ATTUNE NXT 基礎培訓

上機應用 3:多色收集和補償

多色實驗通常需要補償以去除非目標檢測器螢光染劑發射的光譜重叠。本單元旨在展示使用螢光標記的微球作爲補償的 4 色實驗。當對照中存在陰性和陽性群體時,我們將使用 "陰性圈門(gate)"(Negative Gate) 進行補償。如果陰性對照可用,或單一染色的對照中 無陰性群體,則可以使用"未染色對照"(Unstained Control) 模塊。

學習目標:

1. 熟悉設置多色收集實驗的工作流程



2. 瞭解如何設置補償對照及使用散點圖補償工具

本實驗室需要:

- 固定過的血液
- AbC[™] 總抗體補償微珠試劑盒
- 抗人 CD45 Alexa Fluor 488 抗體——白細胞特異性
- 抗人 CD3 R-PE 抗體——T 淋巴細胞特異性
- 抗人 CD19 PerCP-Cy5.5 抗體——B 淋巴細胞特異性

- 抗人 CD14 APC 抗體——單核細胞特異性
- 固定和裂解溶液
- 1x PBS
- 流式管 (12x75mm 試管)

實驗室活動

樣本製備

1. 標記 6 支流式管,按照下面的染色圖製備樣本;將微球與血液混勻後分裝。

Attun	e NxT 通道					北田屋を
試管#	樣本	CD45	CD3	CD19	CD14	4 記题
		AF488	PE	PerCP-Cy5.5	APC	不
1		5ul				**1示記
2	2 滴		5ul			
3	AbC 微球			5ul		
4					5ul	
5	100山 血液					
6		5ul	5ul	5ul	5ul	

- 2. 室溫避光染色所有樣本>20分鐘。
- 3. 等待過程中,在表格中填寫需要使用的正確的 Attune NxT 檢測器通道。
- 4. 等待過程中,設置下一部分的 Attune NxT 流式細胞儀。
- 5. 可選:對於無需裂解和清洗的全血分析,從試管 5 和 6 中取出 2 ul,加入 4mL PBS。
- 在試管 5 和 6 的剩餘的血液中,加入 2mL High Yield 裂解液裂解 RBC。混匀, 避光染色 10 分鐘。
- 7. 在試管 1-4 中加入 2 mL PBS。
- 8. 將2滴陰性微球加入試管1-4中,然後分析。
- 9. 細胞可直接用於流式分析

流式分析

- 1. 打開儀器,運行啓動和性能測試。性能測試完成後進行 SIP 消毒。儀器即可使用。
- 2. 在主選單中選擇新實驗 (New Experiment),或右擊實驗瀏覽器中的用戶名,從下拉選單中選擇"新實驗"(New experiment)。
- 3. 新實驗對話框將打開。選擇實驗類型(試管),將實驗命名爲"4 色血液"(4 Colour Blood)。選擇1個群組和2個樣本(右擊樣本名稱以重新命名:未染色和4 色血液)。



4.

在"儀器設置"(Instrument Settings)標籤頁下,打開"參數"(parameters) 並打開適當的通道。輸入標記 (Labels) 和靶點 (Targets)。

Instrument Settings	4 × Instrument Settings 4 ×
Automatically update Experiment level Set as Experiment Level IS Set as Default	 ✓ Automatically update Experiment level ✓ Set as Experiment Level IS Set as Default
Parameters	► Parameters -
Voltage	► Baseline/PT Config BRVX ►
Threshold	► VI Time
Advanced settings	► Event
System settings	► Enabled A H W Target Label I II
	🗹 FSC 🔹 👻 📝 🐼
	🖾 ssc 🔽 👻 🗹 🖾 🖾
	☑ BL1 CD45 ✓ Alexa Fluor [™] ✓ ☑ ☑
	☑ BL2 CD3 ▼ R-PE ▼ ☑ ☑ ☑
	Image: Wight BL3 CD19 ✓ PerCP-Cy5.€ ✓ ✓ ✓
	BL4 v v D
	Image: Rel 1 CD14 - APC - Image: Rel 1
	RL3
	🔲 VL1 🔽 🚽 🖉 🗐 🗐 🗐
	Voltage
	Threshold >
Collection Panel Instrument Settings Heat Map Setup Cust	tomize Collection Panel Instrument Settings Heat Map Setup Customize

Compensation Setup

5. 在您的實驗下面雙擊"補償"(Compensation),打開補償設置視窗。或在 補償功能區中,選擇補償設置。

▲	File	Home View	Workspace	Instrument	t Experiment	Compensation
Compensation	M	M	Use Experiment C		(溫)	
🖌 🖥 Group	V.C.O.	VAN (Use Comp from F		CuiJ	
Unstained blood	Compensation Setup	Apply Compensation				
4 Colour blood	Setup		ylady	4	Adjustment	

6. 在補償設置中,選擇**試管、面積(area)、陰性圈門(gate)**,勾選所有通道(參數列表 中僅顯示打開的通道)。

Compensation Setu	qı			×
Source				
• Tubes				
Measurement				
😐 Area 📀 Heigh	t			
Select Background	Fluorescence Mode	ñ		
O Use Negative Ga	te			
O Use Unstained C	ontrol			
None				
Salast Componenti	on Daramatora			
select compensati	on Parameters —			
Select All	_	_		
✓ BL1	√ RL1	√ VL1	▼YL1	
✓ BL2	✓ RL2	✓ VL2	✓YL2	
I BL3	RL3	VL3	✓ YL3	
		✓ VL4	✓ YL4	
			ОК Са	ncel

關於背景螢光模式

- 選擇使用未染色對照 (Use Unstained Control),添加未染色對照至實驗補償節點,作爲其他補償對照。
- 選擇使用陰性圈門 (Use Negative Gate),在補償工作區提供其他直方圖圈門 (gate)或矩形圈門(gate),定義陰性群體。
- 若選擇無 (None),計算補償時不校正背景自發螢光。

7. 確認後,將顯示每個通道的單色對照。

Compensation	
BL1-A(CD45-Alexa Fluor™ 488))
BL2-A(CD3-R-PE)	
BL3-A(CD19-PerCP-Cy5.5)	
RL1-A(CD14-APC)	

Run Protocol

8. 在收集面板中,按下圖進行收集設置。我們使用低速,這樣可以有更多時間進行調整。切記點擊"應用至實驗"(Apply to experiment)。

Run Protocol 🗸								
Apply to experiment								
Set as default	Load							
Flow Options								
Acquisition Vol 50	Acquisition Vol 50 µL (100 µL Total Draw Volume)							
i≜ 12.5 μL /min								
Stop Options								
🕼 10,000 ev	ents on All Events							
🔲 5 m	in 0 sec							
50 μι								

9.

FSC/SSC Voltage

雙擊第一個補償對照 (BL1-A), 打開工作區。



10. 加載試管 1,點擊運行 (RUN)。打開儀器設置 -> 電壓標籤頁。調整 FSC 和 SSC 電 壓,直至微球符合比例 (圖片中的數值不準確)。點擊停止 (STOP)。



11. 移動圈門(gate),使其包括微球群體,排除多聚體。參見下圖示例。右擊圈門 (gate),應用至所有對照。



12. 再次點擊運行 (RUN),調整 BL1 通道電壓,使陰性微球位於 10²-10³ 區 域,確保陽性染色的微球符合比例 (參見上圖)。

Fluorescence

重要事項:前兩個 10 進位基本上是 PMT 的"噪聲"區域。選用在螢光對數圖中大於 10²的陰性群體,確保電壓設置準確,以分辨出噪聲上方的陰性和陽性群體。 13. 雙擊打開下一個補償對照的樣本工作區 (BL2)。按步驟 12 所示,調整下一個螢光通道的電壓。全部 4 個對照均執行此操作。<u>必須調整全部電壓</u>後再記錄補償。



Record Compensation

14.

在收集面板中,將流速提高至 200ul/分鐘,點擊"應用至實驗"(Apply to

experiment)。每個對照記錄 10,000 各事件(event)。如下圖所示,每個樣本旁將顯示 白色的勾號。



 通過點擊補償功能區 ->"查看矩陣"(View matrix),查看補償矩陣。記錄好全部補償 後,螢光電壓將被鎖定,您只能更改 FSC 和 SSC 電壓。

۷	View Matrix								
I	Matrix - Experiment BLOOD								
	Spillover	values are	e read acro	ssitows					
		BL1-A	BL2-A	BL3-A	RL1-A				
	BL1-A	100.00	62.77	10.82	0.00				
	BL2-A	0.23	100.00	32.22	0.00				
	BL3-A	0.05	0.04	100.00	0.93				
	RL1-A	0.06	0.00	9.69	100.00				
		-							



- 17. 準備好後,我們現在需要最佳化實際樣本的 FSC/SSC。這是因爲補償對照使用微 球,而實際細胞則具有不同的前向和側向散射。如果您的補償對照和樣本是相同的細 胞,則無需更改上述數值。
- 18. 首先,將流速調至12.5,使您有足够的時間優化設置(50ul 通過系統需要4分鐘)。
- 19. 更改 FSC 和 SSC 設置,使全部 3 種 WBC 類型符合比例,如下圖所示。



Sample acquisition

20. 現在可以收集樣本了。按下圖所示更改運行實驗方案,收集未染色和4 色染色的血液樣本。

Run Protocol							
Apply to experiment							
Set as default			Lo	ad		•	
Flow Options							
Acquisition Vol 200	րլ	(250	µL Tot	al Draw '	Volum	e)	
	<u>.</u>	1	1	200 µL	. /min		
Stop Options							
50,000	events o	n 🖊	All Eve	nts		-	
5	min 🛛		se				
50	μL						

- 21. 移動圈門(gate),使其包括正確的群體。如需要,更改自定義選單中的圈門(gate)類型。
- 22. 收集後,進行 SIP 消毒,清潔系統。

數據分析。計算下列群體的百分比和實際細胞濃度:

a. T 淋巴細胞 _____% ________個細胞/ul (在緩衝液中 21 倍稀釋的血液) b. B 淋巴細胞 _____% ______個細胞/ul

c. 單核細胞 _____% _____個細胞/ul

通過右擊實驗名稱,選擇列印,將結果列印為 PDF 文件。