number: 07851)
4. 20× PBS 缓冲液 (生工, catalog number: B548117)
5. 0.5 mol/L EDTA (生工, catalog number: B300599)
6. Trypan Blue 0.4% solution in 0.85% NaCl (Lonza, catalog number: 17-942E)
7. 1x PBS (见溶液配方)
8. FACS buffer (见溶液配方)
9. 抗体混合物 (见溶液配方)

抗体:

1. Mouse antihuman CD32-BUV395 (BD Biosciences, custom)
2. Mouse antihuman CD16-BUV496 (BD Biosciences, custom)
3. Mouse antihuman CD19-BUV563 (BD Biosciences, custom)
4. Mouse antihuman IgD-BUV615 (BD Biosciences, custom)
5. Mouse antihuman CD4-BUV661 (BD Biosciences, custom)
6. Mouse antihuman CD64-BUV737 (BD Biosciences, custom)
7. Mouse antihuman CD14-BUV805 (BD Biosciences, custom)
8. Mouse antihuman CD57-BV421 (BD Biosciences, custom)
9. Mouse antihuman CD3-BV480 (BD Biosciences, custom)
10. Mouse antihuman CD15-BV650 (BD Biosciences, custom)
11. Mouse antihuman CD27-BV711 (BD Biosciences, custom)
12. Mouse antihuman CD20-BV750 (BD Biosciences, custom)
13. Mouse antihuman CD197-BV786 (BD Biosciences, custom)
14. Mouse antihuman CD45RA-BB515 (BD Biosciences, custom)
15. Mouse antihuman TCRgd-BB630 (BD Biosciences, custom)
16. Mouse antihuman CD195-BB660 (BD Biosciences, custom)
17. Mouse antihuman CD8-Percp-cy5.5 (BD Biosciences, custom)
18. Mouse antihuman CD38-BB790 (BD Biosciences, custom)
19. Mouse antihuman CD11c-PE (BD Biosciences, custom)

20. Mouse antihuman CD13-PE-CF594 (BD Biosciences, custom)
21. Mouse antihuman CD123-PE-Cy5 (BD Biosciences, custom)
22. Mouse antihuman CD25-PE-Cy7 (BD Biosciences, custom)
23. Mouse antihuman CD127-AF647 (BD Biosciences, custom)
24. Mouse antihuman CD56-APC-R700 (BD Biosciences, custom)
25. Mouse antihuman HLA-DR-APC-H7 (BD Biosciences, custom)

仪器设备

1. 实验室 2 级生物安全柜 (Thermo Scientific™ 1300 Series A2 Biological Safety Cabinet Packages)
2. 高速离心机 (Thermo Scientific™ Sorvall™ ST 40 离心机)
3. 倒置相差显微镜 (Olympus, model: CKX41)
4. 血细胞计数板 (Sigma-Ardrich, model: BR717805-1EA)
5. X30 流式细胞分析仪 (BD FACSymphony™ 系统)
6. 电动移液器 (Eppendorf, model: 4430000018)

实验步骤

一. 人外周血免疫细胞的制备 (Gupta 等, 2013)

1. 准备洁净的 15 ml 离心管，倒入 3 ml lymphoprep。抽取健康人外周血置于肝素抗凝管中备用，在无菌的 15 ml 离心管中加入 3 ml 人外周血，再加入 3 ml 1× PBS 后 (文中未特殊说明均为 1× PBS) 进行混匀稀释。左手倾斜离心管，右手用移液器吸取稀释后的外周血缓慢加到 lymphoprep 表面，形成密度梯度。在加入外周血的过程中，可适当缓慢摆正离心管，注意加液体时要轻柔，移液器的速度调整到最低，以免将 lymphoprep 和外周血混匀 (图 1)。

图 1. 密度梯度离心上样结果示意图

2. $400 \times g$, 20 min, 升速 (ACC) 1, 降速 (DEC) 0, 室温进行密度梯度离心。
3. 离心结束后离心管内液体分为 5 层, 从上到下分别为: 血浆, 外周血单个核免疫细胞 (包括外周血单核细胞和淋巴细胞等), lymphoprep, 粒细胞, 红细胞 (图 2)。准备干净的 15 ml 离心管, 加入 10 ml PBS, 用吸管吸取第二层的外周血免疫细胞并转入含有 PBS 的离心管中, 上下颠倒后放入离心机 $800 \times g$, 10 min 室温离心 (视频 1)。

图 2. 密度梯度离心产物示意图

视频 1. 吸取密度梯度离心后中间层淋巴细胞和单核细胞的过程

4. 离心结束后去上清，轻弹管底，再加入 10 ml PBS，上下颠倒后放入离心机 $400 \times g$ ，5 min 室温离心。
5. 重复步骤 4 清洗外周血免疫细胞以彻底去除残留的 lymphoprep。

6. 最后得到的细胞沉淀就是外周血免疫细胞，可用 PBS 重悬细胞后进行细胞计数。
理论上，1 ml 外周血可得到 1×10^6 左右外周血免疫细胞。

二. 25 色流式染色实验 (参考文献 1)

25 色流式染色和正常流式染色步骤一致，本实验研究的 25 色全景分析所用的抗体均为表面抗体，因此只需要进行常规流式表面染色。

1. 配制抗体混合物。一个反应体系为 100 μ l，按照抗体说明书建议的最佳稀释比例 (2.5 μ l/test) 用 FACS buffer (见溶液配方) 对不同的抗体进行稀释。

注：由于最终体积为 100 μ l，且人相关抗体的使用量较多，所以溶剂 FACS buffer 的体积需要减去各个抗体的使用体积。且所有的抗体需要避光操作，避免荧光猝灭；抗体开盖之前需要先离心避免管壁上的抗体飞溅引起浪费；抗体不易长时间在室温放置，建议置于冰上使用。

2. 取 1×10^6 个外周血免疫细胞，用抗体混合物重悬细胞，置于 96 孔板中，充分混匀后 4 °C 避光孵育 30 min。
3. 染色结束后，直接加入 150 μ l FACS buffer 清洗细胞，400 x g，5 min 室温离心。
4. 离心结束后去上清，用 300 μ l FACS buffer 分两次重悬细胞沉淀，再将细胞通过 70 μ m 滤膜过滤到流式管中，即可上机观察。
5. 在表面染色的过程中，我们需要制作 25 色染色方案的单染管用于流式自动调节补偿。取 26 个流式管，分别标上各个通道的荧光名称，第 26 个为空白管，每个流式管中加入两滴 Ms Ig Kpa Comp Bead (约有 50 μ l 的体积)，混匀后，对应管壁上标注的荧光通道加入之前染色使用的表面抗体各 0.25 μ l，1:200 稀释。充分振荡混匀后 4 °C 避光孵育 15 min，各加入 400 μ l FACS buffer，混匀后即可用于流式分析。

注：Ms Ig Kpa Comp Bead 使用前需要充分摇匀。

三. 25 色全景分析 (van der Maaten 和 Hinton, 2008; Wallach 和 Liliean, 2009; Monaco 等, 2016)

得到流式结果后，需要使用正版 flowjo V10 软件对结果进行全面分析 (视频 2)。

视频 2. 各类淋巴细胞圈门过程

1. 在 flowjo V10 中导入数据后，我们需要对 25 色补偿进行手动调整。主要是因为小球调整的补偿和细胞真实的补偿存在一定的差异，所以还需要手动确认 (图 3)。

图 3. 手动确认补偿的结果对比图

2. 去除原始数据中由于液流不稳定等机器原因导致的噪音信号。主要使用 plugin 插件中的 flow AI 得以实现 (图 4)。

注：使用 flow AI 选择参数时，必须选中 time 参数，不然将无法计算相关参数。

图 4. 运行 flow AI 的参数选择

- 运行结束后，我们将看到原始数据拆分成了 bad events 和 good events 两项。之后我们可以对 good events 进行常规的圈门统计分析 (图 5)。

图 5. Flow AI 运行后的结果界面

4. 正版 flowjo 包含了很多实用性的插件: t-SNE, SPADE, FlowSOM, Phenograph, UMAP 等等。其中本实验主要运用了 t-SNE 这个算法对 25 色结果进行全景分析。t-SNE 主要对多参数的数据进行降维分析, 通过定义纳入分析的参数通道, 算法可将细胞分成不同距离远近的点, 距离越远代表细胞相似度越低。我们在圈出的淋巴细胞的基础上, 先 downsample 出 7 万个淋巴细胞, 针对这 7 万个细胞, 我们选中除 FSC、SSC 相关参数以外的所有补偿后的荧光参数 (一共 25 个通道参数), 进行 t-SNE 分析 (图 6, 视频 3)。

图 6. t-SNE 分析的参数选择

视频 3. t-SNE 分析教程

5. 分析结束后，结合传统的淋巴细胞亚群定义 (即结果图 7 中的圈门方法)，我们在 layout 界面将这几群细胞以 t-SNE1 和 t-SNE2 为横纵坐标的点图 merge 在一起并导出，结束分析。

结果与分析

本实验先根据细胞大小和包含的颗粒度，即 FSC 和 SSC，将人外周血免疫细胞主要分成淋巴细胞群和单核细胞群等。然后，我们观察了 CD3、CD19 的表达情况，其中 CD3⁺ 为 T 细胞群，占白细胞 64.6%，CD19⁺ 为 B 细胞群，占白细胞 8.45%。细分 T 细胞，通过 CD4 和 CD8，可以将 T 细胞分为辅助 T 细胞和杀伤性 T 细胞，两者分别占 T 细胞的 64% 和 30%。对于辅助 T 细胞，我们还检测了其中一个亚群 Treg 的比例，其约占辅助 T 细胞的 7.85%。CD3⁺CD56⁺ 的细胞群为 NKT 细胞，大约占 T 细胞的 5.72%。细分 B 细胞，IgD⁺ 的 naïve B 细胞约占总 B 细胞的 52.1%，CD27⁺ 的记忆 B 细胞约占总 B 细胞的 27%。

图 7. 人外周血免疫细胞亚群分类。根据文献报道的不同免疫细胞亚群的定义，在本次实验中主要划分了 T 细胞 (CD3⁺)、B 细胞 (CD19⁺)、NKT 细胞 (CD3⁺CD56⁺)、NK 细胞 (CD3⁺CD19⁻CD16⁺CD56⁺)、DC (CD3⁺CD19⁻CD56⁺HLA DR⁺)、单核细胞 (CD3⁺CD19⁻CD14⁺) 等不同免疫细胞亚群。

CD3⁻CD19⁻的双阴性细胞群既包含淋巴细胞群又包含单核细胞群。因此根据 CD14 的表达情况和细胞内颗粒度 (SSC)，可将细胞群划分为 CD14⁺单核细胞群和 CD14⁻淋巴细胞群。细分 CD14⁻CD3⁻CD19⁻淋巴细胞群，其中 CD56⁺为 NK 细胞，约有 84.9%的细胞高表达 CD94，用于识别 MHC I。而 CD56⁻为 DC 细胞群，其中约有 52.3%表达 HLA-DR。存在的问题是，本次实验关于单核细胞群的分类并不明显，猜测是本次样品粒细胞群不明显的问题。通过 25 色大 panel，我们可以最大程度一次性观察所有人外周血免疫细胞亚群并得到相应的细胞比例。

图 8. 人外周血免疫细胞群的 t-SNE 分析。取 7 万个免疫细胞进行 t-SNE 分析，分析参数为补偿后的 25 个 maker。A. 流式圈门后的不同细胞群显示 t-SNE 界面并合并在一起得到细胞群降维后的分布形态。B. 在 t-SNE 分布图上根据每个细胞 CD45RA 的表达情况 (即平均荧光强度) 做的热图，红色代表 CD45RA 表达高，蓝色代表表达低。

t-SNE 全称 t-distributed stochastic neighbor embedding，可将多维参数经迭代计算后在二维坐标轴上进行展示。通过计算，t-SNE 分布图由多个散点组成，每个散点代表一个细胞，两个散点之间的距离代表着两个细胞的相似程度。距离越近，则相似程度越高。另外，在正版 flowjo V10 版本中，还可以观察 t-SNE heatmap，即在 t-SNE 坐标轴中展示某一个参数的表达水平。在图 8A 中，最明显的比例最高的红色细胞群为辅助 T 细胞，粉色的 Treg 细胞群位于其中，这与 Treg 属于辅助 T 细胞这一常识相一致，说

明本次 t-SNE 分析可信。由于 NKT 细胞表达 CD4 或 CD8，因此一部分 NKT 亚群靠近辅助 T 细胞，一部分 NKT 靠近杀伤性 T 细胞，因而紫色的 NKT 细胞表现出很高的异质性。因为 t-SNE 是综合 25 个参数进行的分析，所以我们可以发现不同淋巴细胞内部的异质性。图 8B 中 T 细胞的异质性主要体现在 CD45RA 的表达上，由于不同的 T 细胞关于 CD45RA 的表达不一致，从而出现明显的亚群分类。另外，加入其它有意义的 marker，有助于发现新的细胞亚群。

失败经验

1. 人外周血免疫细胞制备的失败

制备失败的主要原因通常是密度梯度离心出现问题。一方面，可能是加入的 lymphoprep 和血液混匀了，那样将无法形成密度梯度，也就无法得到人外周血免疫细胞。另一方面，可能是离心出现问题。为了保证密度梯度稳定存在，离心机降速必须调至最小，否则高降速会导致 lymphoprep 和血液混匀，无法形成密度梯度。一般注意以上两点就可成功得到外周血免疫细胞。

2. 流式结果无法得到正常细胞分群

有很多因素会导致这个问题：1)抗体有问题。由于 25 色大 panel 中的抗体存在很非常见荧光和克隆号，以及一些定制抗体的存在，我们拿到新抗体必须先检测抗体是否可用，才能用于后续的正式实验。2)补偿有问题。25 色大 panel 中用到了 25 种荧光通道，很多通道的接收波段非常接近，且荧光存在溢漏，会导致补偿问题很严重。所以除了最初花费大量精力在上机时调整最佳电压，我们还需要在分析数据时手动二次确认补偿，以减小最后的误差。3)样本的问题，对此需要重新挑选病人血样、优化样品制备流程。

溶液配方

1. 1× PBS

用双蒸水稀释 20× PBS 得到

121 °C、20 min 高压灭菌后室温保存

2. FACS buffer

在 PBS 中加入 1% FBS 和 2 mM EDTA

4 °C 保存

3. 抗体混合物

在 37.5 μ l FACS buffer 中各加入 2.5 μ l 表面抗体，共 25 种抗体合计 62.5 μ l，最终一个样本的反应体积为 100 μ l

致谢

感谢沈蕾实验室各位研究生同学对本实验方法的帮助和改进。本实验得到国家自然科学基金项目 (81571533) 的资助。

参考文献

1. Affymetrix. (2008). [Staining cell surface targets for flow cytometry](#). *Flow Cytometry-BestProtocols*® 1-5.
2. Gupta, R., Puleo, A. and Maecker, H. (2013). [Isolation of PBMCs-Direct Overlay on Ficoll \(Heparin\)](#). *Standard Operating Protocol-HIMC* 1.4.
3. Monaco, G., Chen, H., Poidinger, M., Chen, J., de Magalhaes, J. P. and Larbi, A. (2016). [flowAI: automatic and interactive anomaly discerning tools for flow cytometry data](#). *Bioinformatics* 32(16): 2473-2480.
4. van der Maaten, L. and Hinton, G. (2008). [Visualizing data using t-SNE](#). *J Mach Learn Res* 9: 2579-2605.
5. Wallach, I. and Liliean, R. (2009). [The protein-small-molecule database, a non-redundant structural resource for the analysis of protein-ligand binding](#). *Bioinformatics* 25 (5): 615-620.