

# Lymphocyte Subpopulation

- 1 目的：檢測免疫異常病患之淋巴球亞群分布情形。
- 2 檢體的收集與處理：取 2 ml 全血，使用 heparin 綠頭試管，不可冷藏，室溫保存，24 小時內送檢。
- 3 標準作業程序
  - 3.1 測定原理：利用單株抗體與淋巴球細胞結合之螢光反應結果以免疫細胞分析儀分析之。
  - 3.2 試劑：均為紅綠兩色螢光試劑
    - 〈1〉淋巴球分類單株抗體 ( Anti-human lymphocyte Ab )
    - 〈2〉背景值單株抗體 ( Mouse IgG1 + IgG2a only )
    - 〈3〉T 淋巴球和輔助型 T 淋巴球 ( T cell + T-helper cell )
    - 〈4〉T 淋巴球和抑制型 T 淋巴球 ( T cell + T-suppressor cell )
    - 〈5〉T 淋巴球和 B 淋巴球 ( T cell + B cell )
  - 3.3 儀器：Flow Cytometry 〈流式細胞分析儀〉

利用氬雷射照射在標本細胞流上，由於雷射定 360°繞射固有許多訊號，利用這些訊號可以分析大小、密度，在依螢光之有無、不同波長螢光分析，可得知不同族群大小之比例。
  - 3.4 操作方法
    - 3.4.1 檢體前處理
      - 3.4.1.1 每個 test 5 支 Flow Cytometry 專用試管，置於架上，標示(1)、(2)、(3)、(4)、(5)。
      - 3.4.1.2 於 (1)、(2)、(3)、(4)、(5) 分別加入 Leucogate、control、CD3+CD4、CD3+CD8、CD3+CD19 之 monoclonal Ab 各 10  $\mu$ l。
      - 3.4.1.3 每支試管加入全血 100  $\mu$ l，混合均勻，室溫下靜置 20 分鐘，避光。
      - 3.4.1.4 每支試管加入 lysing sol'n 各 1.5 ml，靜置 8 分鐘。( for lyse RBC )
        - \* lymphoma、steroid 使用者，加 lysing sol'n 2 ml。
      - 3.4.1.5 離心 2000 rpm，5 分鐘。除去上清液，打散細胞。
      - 3.4.1.6 每支試管加入 3 ml PBS，離心 2000 rpm，5 分鐘。
        - \*Flow Cytometry 主要測 susp.中之 partical，所以先以 PBS wash，降低干擾因子。
      - 3.4.1.7 除去上清液，打散細胞。
      - 3.4.1.8 每支試管加入 300  $\mu$ l PBS，混合均勻。待測。

## 3.4.2 上機

### 3.4.2.1 Warm up

使用前 10 分鐘→打開氣閥▼up→主機、螢幕、印表機依序開機，動作連續→稍後螢幕會出現時鐘。

### 3.4.2.2 Setup

<u>CHANNEL</u>	<u>DATA MODE</u>
FSC 大小訊號	→ linear — Detector E00 Amplifier 2.00
SSC 密度	→ linear — Detector 355 Amplifier 1.00
FL1 第一螢光	→ log — Detector 550 Amplifier Log
FL2 第二螢光	→ log — Detector 450 Amplifier Log
<u>THRESHOLD</u> 閾值	52
<u>COMPENSATION</u>	FL1 – FL2 1.7 FL2 – FL1 20.6

### 3.4.2.3 RUN

3.4.2.3.1 選擇 Master Page 之【 Simul Set】→ F8 Continue → 輸入 P't 病歷號 → F8 RUN

3.4.2.3.2 轉至 RNU，待螢幕出現光點。

3.4.2.3.3 《測 Leucogate》換 Tube 1 → 按 F1 Acq data → 待 event 達所需數目， $\geq 15000$  → F8 Result are Printing。  
\*\*\* 若點很亂 → check 機器，DRAIN〈直至冒泡〉 → 亦可能因病人嚴重感染造成。  
\*\*\* Lymphocyte 必須  $> 95\%$ ，若  $< 95\%$  → Mnl gate 手動圈選 → F8 Result are Printing

3.4.2.3.4 《測 Control》換 Tube 2 → 待光點出現 → 按 F1 → F8  
\*\*\* unstained 必須  $> 95\%$

3.4.2.3.5 《測 CD3/CD4》換 Tube 3 → 待光點出現 → 按 F1 → F8

3.4.2.3.6 《測 CD3/CD8》換 Tube 4 → 待光點出現 → 按 F1 → F8

3.4.2.3.7 《測 CD3/CD19》換 Tube 5 → 待光點出現 → 按 F1 → F8  
\*\*\* 若忘了換管：未按 F1 → 換 Tube；已經按 F1 → F1 Stop Acq → 換 Tube → restart。

3.4.2.3.8 RUN 完 Tube 1~ 5，換 dist.H2O。〈不同檢體間之清洗〉

3.4.2.3.9 按 F8 → 即可換另一檢體。

3.4.2.3.10 待所有檢體 RUN 完，換管 PBS 2 ml，印表機停止 → Chg Test 跳出 → 回至時鐘螢幕 → 調至 standby → 關氣閥▲down → 關主機、電腦。  
\*\*\* 關機後至少 40 分鐘才能再開。

### 3.5 注意事項

3.5.1 若 leucogate 很亂無法算或重複加 lysing buffer 兩次，仍無法完全 lyse RBC → 可能因病人使用 steroid，以致破壞細胞 → 告知醫師無法做，取消。

#### 3.5.2 試劑：

Leucogate → 含所有 Lymphocyte CD45/CD14

Control → IgG only, from mouse, for background control

IgG1(FITC)+IgG2a(PE)

CD3 → Total T cell .... FITC

CD4 → Helper T cell ..... PE

CD8 → Suppressor T cell ..... PE

CD19 → Mature B cell ..... PE

#### 3.5.3 結果判讀

Tube 3、4、5 之 CD3 誤差必須 < 5%

若  $CD4 + CD8 > CD3$  → CD8 自減 5% → 若仍然  $> CD3$ ，須重做。

$Th / Ts = CD4 / CD8$

服用 steroid 之病患 CD8 ↑ ↑

CD8 ↑ → 表有發炎現象

#### 3.5.4 Normal Range：

CD3 75±10 %

CD4 45±10 %

CD8 28±8 %

CD19 10±5 %

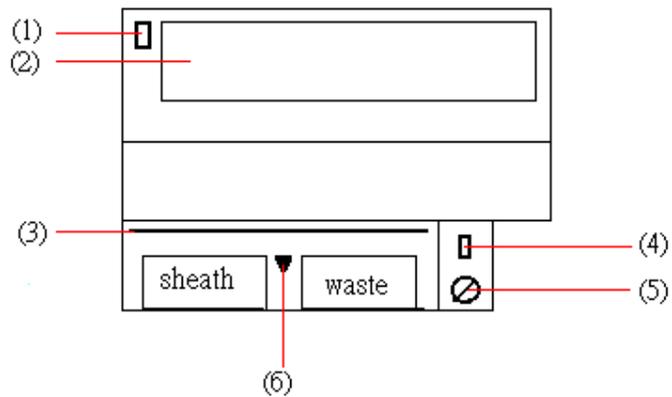
Th / Ts 1.5 ~ 2.0

3.5.5 HLA - B27 檢體最多可放 3 日、L.S. 24 ~ 36 hrs，能當日做最好。處理好之 cell susp. 可暫存於 4°C。

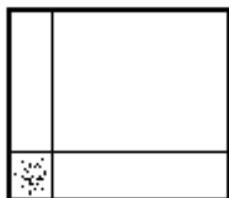
### 3.6 HLA - B27 之檢測

3.6.1 每個檢體用三支試管，分別加入 (1) Leucogate (2) control (3) B27 之 monoclonal Ab 各 10 μl，參照 3.4.1，其下步驟與 Lymphocyte subpopulation 同。

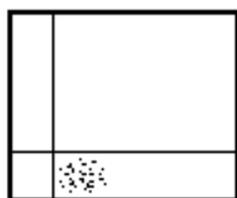
3.6.2 上機讀完 Tube2 後 → 換 Tube3 (B27) → 待光點出現 (勿按 F1)，即可判讀。



- < 1 > POWER
- < 2 > 設定面板
- < 3 > 空氣濾板：需要時以清潔劑沖洗，晾乾後放回。
- < 4 > FLOW RATE
  - HI：Marker (routine)
  - LOW：DNA
- < 5 > Standby：暫停時用。
  - RUN
  - DRAIN：wash with PBS or H<sub>2</sub>O 至冒泡。
- < 6 > 氣閥：▼up (open)、▲down  
(測試中途欲取出兩旁桶子，先關此閥洩氣。)



(1)  
B27 -



(2)  
B27 +



(3)  
\*可能因 B7 or B37  
crossreaction.

正中、偏左：B27 -  
偏右：B27 +