



流式分选仪的创新调试及在初始 T 细胞纯化中的应用

万雅娟, 王 瑞, 张 松*, 周 颖, 龙加福

(南开大学 生命科学学院, 天津 300071)

摘要: 针对敏感细胞样本如何调试流式分选仪以获得高纯度、高活性的分选产物是众多流式分选从业者关注的问题。该文以流式分选仪 FACS Aria Fusion 为例, 首创性地将工程师调试界面与用户调试界面相结合调整系统默认最低样品进样压力, 并配合 85 μm 喷嘴, 按照用户常规操作流程, 在流速 1.0 的情况下对小鼠原代初始 T 细胞进行纯化, 并对产物的质量进行检测。结果证明阐述的调试方法可以成功地获得高纯度初始 T 细胞, 并且诱导分化成的调节 T 细胞产生特异转录因子 Foxp3 的能力与未分选细胞相当。

关键词: 流式分选; 进样压力; 初始 T 细胞; 调节 T 细胞; Foxp3

中图分类号: Q-33

文献标志码: A

DOI: 10.12179/1672-4550.20230079

Creative Adjustment of the Flow Cell Sorter and the Application in the Purification of Naive T Cells

WAN Yajuan, WANG Rui, ZHANG Song*, ZHOU Ying, LONG Jiafu

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: How to adjust the flow cell sorter for the sensitive cells is a concern of many practitioners. Using the FACS Aria Fusion as an example, the article creatively combined the service interface with the user interface to adjust the lowest default sample pressure and then sorted the primary naive T cells according to the standard user's manual with the 85 μm nozzle. The testing quality of the purified naive T cells revealed that the procedure could lead to high purity products. Moreover, treg cells differentiated from the products could generate Foxp3 normally compared with the non-sorting control.

Key words: flow cytometry sorting; sample pressure; naive T cell; treg cell; Foxp3

流式分选术以流式分选仪为检测工具, 以流式分析术为基础, 结合电荷式分选的原理对混合体系中的目的细胞或颗粒实现群体或指定数目个体的精确分离。分离后的目标颗粒仍保持一定的生物学活性, 可进行后续的功能研究。该技术在高等教育院校中很多生物学、医学相关的科研工作均可采用, 并且大部分情况下其他的分离手段(如磁珠分选)无法完全替代, 理论上具有广泛的适用性^[1-3]。流式分选仪是集合了光学、流体力学、电力学、生物化学、材料化学等众多学科理论而研发的高值大型精密仪器^[4], 该仪器在运行过程中会涉及流体动力学聚焦、液流充放电、带电液滴经电极板偏转后下落至收集装置等环节, 会对细胞活性造成不同程度的损伤, 引起分选诱导的细胞应激现象(sorter induced cellular stress,

SICS)^[5]。因此, 流式分选仪的调试情况会直接影响产出细胞的生物学活性及下游的功能研究。

初始 T(naive T)细胞, 又名未致敏 T 细胞, 在胸腺中发育成熟后迁移至外周淋巴组织中, 接触不同抗原的刺激后可继续分化成 Th1、Th2、...、Th17, 调节 T 细胞(treg)或者细胞毒性 T 细胞等^[6-7]。初始 T 细胞属于敏感细胞类型, 很容易因为流式分选过程中受到机械性损伤而影响下游培养和分化。所以, 在流式分选获得高纯度产物的基础上尽可能降低敏感细胞损伤是调节流式分选仪各项参数时需要侧重注意的。

本文以美国 BD 公司 Aria 系列流式分选仪中的最新型号 Aria Fusion 作为调试对象, 以小鼠原代初始 T 细胞作为敏感细胞代表检验这种新型的调试方法对分选产物活性的影响。

收稿日期: 2023-02-22; 修回日期: 2023-10-18

基金项目: 南开大学大型仪器实验技术研发项目(21NKSYJS07)。

作者简介: 万雅娟(1987-), 女, 博士, 实验师, 主要从事生物化学与分子生物学、流式细胞仪的研究与教学工作。

* 通信作者: 张松(1983-), 男, 博士, 教授, 主要从事 T 细胞免疫研究工作。E-mail: z@immlab.org

1 材料与方法

1.1 主要设备、材料与试剂

流式分选仪(BD FACSAria Fusion)、流式分析仪(CytoFLEX)、鞘液(BD FACSTFlow 342003)、质量控制微球(BD FACSDiva CS&T research beads kit)、彩虹微球(rainbow)、液滴延迟荧光微球(accudrop fluorescent beads)、磁珠分选试剂盒(milteny biotec)、生物显微镜(奥特光学)、6~8 周龄小鼠(C57B6)。

1.2 方法

1.2.1 Aria Fusion 进样压力默认参数调整

流式分选实验中, 鞘液流包裹着样品流在压力系统的推送下在分选仪管路中运行。其中鞘液流默认压力固定不变, 样本流压力从后台进行调整以适应敏感细胞的分选需求: 进入工程师(BD service)界面, 双击点开“70 μm ”文件夹, 换上 70 μm 喷嘴, 打开液流, 用彩虹微球稀释液(1 mL 鞘液中加入 1 滴 rainbow 储液)上样获取实时数据。将阈值选项放至 FSC 或荧光通道, 微调“gain”数值至鞘液压力和样本压力差接近 1.0, 记录此时软件显示的分析速度(evt/s)。随后关闭液流, 换上 100 μm 喷嘴再重新开启液流, 调节“offset”数值直到软件显示的分析速度与采用 70 μm 喷嘴时一致。此时可退出工程师界面, 进入用户界面。

1.2.2 Aria Fusion 的开机准备

按照用户操作手册, 结合软件提示进行仪器无菌管路制备。制备完毕后调整激光器功率至所需数值, 按照用户手册设置基线(baseline), 随后以所获得的 baseline 为基础进行每日仪器质量控制检测。根据质控报告提示调整仪器相关组件或清洗仪器直至报告结果为“Pass”状态。

1.2.3 Aria Fusion 的分选参数调试

按照用户界面软件提示执行液流启动程序, 卸下闭合喷嘴, 换上孔径 85 μm 喷嘴以适应小鼠原代初始 T 细胞分选。为了保证分选纯度, 按照操作手册依次调节侧视液流窗口 Amp、Drop1、Gap 等参数使液流稳定且卫星液滴数少于 5 滴, 调节分选液流亮度及分选液流残余电量。然后使用 accudrop 稀释液(500 μL 鞘液中加入 1 滴 accudrop 原液)自动计算液滴延迟以获得最佳分选纯度。在 15 mL 尖底离心管中加入 5 mL 医用酒精, 以此模拟产物接收容器。电极板电压使用仪器默

认值, 依次点击“Voltage”“Test Sort”以及液流抽屉按钮, 调节分选窗口上液滴的加电量以获得最佳分选液流注射角度的同时减少对分选液滴的电荷刺激(最佳角度以分选液流下刚好落入酒精液面正中为宜)。

1.2.4 小鼠 CD4⁺ T 细胞的制备及初始 T 细胞的荧光染色

使用颈脱臼法处死小鼠后无菌取脾脏和淋巴结, 用磁珠分选缓冲液无菌研磨后 1800 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心弃上清, 用 500 μL 磁珠分选缓冲液重悬沉淀后加入标记有 CD4 抗体的磁珠用来捕获 CD4⁺ T 细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min。加入磁珠分选缓冲液清洗非特异性结合的抗体后用磁珠分选缓冲液重悬细胞。将磁珠吸附柱提前用磁珠分选缓冲液浸透并置于磁场中。逐滴向吸附柱中加入准备好的细胞悬液, 用磁珠分选缓冲液轻柔清洗至流出的液体为无色。收集此时未与吸附柱结合的细胞, 1800 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心后弃上清, ACK 裂解红细胞。用无菌 PBS 清洗残余细胞 2 次, 根据后续流式分选染色方案配置单染样品管, 用于流式分选实验中调节补偿。用磁珠分选缓冲液吹出被吸附的细胞并进行显微计数。取所需细胞用量, 一部分用流式抗体对初始 T 细胞进行染色(CD4+CD62L+CD25-CD44-), 另一部分加入 7-AAD 确认样品状态。初始 T 细胞染色结束后用无菌 PBS 清洗细胞, 取出一部分留作流式分选的对照组, 剩余细胞按 $18 \times 10^6 \sim 20 \times 10^6$ 个/mL 的密度重悬在无菌 PBS 中冰上放置, 准备进行流式分选。

1.2.5 流式分选初始 T 细胞

将制备好的细胞样本放入进样仓, 按照流式分析术的方法正确调节电压, 补偿后再记录数据。圈选出需要分选的细胞群体, 依次点击“Voltage”“Sort”“Waste drawer”开始分选并使分选产物落入装有 5 mL 收集液(RPMI1640 混合 10% 胎牛血清)的 15 mL 离心管中, 注意全程调节 rate 为 1.0 进行分选。分选结束后立刻取少量产物回测纯度, 另取少量加入 7-AAD 进行死活染色。

1.2.6 原代初始 T 细胞流式分选产物的再培养及培养产物活性验证

1.2.5 节中剩余产物离心弃除含鞘液的上清(未经流式分选的染色后细胞样品作为对照), 用相等体积的收集液清洗 3 次后用 treg 诱导培养基重悬, 并以 1.0×10^6 个/mL 的密度种于提前包被的 48 孔板中。3 天后用光学显微镜在 10×20 明场下观察拍照, 用移液器轻柔且充分地吹吸混匀各组

细胞，取全部培养液离心去除上清，对 treg 细胞特征转录因子 Foxp3 染色。最后用 PBS 重悬，cytoflex 流式分析仪进行细胞计数和染色分析。

2 实验结果

2.1 Aria Fusion 分选敏感细胞相关仪器参数

按照 1.2 节中降低空气泵直接施加在样本上的压力以使样本受到较低的压力胁迫，减少机械损伤，调整后的相关压力参数如表 1 所示。随后调整相关分选参数，其中电极板电压和阈值均使用仪器默认参数，主要分选参数如表 2 所示。

2.2 待分选样品的质量监测以及染色分析结果

用 7-AAD 染色法对制备好的待分选样品死活状态进行检测，如图 1 (a)和(b)所示，圈选 FSC/SSC 双参图上 85.5% 细胞群体，有 19% 的细胞是 7-AAD 阳性，即细胞膜完整性受损。如图 1 (c)和(d)所示，避开 FSC/SSC 左侧的群体，只圈选剩余 63.7% 的群体，几乎全部细胞均为 7-AAD 阴性，即为活细胞。后续染色分析及目标群体分选均按照图 1 (c)和(d)所示圈门方式圈选活细胞群体。

对活细胞群体中初始 T 细胞进行染色，用 Aria Fusion 采集荧光信号并根据流式分析图圈选需要进行流式分选的目标群体。如图 2 所示，磁珠纯化得到的脾脏及淋巴结来源的 CD4+ T 细胞中，初始 T 细胞(P2)比例约占全部检测颗粒的 50%，占活细胞群体(P1)的 85%。

表 1 压力参数 (1 PSI=6.895 kPa)

仪器型号	鞘液压力/PSI	样本压力/PSI	压差	分析速度/evt·s ⁻¹
Aria Fusion	44.79	43.85	0.94	108

表 2 Aria Fusion 相关分选参数 (分选模式: Purity)

参数	参数值
喷嘴规格/ μm	85
电极板电压/V	5000
分选液流加电量	53
FSC通道阈值	5000
流速	1.0
检测速度/(evt·s ⁻¹)	5000~8000
15 mL离心管接收液初始体积/mL	5
产出细胞/个	2.5×10^6
分选总时长/min	19

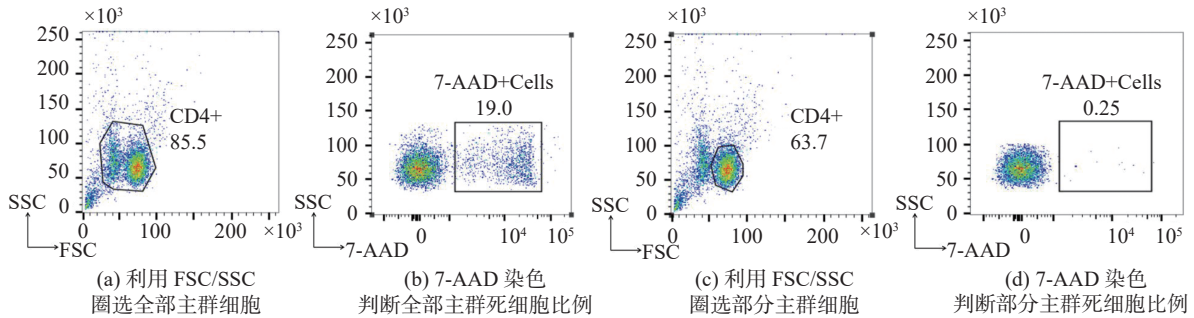


图 1 使用 7-AAD 验证不同的圈门方式下细胞的存活状态

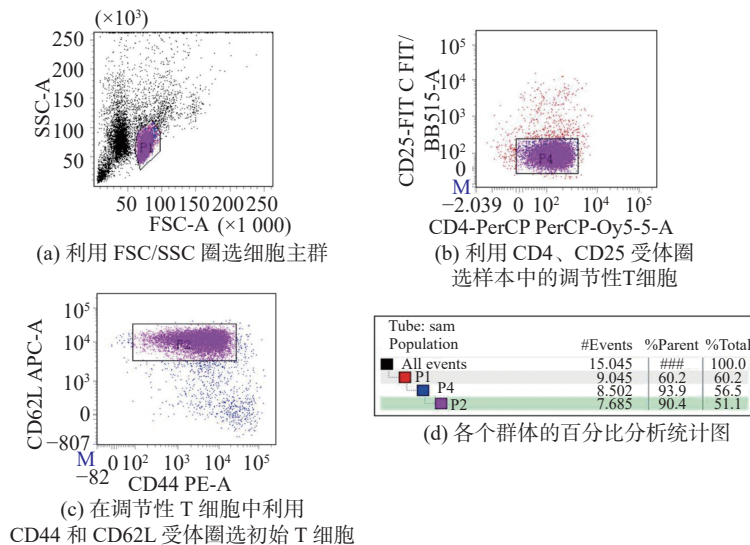


图 2 多荧光染色区分初始 T 细胞群

2.3 流式分选产物质量检测

按实验方法所述对初始 T 细胞 (P2) 进行流式分选。分选结束后直接从收集液中取出少量进行回测。如图 3 所示, 初始 T 细胞 (P2) 纯度

接近 100%。随后马上对分选产物进行 7-AAD 染色, 如图 4 所示, 细胞均为 7-AAD 阴性, 即细胞膜完整性没有因为流式分选过程造成明显损伤。

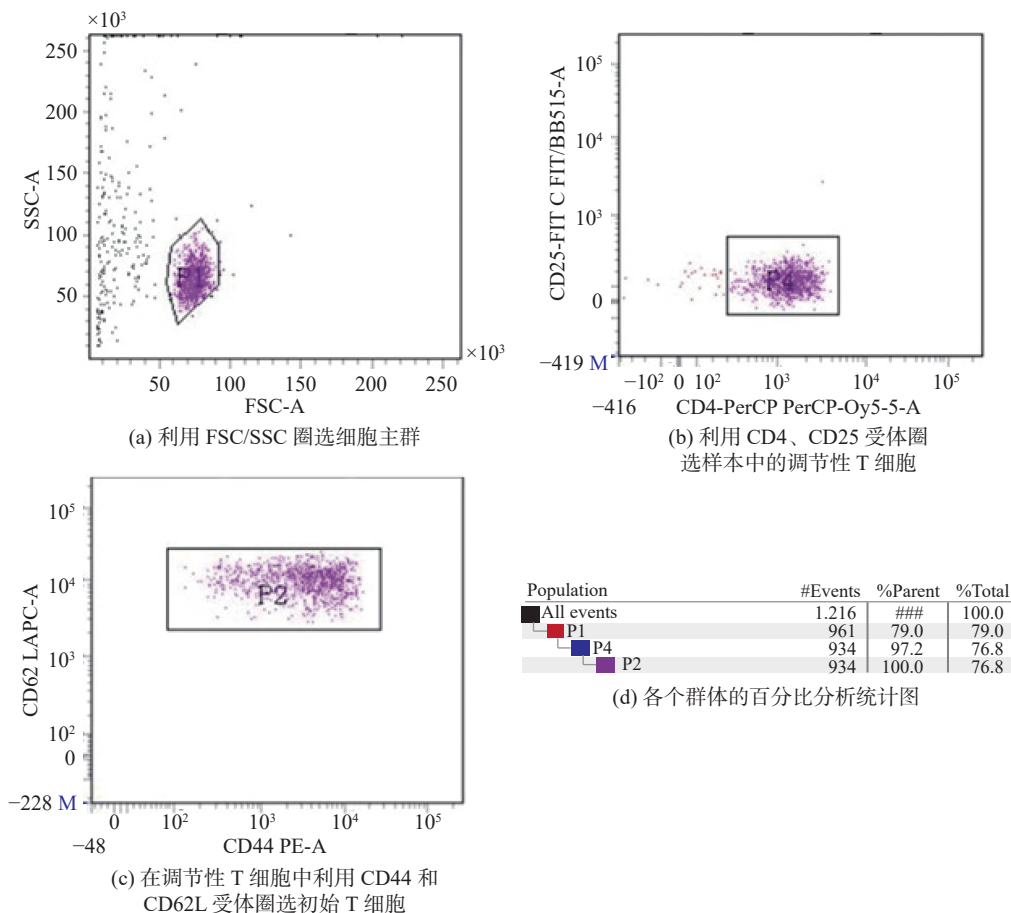


图 3 产物纯度回测结果

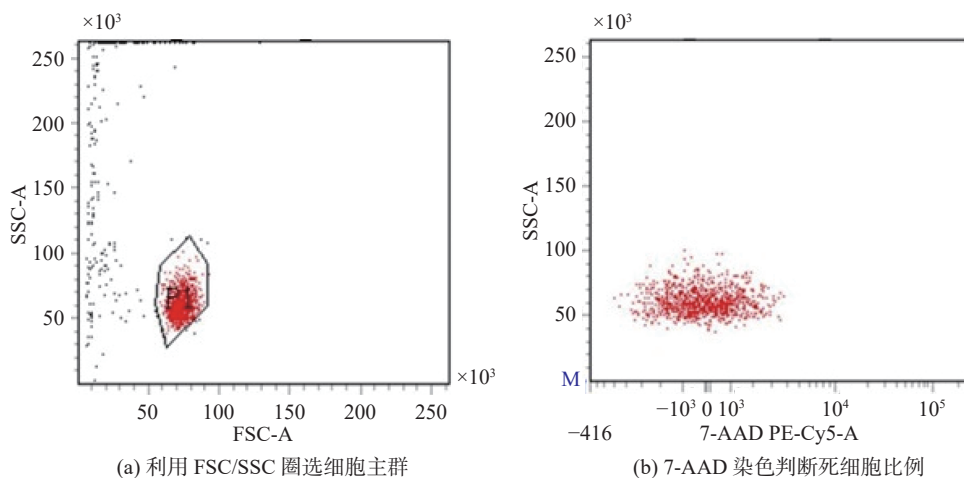


图 4 7-ADD 染色法检测产物死活状态

2.4 流式分选产物下游活性检测

虽然已经通过 7-AAD 染色法排除了明显的机械性损伤, 但经分选得到的敏感细胞是否仍然保

留着正常的下游功能是检验流式分选仪参数调整应用效果的更高标准。按实验方法所述对流式分选产物进行诱导培养, 3 天后在光镜下观察各组细

胞形态,如图 5 所示,经流式分选(FACS)纯化的产物细胞诱导分化形成的调节 T 细胞(treg)形态饱满膨大,具有良好的光折射性质,并且形成了一部分细胞群落。而未经流式分选组(NS)只有少量分化形成形态饱满膨大折光性良好的 treg 细胞。随后对两个组别 treg 细胞产生特异转录因子 Foxp3 的情况进行染色并用流式分析仪检测,如图 6 所示, cytoflex 流式分析仪吸取等体积样品时采集得到的细胞数 FACS 组明显多于 NS 组,且两者产生 Foxp3 的能力相当,并没有因为流式分选过程的引入明显削弱 treg 细胞的生物学活性。说明 Aria Fusion 各项参数调试结果确实可以应用在原代初始 T 细胞的相关分选实验中。

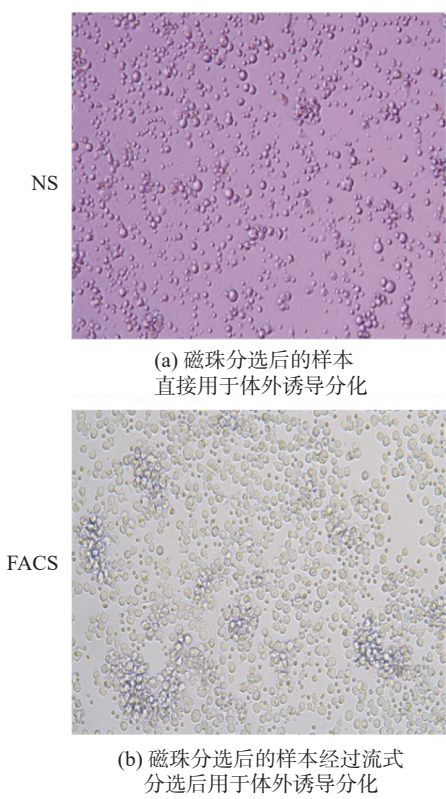


图 5 显微镜明场照(10×20)

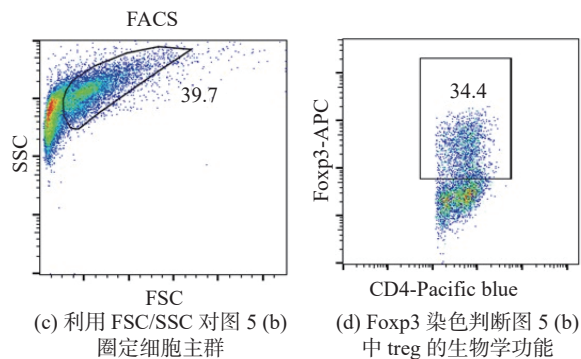
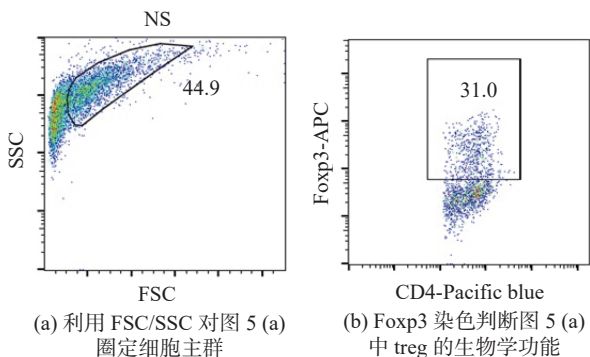


图 6 Cytoflex 流式仪检测 Treg 细胞 Foxp3 的产生能力

3 结束语

流式分选仪是集合了光学、电学、流体力学、材料化学等诸多学科特色的高值精密仪器,除了带来高通量高纯度的使用体验外^[8],由于仪器设计原理所限,也会一定程度限制敏感细胞的分选产物活性,掣肘下游的功能研究。不可否认,样品的制备质量也会投射到分选产物的活性状态上^[9],但对于从业者而言,如何调试流式分选仪让其适应包括敏感细胞类型在内的更多分选需求是提高仪器使用效率、推广流式分选技术的更可控因素^[10-11]。虽然商品化的流式分选仪均配有用户操作手册,但并没有针对特殊分选需求提供清晰可行的改良方案。这使得一些脆弱细胞类型如原代 T 细胞、粒细胞、纤维化肝脏细胞、干细胞等在使用流式分选进行分离纯化时产物活性并不尽如人意^[12]。

在流式分选过程中,鞘液包裹着样本在层流原理的作用下形成同轴液柱,被压力系统推送至液路中。其中,作用在样本上的压力大小会直接影响敏感细胞流式分选产物活性^[12]。本文的创新性工作在于首次报道了如何将用户界面与工程界面结合,同时调试以达到低进样压力分选敏感细胞的目的。在工程界面设置样品压力是改动仪器默认的最低进样压力。当用户界面的流速设置为 1.0,将对样本施加该仪器默认的最低推送压力。需要指出的是,样品压力过低也会导致分析速度减慢,总分选时间延长,而较长的离体时间也会削弱敏感细胞产物活性,所以在调试工程界面的进样压力时要进行多次摸索以做好平衡。

除了进样压力,喷嘴孔径、分选液流加电量、收集液面的高度等因素也是需要认真摸索的方面。虽然本文在表 1 和表 2 中罗列了主要仪器参数,但不同型号的流式分选仪调试至相似状态

时相关参数的绝对数值不尽相同,所以掌握调试思路比简单套用绝对参数更为实用。

原代初始T细胞是CD4⁺T细胞中保留有多向分化能力的未致敏T细胞,在分选过程中容易受到多因素刺激影响下游分化。研究中用初始T细胞作为“镜子”来检测Aria Fusion的调试质量。对于产物质量的验证,除了在分选结束后立即取用分选产物进行纯度回测和7-AAD染色外,还增加了下游培养物的功能测定。虽然一些流式分选平台只用7-AAD染色作为检测产物质量的标准^[13-14],但该方法只能捕捉到损伤状态极为严重的细胞,不能以一概全地评价流式分选产物质量。有研究表明,流式分选仪诸多参数的改动都会影响包括MAPK、JNK在内的很多信号通路^[15]。故对于需要分选后再培养进行功能研究的敏感细胞,除了进行常规7-AAD染色,增加分选前后下游功能比对可以使分选仪器的调试状态得到更加全面的验证。

参考文献

- [1] 徐勇,霍梅. 免疫磁珠分离及流式细胞仪分选纯化外周血CD34⁺/CD90⁺干细胞[J]. 临床检验杂志, 2004, 22(4): 246-248.
- [2] 陈朱波,曹雪涛. 流式细胞术:原理、操作及应用[M]. 北京:科学出版社, 2014.
- [3] 杜立颖,冯仁青. 流式细胞术[M]. 北京:北京大学出版社, 2014.
- [4] PRERNA P, SHIV S. Flow cytometry and cell sorting [M]. Oakville: Delve Publishing, 2019.
- [5] LOPEZ P A, HULSPAS R. Special issue on enhancement of reproducibility and rigor[J]. Cytometry A, 2020, 97(2): 105-106.
- [6] VICTOR A, DELPHINE S. Naive T cells: The crux of cellular immune aging? [J]. Experimental Gerontology, 2014, 54: 90-93.
- [7] HU P, WANG M Y, GAO H, et al. The role of helper T cells in psoriasis[J]. Frontiers in Immunology, doi: 10.3389/fimmu.2021.788940.
- [8] OSBORNE G W. A method of quantifying cell sorting yield in “real time” [J]. Cytometry A, 2010, 77(10): 983-989.
- [9] 陈晓燕,林惠珠,阳莉,等. MoFlo Astrios EQS型超高速流式分选仪的管理和使用优化[J]. 中国医学装备, 2022, 19(7): 186-189.
- [10] 梁昊岳,杨晚竹,程雪莲,等. BD Influx流式细胞分选仪参数调试和最佳条件的设定[J]. 中国医学装备, 2014(2): 5-8.
- [11] 曹云新,胡金涛,杨安钢. FACS-Aria流式细胞分选调试参数和最佳条件的设定[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(19): 1813-1815.
- [12] RYAN K. Sheath fluid impacts the depletion of cellular metabolites in cells afflicted by sorting induced cellular stress (SICS)[J]. Cytometry A, 2021, 99(9): 921-929.
- [13] 户乃丽,徐晓雪,邹林樾,等. 利用BD FACSAria III二次分选法纯化低比例细胞群体的流式细胞技术[J]. 中国医疗器械信息, 2020(21): 19-21.
- [14] 杨继辉,牛楠,宋佳卉,等. 自制鞘液在FACSAria III流式细胞仪分选CD3⁺CD4⁺淋巴细胞中的应用[J]. 宁夏医科大学学报, 2017, 39(11): 1354-1357.
- [15] ANDRÄ I, ULRICH H, DÜRR, et al. An evaluation of T-Cell functionality after flow cytometry sorting revealed p38 MAPK activation[J]. Cytometry Part A, 2020, 97(2): 171-183.

编辑 钟晓