

人全血NK细胞免疫学表型及生物学功能分析

自然杀伤细胞(Natural killer cell, NK)是机体重要的免疫细胞,作为天然淋巴细胞, NK细胞在免疫监视和随后的宿主防御病毒感染和癌细胞中至关重要。因此基于NK细胞的免疫疗法因其有效性和特异性抗肿瘤而备受瞩目。使用流式细胞术分析NK细胞,有助于多参数灵活地鉴定NK细胞,纯度验证,功能分析从而深入地表征NK细胞。

目前,我们开发三个人NK细胞流式分析配色方案,建立稳定的经优化和验证的NK细胞活性检测方案,旨在为多色流式表征NK细胞的表型、增殖以及功能提供更完整、更全面的方法。

人全血NK细胞免疫表型及功能分析

NK细胞是非常重要的先天性免疫细胞,可以通过细胞毒性以及释放促炎因子来响应病毒侵染以及肿瘤发生。根据人NK细胞表面CD56表达情况, NK细胞一般可以分为两个亚群:其中CD56^{dim} NK细胞主要体现细胞毒性,表达高水平CD16A (FcR3a),并迅速介导ADCC等细胞溶解功能;CD56^{bright}细胞表达低水平CD16A但产生大量细胞因子。除了熟知的CD56, CD16以外, NK细胞也表达其他一些激活性受体,如NKG2D, CD94/NKG2C和自然杀伤受体,如NKp30, NKp44和NKp46等。NK细胞效应激活常用检测方式是通过检测脱颗粒标志物。溶酶体相关膜蛋白CD107a是囊泡膜蛋白组成部分,细胞毒性T淋巴细胞(Cytotoxic T Lymphocyte, CTL)或NK细胞杀伤靶细胞时,毒性颗粒将到达细胞膜并与其融合,此时CD107a会被转运至细胞膜表面并引起颗粒内容物释放,最终导致靶细胞死亡。本实验通过流式分析,采用部分典型标志物,分析了健康供体外周血单个核细胞在刺激条件下NK细胞分化和功能亚群表型及活化状态。

材料

- 健康人全血
- 流式管
- CD45小鼠抗人mAb, eFluor 506, 货号: 69-0459-42
- CD3小鼠抗人mAb, Super Bright 702, 货号: 67-0037-42
- CD4小鼠抗人mAb, PerCP-eFluor 710, 货号: 46-0047-42
- CD19小鼠抗人mAb, Super Bright 600, 货号: 63-0198-42
- CD14小鼠抗人mAb, Super Bright 600, 货号: 63-0149-42

- CD16小鼠抗人mAb, Alexa Fluor 700, 货号: 56-0168-42
- CD56小鼠抗人mAb, Super Bright 436, 货号: 62-0566-42
- CD57小鼠抗人mAb, eFluor 660, 货号: 50-0577-42
- CD107a/小鼠抗人mAb, PE-Cyanine7, 货号: 25-1079-42
- CD314小鼠抗人mAb, PE, 货号: 12-5878-42
- CD62L小鼠抗人mAb, FITC, 货号: 11-0629-42
- LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR, 货号: L34975
- CellTrace™ Violet, 货号: C34557
- eBioscience™ 细胞内固定与透化缓冲液套件, (eBioscience™ Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set) 货号: 88-8824-00
- eBioscience™ 流式细胞分析染色缓冲液, (eBioscience™ Flow Cytometry Staining Buffer) 货号: 00-4222-26
- Attune NxT流式细胞仪

抗体标记

1. 将新鲜制备的人PBMC以 2×10^5 个/孔接种于96孔板中;
2. 刺激培养3-5天后, 吸取100 μ L 混匀的细胞至试管内。
3. 按照产品说明书中所示, 将表面抗体加入步骤2中的试管内, 轻轻混匀;
4. 4°C避光孵育30分钟;
5. 离心弃上清, 加入150 μ L staining buffer, 350xg水平离心6分钟, 弃上清;

- 加入100μL Fixation & Permeabilization Buffer进行细胞固定，混合均匀，4℃避光孵育20分钟；
- 离心弃上清，加入1xPermeabilization Buffer进行离心洗涤；
- 加入稀释于1xPermeabilization Buffer的CD107a小鼠抗人 PE-cy7抗体，4℃避光孵育30分钟；
- 离心弃上清，加入1xPermeabilization Buffer进行洗涤；
- 离心弃上清，加入200 μL staining buffer重悬细胞，上机检测。

设门策略

根据前向和侧向散射光对淋巴细胞和单核细胞设门，并根据FSC-A/FSC-H设门去除黏连细胞。在live CD45⁺白细胞和CD3⁺CD4⁺CD14⁺/CD19⁻设门内，再以CD56和CD16设门区分功能性NK细胞，其中CD56^{dim}CD16⁺表示毒性NK细胞，CD56⁺CD16⁻表示细胞因子高分泌型NK细胞。再以重叠直方图，分析CD56^{dim}CD16⁺设门内激活性NK细胞，包括CD314 (NKG2D) 和CD107a，以及原始归巢NK细胞(CD62L)。

小结

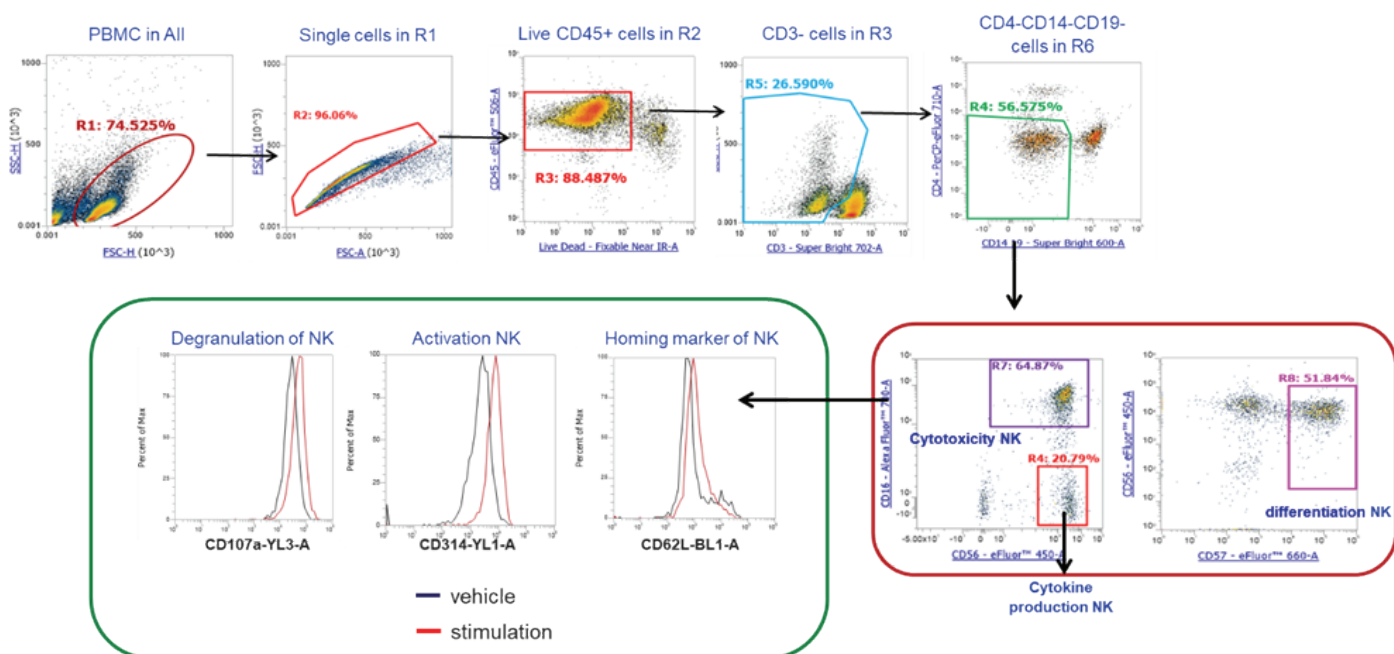
4激光14色的Attune NxT流式细胞仪在11色人全血NK细胞免疫表型及功能分析实验中能很好的体现细胞群体分辨能力。本实验通过流式分析，采用部分典型标志物，分析了健康供体外周血单个核细胞在刺激条件下NK细胞分化和功能亚群表型及活化状态。

数据采集和设门策略

对Attune NxT流式细胞仪使用下表所示的滤光片采集样本如图1所示，多参数分析中使用的设门策略如图2所示。

Dye	Excitation (nm)	Emission (nm)
Super Bright 436	405	450/40
eFluor 506	405	525/50
SB600	405	610/20
SB702	405	710/50
FITC	488	530/30
PerCP-eFluor 710	488	695/40
PE	561	585/16
PE-Cyanine7	561	780/60
eFluor 660	637	670/14
Alexa Fluor 700	637	720/30
LIVE/DEAD™	633	750/775
Fixable Near-IR		

图1.使用染料及检测通道



数据来源: 睿智化学

人全血NK细胞增殖分化及表型分析

NK细胞是非常重要的先天性免疫细胞，可以通过细胞毒性以及释放促炎因子来响应病毒侵染以及肿瘤发生。为了区分血液中的人NK细胞，CD3⁺CD56⁺是被广泛使用的标志物。在对人NK细胞分化亚群分析中，除了研究自然细胞毒性受体(Natural Cytotoxicity Receptors, NCR)和抑制性杀伤细胞免疫球蛋白样受体(Killer cell immunoglobulin-like receptors, KIR) 外，与分化相关的标志物L-选择素CD62L以及趋化因子CCR7两者均与NK细胞从外周血向淋巴组织的迁移相关。有报道表明，CCR7仅表达于CD56高表达亚群中。CellTrace™ Violet采用染料稀释法通过流式细胞分析追踪多代细胞，从而表征特定细胞亚群是否增殖传代。本实验通过流式分析，采用部分典型标志物，分析了健康供体外周血单个核细胞在刺激条件下，NK细胞增殖分化及其表型。

材料

- 健康人全血
- 流式管
- CD45小鼠抗人mAb, FITC, 货号: 11-0459-42
- CD3小鼠抗人mAb, eFluor 660, 货号: 50-0037-42
- CD56小鼠抗人mAb, PE, 货号: 12-0567-42
- CD197小鼠抗人mAb, Alexa Fluor 700, 货号: 25-1979-42
- CD62L小鼠抗人mAb, PerCP-eFluor 710, 货号: 46-0629-42
- LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR, 货号: L34975
- CellTrace™ Violet, 货号: C34557

- eBioscience™ 细胞内固定与透化缓冲液套件, (eBioscience™ Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set) 货号: 88-8824-00
- eBioscience™ 流式细胞分析染色缓冲液, (eBioscience™ Flow Cytometry Staining Buffer) 货号: 00-4222-26
- Attune NxT流式细胞仪

抗体标记

1. 将新鲜制备的人PBMC以 7×10^5 cells/well接种于24孔板中；
2. 刺激培养3-5天后，吸取100 μ L 混匀的细胞至试管内。
3. 按照产品说明书中所示，将表面抗体加入步骤2中的试管内，轻轻混匀；
4. 4°C避光孵育30分钟；
5. 离心弃上清，加入150 μ L staining buffer, 350 \times g水平离心6分钟，弃上清；
6. 加入100 μ L Fixation & Permeabilization Buffer进行细胞固定，混合均匀，4°C避光孵育20分钟；
7. 离心弃上清，加入1xPermeabilization Buffer进行离心洗涤；
8. 加入稀释于1xPermeabilization Buffer的CD197 小鼠抗人Alexa Fluor 700抗体，4°C避光孵育30分钟；
9. 离心弃上清，添加1xPermeabilization Buffer进行洗涤；
10. 离心弃上清，加入200 μ L staining buffer重悬细胞，上机检测。

CellTrace™ Violet 标记

1. 用含0.1%BSA的staining buffer重悬PBMC使其浓度为 1×10^7 cells/mL;
2. 向一瓶CellTrace Violet 染色液加入 20 μ L DMSO, 作为储备液;
3. 用PBS (含0.1%BSA) 将上述储备液进行1:1000稀释, 作为稀释液;
4. 将上述稀释液与新鲜制备的PBMC悬液以1:1轻轻混合, 混合后细胞浓度为 5×10^6 cells/mL;
5. 细胞于37°C避光孵育20分钟, 并每隔5分钟摇匀细胞;
6. 加入5倍体积培养基并混匀, 37°C 中避光孵育5分钟;
7. 离心弃上清, 加入培养基洗涤一遍;
8. 重悬细胞并计数。

设门策略

根据前向和侧向散射光对淋巴细胞和单核细胞设门, 并根据FSC-A/FSC-H设门去除黏连细胞。在live CD45+白细胞设门内, 用CD3-CD56+区分血液中的人NK细胞, 并在此设门内以CD62L和趋化因子CD197(CCR7)表征其分化以及归巢功能。同样, 该设门内以Celltrace violet标记出现的荧光信号降低迭代峰表征传代增殖部分NK细胞。

数据采集和设门策略

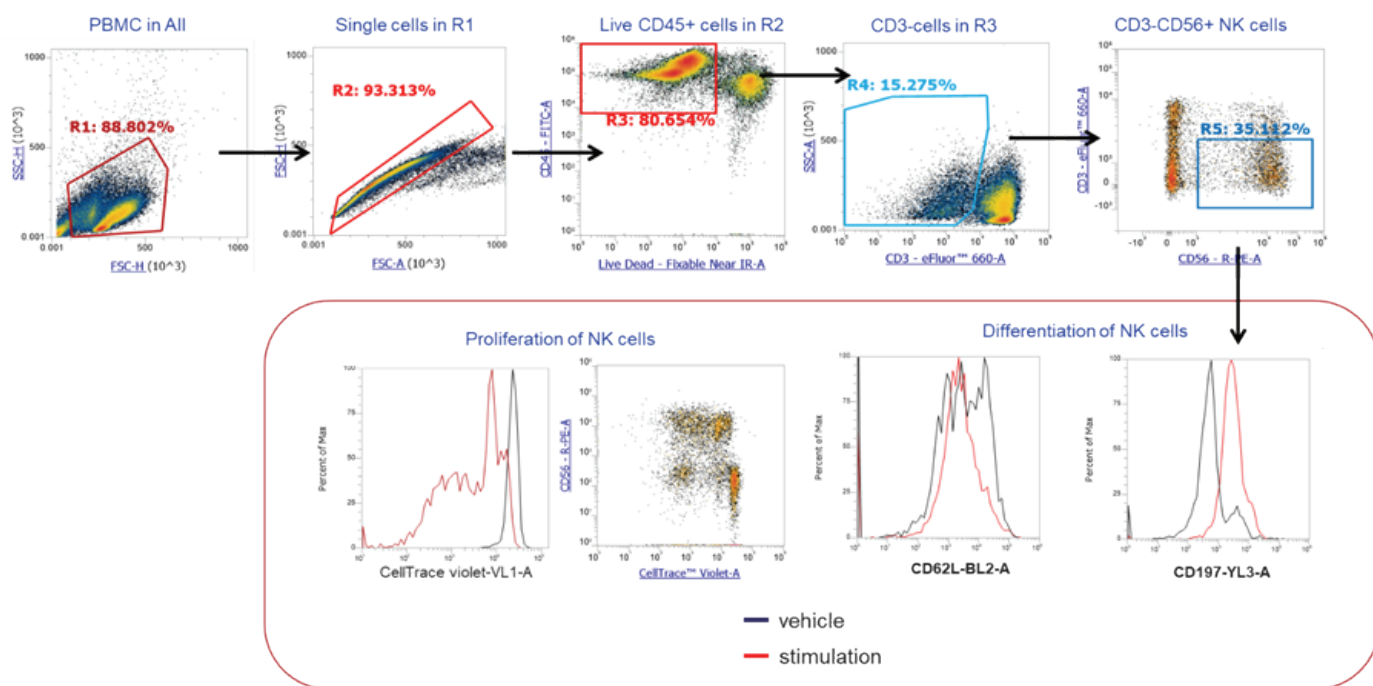
对Attune NxT流式细胞仪使用下表所示的滤光片采集样本如图1所示, 多参数分析中使用的设门策略如图2所示。

Dye	Excitation (nm)	Emission (nm)
CellTrace™ Violet	405	450/40
FITC	488	530/30
PerCP-eFluor 710	488	695/40
PE	561	585/16
PE-Cyanine7	561	780/60
eFluor 660	637	670/14
LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR	633	750/775

图1.使用染料及检测通道

小结

4激光14色的Attune NxT流式细胞仪在7色人全血NK细胞增殖及分化分析实验中能很好的体现细胞群体分辨能力。本实验通过流式分析, 采用部分典型标志物, 分析了健康供体外周血单个核细胞在刺激条件下, 分别以CD3-CD56+分群, 以及Celltrace violet, CD62L, CCR7 (CD197) 等典型标志物表征NK细胞及其增殖分化的表型分析。



数据来源: 睿智化学

人全血NK细胞增殖及毒性分析

NK细胞是非常重要的先天性免疫细胞，可以通过细胞毒性以及释放促炎因子来响应病毒侵染以及肿瘤发生。根据人NK细胞表面CD56表达情况，NK细胞一般可以分为两个亚群：其中CD56^{dim} NK细胞主要体现细胞毒性，表达高水平CD16A (FcR11a)，并迅速介导ADCC等细胞溶解功能；CD56^{bright}细胞表达低水平CD16A但产生大量细胞因子。CD107a是NK细胞效应激活脱颗粒标志物常用标志物，细胞毒性T淋巴细胞 (Cytotoxic T Lymphocyte, CTL) 或NK细胞杀伤靶细胞时，毒性颗粒将到达细胞膜并与其融合，此时CD107a会被转运至细胞膜表面并引起颗粒内容物释放，最终导致靶细胞死亡。CellTrace™ Violet采用染料稀释法通过流式细胞分析追踪多代细胞，从而表征特定细胞亚群是否增殖传代。本实验通过流式分析，采用部分典型标志物，分析了健康供体外周血单个核细胞在刺激条件下，NK细胞增殖以及杀伤毒性分析。

材料

- 健康人全血
- 流式管
- CD45小鼠抗人mAb, FITC, 货号: 11-0459-42
- CD3小鼠抗人mAb, eFluor 660, 货号: 50-0037-42
- CD4小鼠抗人mAb, PerCP-eFluor 710, 货号: 46-0047-42
- CD56小鼠抗人mAb, PE, 货号: 12-0567-42
- CD16小鼠抗人mAb, Alexa Fluor 700, 货号: 56-0168-42
- CD107a小鼠抗人mAb, PE-Cyanine7, 货号: 25-1079-42
- LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR, 货号: L34975
- CellTrace™ Violet, 货号: C34557
- eBioscience™ 细胞内固定与透化缓冲液套件, (eBioscience™ Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set) 货号: 88-8824-00
- eBioscience™ 流式细胞分析染色缓冲液, (eBioscience™ Flow Cytometry Staining Buffer) 货号: 00-4222-26
- Attune NxT流式细胞仪

抗体标记

1. 将新鲜制备的人PBMC以 7×10^5 cells/well接种于24孔板；
2. 刺激培养3-5天后，对每孔待分析样本，吸取100 μ L 混匀的细胞至试管内。
3. 按照产品说明书中所示，将表面抗体加入步骤2中的试管内，轻轻混匀；
4. 4°C避光孵育30分钟；
5. 离心弃上清，加入150 μ L staining buffer, 350xg水平离心6分钟，弃上清；
6. 加入100 μ L Fixation & Permeabilization Buffer进行细胞固定，混合均匀，4°C避光孵育20分钟；
7. 离心弃上清，加入1xPermeabilization Buffer进行离心洗涤；
8. 加入稀释于1xPermeabilization Buffer的CD107a小鼠抗人PE-cy7抗体，4°C避光孵育30分钟；
9. 离心弃上清，加入1xPermeabilization Buffer进行洗涤；
10. 离心弃上清，加入200 μ L staining buffer重悬细胞，上机检测。

CellTrace™ Violet 标记

1. 用含0.1%BSA的staining buffer重悬PBMC使其浓度为 1×10^7 cells/mL；
2. 向一瓶CellTrace Violet 染色液加入 20 μ L DMSO，作为储备液；
3. 用PBS (含0.1%BSA) 与上述储备液以1:1000稀释，作为稀释液；
4. 将上述稀释液与新鲜制备的PBMC细胞悬液以1:1轻轻混合，混合后细胞浓度为 5×10^6 cells/mL；
5. 细胞于37°C 中避光孵育20分钟，并每隔5分钟摇匀细胞；
6. 在上述孵育细胞中加入5倍体积培养基并混匀，37°C 中避光孵育5分钟；
7. 离心弃上清，加入培养基洗涤一遍；
8. 重悬细胞并计数。

数据采集和设门策略

对Attune NxT流式细胞仪使用下表所示的滤光片采集样本本如图1所示，多参数分析中使用的设门策略如图2所示。

Dye	Excitation (nm)	Emission (nm)
CellTrace™ Violet	405	450/40
FITC	488	530/30
PerCP-eFluor 710	488	695/40
PE	561	585/16
PE-Cyanine7	561	780/60
eFluor 660	637	670/14
Alexa Fluor 700	637	720/30
LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR	633	750/775

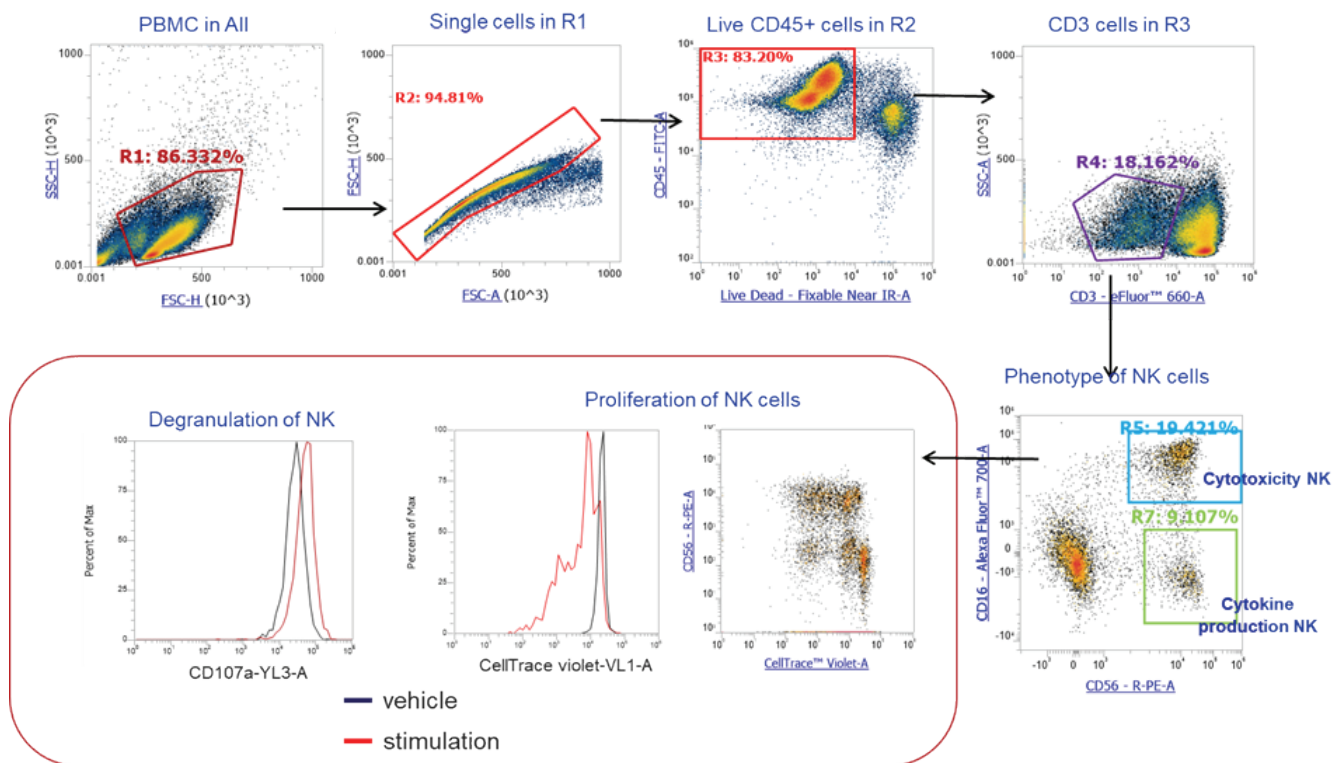
图1.使用染料及检测通道

设门策略

根据前向和侧向散射光对淋巴细胞和单核细胞设门，并根据FSC-A/FSC-H设门去除黏连细胞。在live CD45⁺白细胞设门和CD3⁺设门内，再以CD56和CD16设门区分NK细胞，其中CD56^{dim}CD16⁺表示毒性NK细胞，CD56⁺CD16⁻表示细胞因子高分泌型NK细胞。再以重叠直方图，分析CD56^{dim}CD16⁺设门内，CD107a阳性表示效应激活毒性NK细胞。同样，该设门内以Celltrace violet标记出现的荧光信号降低迭代峰表征传代增殖部分毒性NK细胞。

小结

4激光14色的Attune NxT流式细胞仪在8色人全血NK细胞增殖及毒性分析实验中能很好的体现细胞群体分辨能力。本实验通过流式分析，采用部分典型标志物，分析了健康供体外周血单个核细胞在刺激条件下，分别以CD3，CD56，CD16等标志物进行NK分群，并以Celltrace violet，CD107a等典型标志物分别表征NK细胞增殖及毒性的表型分析。



数据来源: 睿智化学

了解更多 thermofisher.cn/flowantibodies



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学小助手

免费服务电话: 800 820 8982/400 820 8982

信息咨询邮箱: cnbidmarketing@thermofisher.com

www.thermofisher.cn

ThermoFisher
SCIENTIFIC