



EXAMENSARBETE

Våren 2015

Sektionen för Lärande och Miljö
Biomedicinsk laborietvetenskap

UTARBETA LABORATION I FLÖDESCYTOMETRI FÖR STUDENTER VID BIOMEDICINSKA ANALYTIKER- PROGRAMMET

Författare

Sofie Jensen

Handledare

Helena Tassidis, HKR

Examinator

Ann-Sofi Rehnstam-Holm, HKR

Abstrakt

Flödescytometri är en metod som analyserar cellsuspensioner genom att låta cellerna passera genom en laserstråle en och en. Cellernas påverkan på ljuset orsakar scatter vilket ger information om granularitet och cellstorlek. Lasern kan även excitera fluorescerande färger som kan vara inbundna direkt till eller till cellens inre strukturer. Celler som plottas ut på samma plats i ett flödescytometriskt scatterdiagram, som till exempel blodets B- och T-lymfocyter, kan åtskiljas med fluorescenskonjugerade antikroppar som fäster på cellernas unika CD markörer. En flödescytometrisk laboration utarbetades med syfte att kunna användas för undervisning av studenter vid Högskolan Kristianstads biomedicinska analytikerprogram. Aspekterna användarvänlighet och ekonomi beaktades därför också. Av de protokoll som jämfördes erhöll lyseringsbuffert enligt Ballesteros *et al.* (2014) tillsammans med PBS med 2 % BSA som infärgningsbuffert tillräckliga cellpopulationer och antikroppsbindning för att kunna avläsas av en bma-student. Detta protokoll hade alla aspekter bra för en studentlaboration och även var mest ekonomiska alternativet.

Nyckelord: flödescytometri, lymphoprep, lysering av erythrocyter, CD 4, CD 19, lymfocyter, laboration, protokoll

Abstract

Flow cytometry is a method that analyses cellsuspensions by letting the cells pass through a laserbeam one by one. The effect of the cells on the laser causes the light to scatter which gives information about the cell granularity and size. The laser can also excite fluorescent colours that bind to the surface of the cell or to structures inside the cell. Antibodies conjugated with fluorescent molecules can bind to unique CD markers on the surface of the cell. This can be used to separate cells that are plotted in the same location in a scatterplot, for example the B- and T-lymphocytes of the blood. A laboratory assignment in flow cytometry was requested for students at Högskolan Kristianstads Biomedical Laboratory Science program. The aspect of easy-to use and economy was taken into account. Of the compared protocols the lysisbuffer from Ballesteros *et al.* (2014) along with PBS with 2 % BSA as staining buffer gave sufficient cellpopulations and binding of antibodies for interpretation by a bma-student. This protocol was an adequate student assignment in all aspects and was also the most economical alternative.

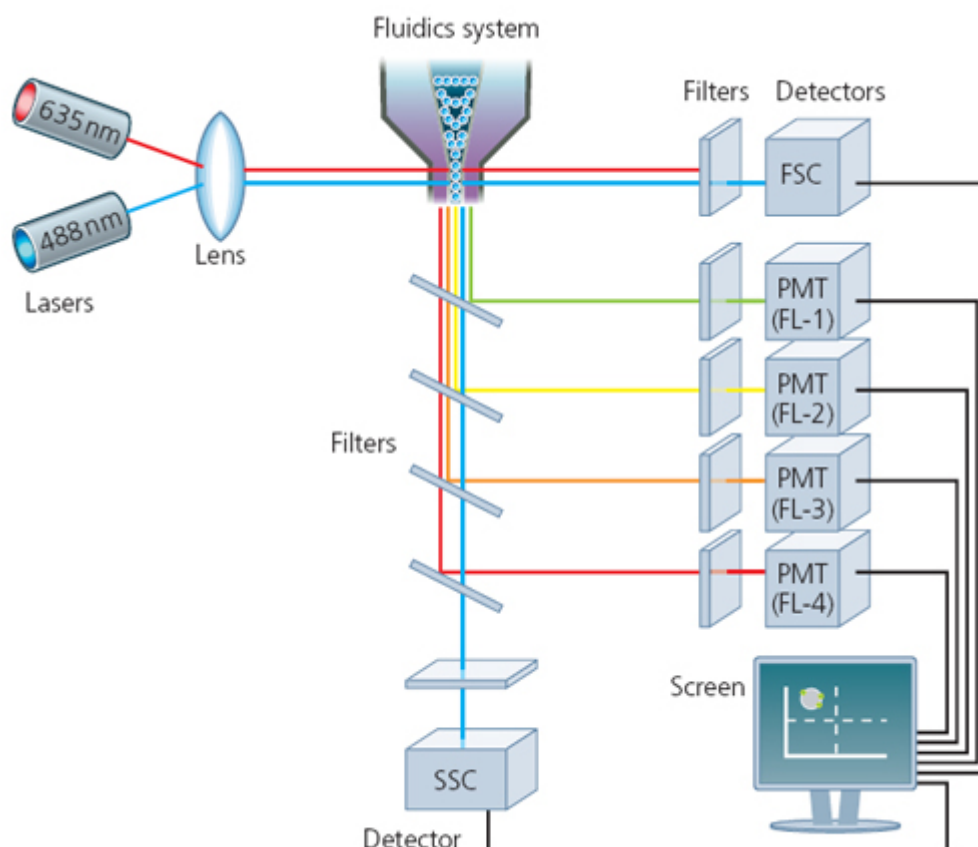
Keywords: flow cytometry, lymphoprep, lysing of erythrocytes, CD 4, CD 19, lymphocytes, assignment, protocol

Innehållsförteckning

Inledning	4
Material och Metoder	7
Blodprovstagning	7
CD 19 och CD 4 inmärkning av mononukleära celler	7
Beräkning av viabla celler	8
Manuell differentialräkning av leukocyter	8
CD 19 och CD 4 inmärkning av perifert helblod	8
Resultat	9
Analys av mononukleära celler	9
Differentialuträkning av lymfocyter	11
Lysering av erythrocyter.....	12
Antikroppsspädning.....	14
Diskussion	14
Slutsats	16
TACK	16
Referenser	17
Populärvetenskaplig sammanfattning	19
Bilaga 1	20
Bilaga 2	21

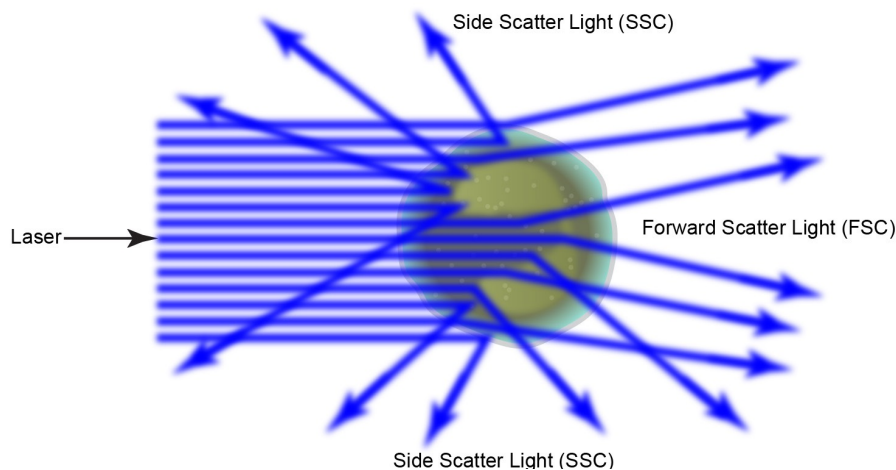
Inledning

Flödescytometri är en analysmetod som kan användas för att undersöka cellers egenskaper genom att låta celler i vätska passera en och en genom en laserstråle. Detta kan ge en snabb analys av många olika egenskaper såsom cellstorlek och cytoplasmiskt innehåll (granularitet), mängd DNA och/eller RNA. Flödescytometri tillämpas ofta vid immunfenotypning av bland annat perifert blod, benmärgsvätska (Brown & Wittwer, 2000), cerebrospinalvätska och solid vävnad (Virgo & Gibbs, 2014). Utöver humana celler kan det även appliceras inom t.ex. växtbiologi, bakteriologi samt analys av jäst och plankton. Inom växtbiologi är det vanligt att flödescytometri används för att analysera reglering av cellcykeln (Jayat & Ratinaud, 1993). Inom forskning och i läkemedelsbranschen är det vanligt att analysera apoptos samt cellcykelsanalyser efter olika behandlingar (Bertho *et al.* 2000; Dorian *et al.* 1998). På de kliniska laboratorierna används flödescytometri till en rad analyser såsom kreatinivärde i serum för analys av njurfunktionen, antal leukocyter, erythrocyter och hemoglobinmolekyler per volym för blodbilden samt T-lymfocytstatus hos HIV (Human Immunodeficiency Virus) patienter. Ett förhöjt eller sänkt antal leukocyter som flödescytometri också kan analysera kan vara ett tecken på lymfom (Nilsson-Ehle *et al.* 2012).



Figur 1. Schematisk bild av flödescytometri. Cellen passerar genom laserstrålen, ljusets spridning registreras och sorteras av optiska speglar, linser och filter som leder ljuset till rätt detektor varvid informationen registreras i mjukvaran (Bio-Rad AbD Serotec Ltd, med tillåtelse).

Generella principer för flödescytometri är att analysera optiska och fluorescerande egenskaper hos en cell eller andra partiklar. Celllösningen suggs upp i flödescytometern och med hjälp av hydrodynamisk fokusering och sheath fluid passerar cellerna via en kanal genom en laserstråle en och en (figur 1). När cellen träffas av laserstrålen inräffar en ljusspridning kallat Forward Scatter (FSC eller Forward Scatterd Light, FSL) och Side Scatter (SSC). FSC är ljuset som sprids framåt runt cellen och anger cellens storlek. SSC är det ljus som registrerar cellens innehåll, granulation och organeller (figur 2). När FSC och SSC registreras av flödescytometerns optiska system plottas varje partikel som passerat lasern ut i ett scatterdiagram (ACEA Biosciences, 2014; Brown & Wittwer, 2000). Flödescytometern kan även användas som cellsorterare där olika celltyper kan sorteras och samlas upp och som cellräknare för exempelvis antal trombocyter eller andra blodceller per volym blod (Virgo & Gibbs, 2012).



Figur 2. Schematisk bild som visar ljusets spridning när laserstrålen träffar cellen, spridning registreras och ger information om cellinnehåll genom SSC och storlek genom FSC (ACEA Biosciences, 2014).

Lasern kan även excitera fluorokromer som kan ge information om cellernas egenskaper utöver storlek och innehåll. Exempel på dessa är fluorescein isothiocyant, FITC, och phycoerythrin, PE, och det är vanligt att dessa fluorokromer konjugeras till antikroppar. Antikropparna riktar mot specifika proteiner på cellytan eller intracellulärt. Fluorokromerna exciteras sedan av lasern och i analysen bekräftas det om antikropparna bundit in (Brown & Wittwer, 2000). Antikropparna kan binda till proteiner genom kovalenta bindningar eller som ligander till en receptor (Vernhall *et al.* 2014). De optiska speglarna och filter som finns inne i flödescytometern separerar de olika typerna av emitterade ljus och gör att mjukvaran registrerar hur mycket av vilken ljusstyp som emitterats. De exciterade fluorerscensmolekylernas ljus leds genom fotomultiplikator för att fånga upp även svaga signaler och detta omvandlas till data som analyseras av instrumentets mjukvara. Både FITC och PE exciteras av blå laser på 488 nm (ACEA Biosciences, 2014). Fluorokromkonjugerade antikroppar riktade mot proteiner används inom bland annat immunologi, patologi och cellbiologi (Preffer & Dombkowski, 2009; Virgo & Gibbs, 2012). Cellanalyser med fluorescerande infärgningar har tillämpats sedan 1960-talet och år 2002 blev instrument med

multilaserplattform tillgängliga kommersiellt. De fluorescenskonjugerade antikropparna kunde då utnyttjas maximalt genom att mer än en fluorokrom kunde användas vid samma analys (Preffer & Dombkowski, 2009).

Bildningen av alla blodets celler börjar i benmärgen med en hematopoetisk stamcell. Därefter delas cellbildningen upp i olika linjer, en lymfoid linje och en myeloid linje. Hematopoesen som bildar erythrocyter, trombocyter och leukocyter som till exempel basofiler, eosinofiler, neutrofiler och monocyter tillhör alla den myeloida linjen. Lymfocyter, och natural killer (NK)-celler tillhör den lymfoida linjen. Från denna utvecklas lymfocyterna till B- eller T-lymfocyter men kategoriseras fortfarande som leukocyter. Förenklat ombesörjer erythrocyterna syreomsättningen, trombocyterna koagulationen och leukocyterna immunförsvaret (Miwa, 1998). I en normal blodbild består lymfocyterna av 70-80 % T-lymfocyter och 5-10 % B-lymfocyter (Nilsson-Ehle *et al.* 2012). Lymfocyternas uppgifter i immunförsvaret är att svara på antigen. Endast T-lymfocyterna utmognar i thymus men både de och B-lymfocyterna bildas i benmärgen. Lymfocyterna kan aktiveras och bekämpa antigen direkt i blodkärlen genom kemotaxi som produceras av makrofager och antigenpresenterande dendritiska celler. Aktiverade B-lymfocyter differentieras till plasmaceller som producerar antikroppar kallade immunoglobuliner. T-lymfocyter som aktiverats till effektorceller blir antingen cytotoxiska som dödar infekterade kroppsegna celler, T-hjälparceller som aktiverar B-lymfocyter och makrofager, eller regulatoriska som dämpar de delar av immunförsvaret som inte behövs för att svara på infektionen. När antigenen binder till T-lymfocyterna aktiveras de direkt medan B-lymfocyter behöver både antigen och T-hjälparcellerna för att aktiveras. Beroende på vilket antigen som binder in på cellen differentierar cellen efter behov och på så sätt delas just de celler som svarar på patogenen. De lymfocyter som överlever efter infektionen fungerar som minnesceller inför nästa angrepp om en infektion av samma typ skulle återkomma vilket utnyttjas vid vaccination (Murphy, 2008.)

En lymfocyt kan inte identifieras som en B- eller T-lymfocyt bara efter sitt utseende i mikroskop eller var den plottas i scatterplot från flödescytometrianalys. En metod att skilja lymfocyterna åt är att analysera Clusters of Differentiation (CD markörer) på deras cellyta (Nilsson-Ehle *et al.* 2012). Dessa membranproteiner fungerar bland annat som hjälp för receptorer för att t.ex. känna igen antigen och som signaltransmittorer. De är specifika för varje cell och kan på så vis användas för att identifiera cellers fenotyp. Vid hematologiska analyser med flödescytometri är det vanligt att använda antikroppar som är riktade mot olika CD markörer. CD 45 är gemensam för alla hematopoetiska celler medan andra CD markörer bara finns på en enda typ av cell som till exempel CD 3, som bara finns på T-lymfocyter (Murphy, 2008). Vissa markörer varierar också med cellernas mognadsgrad och kan därför säga i vilket mognadsstadium cellen befinner sig (Nilsson-Ehle *et al.* 2012). När en lymfoid stamcell mognar till en B-lymfocyt eller en T-lymfocyt kommer den vid ett mognadsstadium ha CD 10 vilket den senare förlorar när den prolifererar ytterligare (Murphy, 2008). Mogna T-lymfocyter är positiva för CD 3 och mogna B-lymfocyter är positiva för CD 19. T-lymfocyter kan även delas in i T-hjälparceller och cytotoxiska T-lymfocyter genom att analysera CD 8 och CD 4 där T-hjälparceller är positiva för CD 4 och cytotoxiska T-lymfocyter är positiva för CD 8 (Nilsson-Ehle *et al.* 2012). Förskjutningen mellan mängdförhållandet B- och T-

lymfocyter kan användas vid diagnostisering av bland annat HIV då antalet T-lymfocyter sjunker och då förändras även kvoten mellan CD 4 och CD 8 positiva celler. Kvoten kontrolleras också för att följa sjukdomsförloppet och kunna se hur sjukdomen utvecklas. Även totalprocenten av T-lymfocyter jämförs med tidigare resultat för att se om behandlingar varit effektiv eller om profylax mot andra infektioner måste sättas in (Labtestonline, 2013). Vid leukemier och lymfom kan halten av mogna och omogna celler förskjutas vilket analyseras genom CD markörer. Även här ses sjukdomens aggressivitet och förlopp genom kontinuerliga prover och analyser (Gahrton & Juliusson, 2012). Lymfom är en cancersjukdom som kan vara hög- eller lågmalign och kan drabba olika delar av lymfopoesen. Vilken typ av lymfom det är beror på vilken del av lymfopoesen som drabbats. För att utreda detta kan Polymerase Chain Reaction (PCR) metoder användas men först görs en flödescytometrisk analys av provet. Kronisk lymfatisk leukemi, KLL som är vanlig bland äldre patienter, diagnostiseras genom att mäta kvoten av kappa- och lambda immunoglobulin molekyler på cellerna. Dessa åtskiljs och räknas med flödescytometri genom fluorescenskonjugerade riktade antikroppar (Gahrton & Juliusson, 2012).

Tidigare fanns flödescytometri framför allt vid större forskningscenter men idag är det standard som analysmetod vid många sjukhus. Vid Region Skåne används flödescytometri för bland annat benmärgsutredning, fetomaternal blodning, Sjögrens syndrom och trombocytaktivering (Region Skåne, 2015). Tekniken har utvecklats till att det nu finns mindre och användarvänligare apparater. Högskolan Kristianstad har nyligen investerat i en flödescytometer av bänkmodell (ACEA, Novocyte, USA).

Syftet med denna studie är att utforma två flödescytometriska protokoll för inmärkning av B- och T-lymfocyter som kan användas vid studentlaborationer. Ett protokoll baseras på inmärkning efter isolering av mononukleära celler och det andra baseras på inmärkning av cellerna direkt i perifert helblod genom lysering av erythrocyter.

Material och Metoder

Blodprovstagning

Perifert blod togs i EDTA-rör (BD Vacutainer, England) från fem friska informerade frivilliga vuxna enligt rutiner för blodprovstagning. Ingen etisk prövning krävdes då denna studie utfördes inom ramen för högskoleutbildning på grundnivå. Blodet användes till analyserna inom 48 h från provtagningstillfället.

CD 19 och CD 4 inmärkning av mononukleära celler

Perifera mononukleära blodceller (MNC) isolerades genom separation av helblod med LymphoPrep™ (Fresenius Kabi, Norge) enligt tillverkarens instruktioner. Fyra ml helblod spädades med PBS (Invitrogen, USA) innehållande 2 % BSA (Sigma-Aldrich, USA) i ett 1:1 förhållande. Tre ml LymphoPrep™ tillsattes i 15 ml falconrör (SARSTEDT AB, Tyskland), därefter tillsattes 4 ml av det spädda blodet ovanpå med försiktighet för att bilda ett skikt. Rören centrifugerades vid 800 x g (SIGMA4-16 K) i 20 minuter, 30 minuter om det var över

2 h sedan blodprovet tagits, i rumstemperatur (RT) utan broms. Efter centrifugering isolerades de mononukleära cellerna genom att överföra mellanskiktet till nya rör och tvättades sedan med 3 ml PBS med centrifugering vid 500 x g i 5 minuter. Supernatanten dekanterades och cellerna resuspenderades i 1 ml PBS, därefter räknades antalet celler med hjälp av Bürkerkammare. Femhundredratusen till en miljon celler överfördes till fyra 12*75 mm rör (SARSTEDT AB, Tyskland), därefter tvättades cellerna med 1 ml PBS och centrifugerades i 500 x g i 5 minuter. Supernatanten dekanterades och cellerna resuspenderades i 100 µl PBS med 2 % BSA och 0,25, 0,125 och 0,05µg PE konjugerad CD 19 (eBioscience, USA) och 1, 0,5 och 0,2 µg FITC konjugerad CD 4 antikropp (eBioscience, USA) tillsattes och inkuberades mörkt i 20 minuter, RT. Efter inkubering tvättades cellerna med 3 ml PBS genom att centrifugeras i 500 x g i 5 minuter varefter supernatanten dekanterades och cellerna resuspenderades med 500 µl infärgningsbuffert (eBioscience, USA) och analyserades därefter i flödescytometern (Novocyte, ACEA, USA).

Beräkning av viabla celler

För celler isolerade med LymphoPrep™ gjordes efter varje tvätt även en infärgning med tryptanblått i 10 minuter. Till 10 µl cellösning tillsattes 10 µl tryptanblått för att kontrollera hur centrifugering påverkade viabiliteten. De döda cellerna infärgades blå och de levande cellerna påverkades inte av infärgningen då deras membran fortfarande är intakt. Medelvärdet för antalet döda och levande celler beräknades för tre A-rutor i Bürkerkammare.

Manuell differentialräkning av leukocyter

Perifert blod som användes till flödescytometri analys ströks ut på objektglas och färgades med ett Hemacolor kit (Merck Millipore, Tyskland). Cellutstryken färgades manuellt genom att doppa glasen 5 gånger i fixeringslösning i 1 sekund, följt av Hemacolor red 3 gånger i 1 sekund, Hemacolor blue 6 gånger i 1 sekund och fick därefter sedan stå i Hemacolor buffert i 45 sekunder. De färgade utstryken fick sedan lufttorka innan de räknades i mikroskop (Nikon, Japan) med 100X förstoring och immersjonsolja. Cellräkningen utfördes genom att 100 leukocyter räknades på tre glas per blodprov och sedan beräknades medelvärdet.

CD 19 och CD 4 inmärkning av perifert helblod

Helblod pipetterades till fyra 12*75 mm rör (SARSTEDT AB, Tyskland), därefter tillsattes 0,25, 0,125 och 0,05µg PE konjugerad CD 19 (eBioscience, USA) och 1, 0,5 och 0,2 µg FITC konjugerad CD 4 antikropp (eBioscience, USA), till en slutvolym av 100 µl per rör och inkuberades mörkt i 30 minuter, RT. Efter inkubering tillsattes 2 ml 1 x RBC (Red Blood Cells; eBioscience, USA) lyseringsbuffert och rören pulsvortexades försiktigt tre gånger och inkuberades ytterligare 15 minuter mörkt i RT. Därefter centrifugerades rören vid 500 x g i 5 minuter (SIGMA4-16 K), supernatanten dekanterades och cellerna resuspenderades i 1 ml 1 x RBC lyseringsbuffert och inkuberades mörkt i 3 minuter, RT för ytterligare lysering av erythrocyter. Rören centrifugerades därefter vid 500 x g i 5 minuter, RT, supernatanten dekanterades och cellerna tvättades i 2 ml infärgningsbuffert (eBioscience, USA) genom centrifugering vid 500 x g i 5 minuter, RT. Efter tvätt dekanterades supernatanten och cellerna

resuspenderades i 200 µl infärgningsbuffert och analyserades i flödescytometern (Novocyte, ACEA, USA). Samma protokoll följdes även med lyseringsbuffert enligt Ballesteros *et al.* (2014). Lyseringsbufferten förbereddes enligt recept (150 mM NH₄Cl, 10 mM NaHCO₃ och 0,1 mM EDTA pH 7,5). Lyseringsbuffert enligt recept McCoy från Creighton University (1998) förbereddes (1,5 M NH₄Cl, 100 mM NaHCO₃ och 10 mM EDTA pH 7,4). Därefter följdes även här protokollet för kommersiell lyseringsbuffert. Även ett protokoll där erythrocyter lyserades med RBC, Ballesteros *et al.* (2014) och McCoy (1998) analyserades men där den kommersiella infärgningsbufferten byttes ut i samtliga steg mot PBS med 2 % BSA.

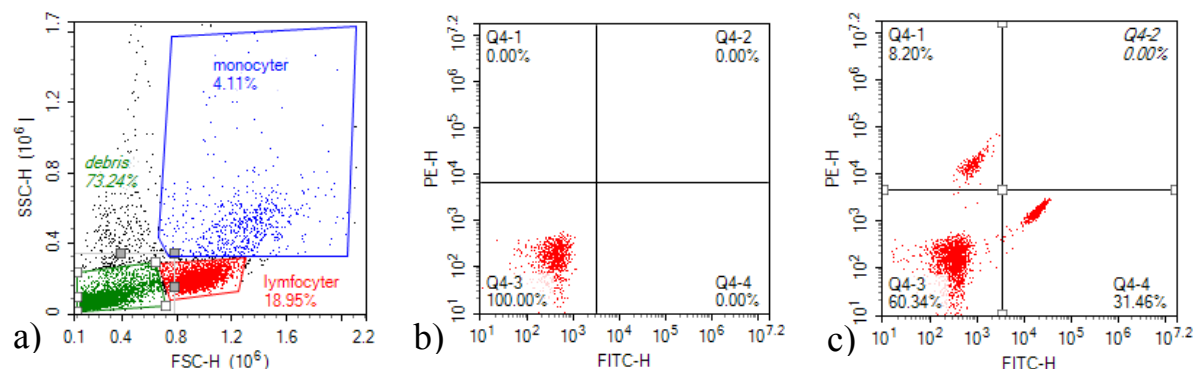
Statistik

Students t-test utfördes för att jämföra antikroppsbindning mellan de olika lyseringsbuffertarna. Resultaten presenteras som medelvärde ± standardavvikelse (SD) samt variationskoefficienten (CV) vid jämförelse av manuella leukocytutstryk och flödescytometri analys.

Resultat

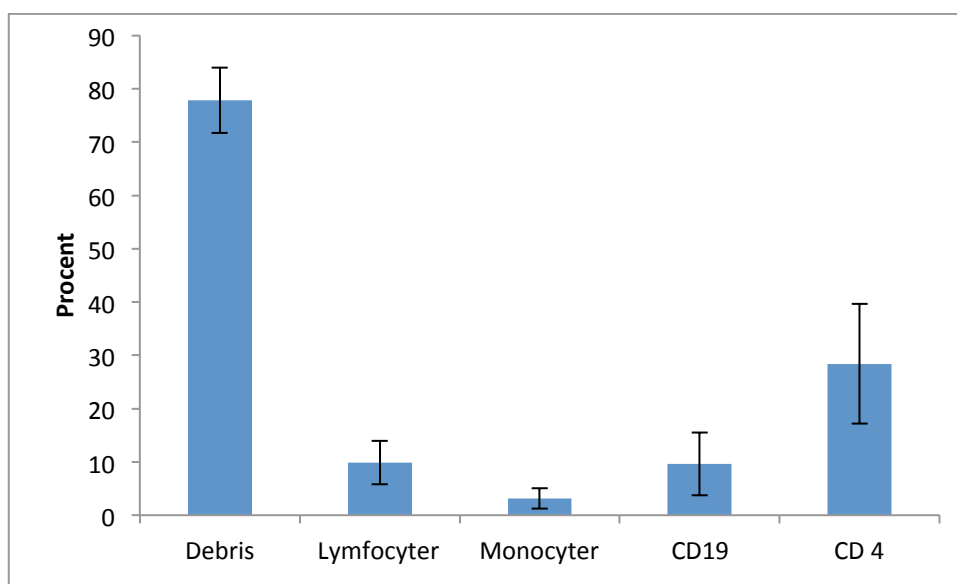
Analys av mononukleära celler

Av de mononukleära celler (MNC) analyserades andelen B- och T-lymfocyter isolerade med LymphoPrepTM från 5 blodprov. Figur 1a visar ett representativ blodprov med ett FSC och SSC scatterdiagram där fyra populationer erhöles bestående av 73,24 % debris, 18,95 % lymfocyter och 4,11 % monocyter (figur 1a). Därefter isolerades lymfocyterna från FSC och SSC scatterdiagrammet genom att sätta en gate runt populationen och nytt scatterdiagram togs fram med CD 19-PE på y-axeln och CD 4-FITC på x-axeln (figur 1b). I detta scatterdiagram sattes en kvadratisk gate för att analysera andelen infärgade celler efter inkubering med antikroppar. Figur 1c visar att 8,20 % B-lymfocyter och 31,46 % T-lymfocyter var positiva för CD 19 respektive CD 4 efter inkubering (figur 1c).



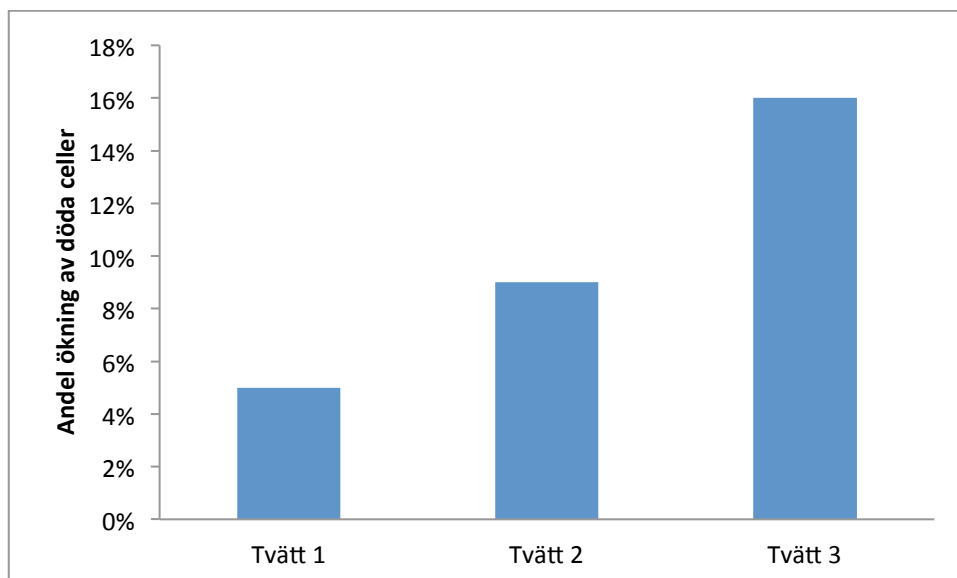
Figur 1. Separation av MNC med LymphoPrep™ a) scatterbild av samtliga celler, lymfocyter (18,95 %) monocyter (4,11 %) samt debris (73,24 %). b) gatade lymfocyterna utan inkubering av antikroppar c) lymfocyter positiva för CD 4 (31,46 %) och CD19 (8,20 %) antikroppar.

För att undersöka om resultaten blev reproducerbara med perifert blod från olika personer, analyserades blod från fem personer. Figur 2 är ett stapeldiagram som visar medelvärde och standardavvikelse för de olika populationerna debris 77 % ± 6,14, lymfocyter 10 % ± 4,05, monocyter 3 % ± 2, B-lymfocyter (CD 19) 10 % ± 5,89, T-lymfocyter (CD 4) 28% ± 11,22.



Figur 2. Diagram över erhållna populationer från isolering med LymphoPrep™ (medelvärden ± SD $n=5$).

Debris från isolering med LymphoPrep™ kan bestå av trasiga celler samt kontaminering av trombocyter. För att analysera om den stora andelen debris består av trombocyter eller trasiga celler räknades andelen döda celler genom inkubering med tryptanblått och beräkning i Bürkerkammare efter första tvätten. Detta gav 46 % döda celler samt stor mängd trombocyter (ej visat resultat). Därefter gjordes ytterligare tre tvättar och beräkning av döda celler efter samtliga tvättsteg utfördes (Figur 3). Andelen döda cellerna ökade med ca 50 % efter varje tvättsteg och totalantalet döda celler vid analys i flödescytometri låg på 16 %.



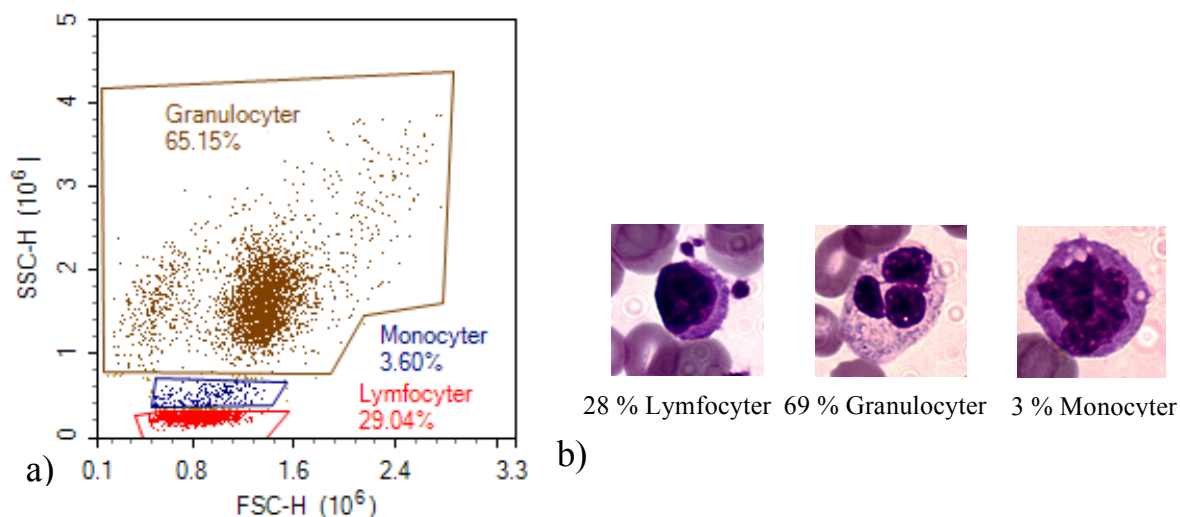
Figur 3. Andel celler i procent som tagit upp tryptanblått efter tvättstegen ($n=1$).

Differentialuträkning av lymfocyter

Manuella utstryk och differentialräkning av leukocyter gjordes för att bekräfta andelen av populationerna i scatterdiagrammet från flödescytometrin. Två blodprov jämfördes med differentialräkning och scatterdiagram (tabell 1). Figur 3 visar en representativ bild från flödescytometrin samt representativa foto på granulocyter, lymfocyter och monocyter från differentialutstryken.

Tabell 1. Jämförelse av manuell beräkning av granulocyter, lymfocyter och monocyter i leukocyutstryk med samma populationer från flödescytometri. Normalvärden enligt Nilsson-Ehle *et al.* (2012). Standardavvikelse (SD) och variationskoefficient (CV) $n=2$

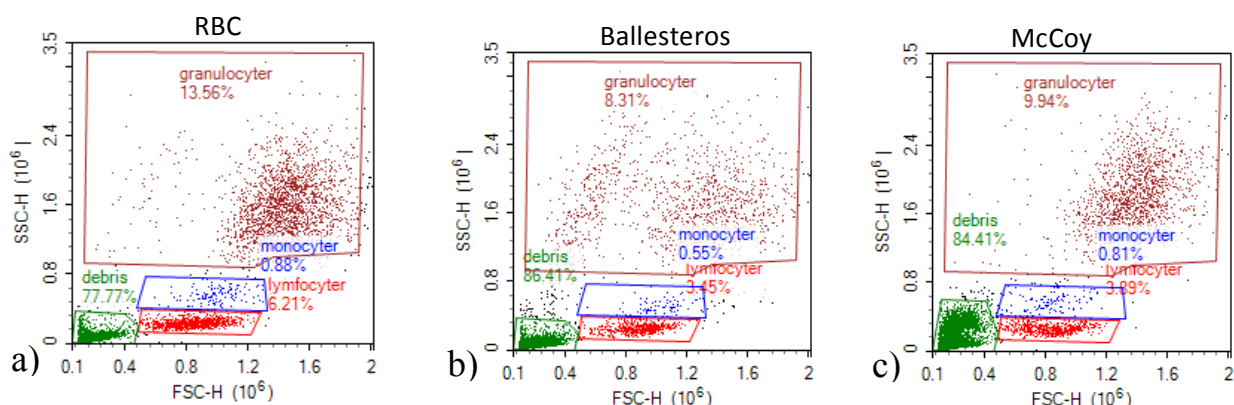
	Neutrofila granulocyter Medelvärde \pm SD (CV)	Lymfocyter Medelvärde \pm SD (CV)	Monocyter Medelvärde \pm SD (CV)
Blodprov	70 % \pm 0,014 (2)	26 % \pm 0,028 (11)	3,5 % \pm 0,007 (20)
Flödescytometri	66 % \pm 0,007 (1)	29 % \pm 0,007 (2)	5 % \pm 0,014 (28)
Normalvärde	58 %	38 %	3,4 %



Figur 4. Representativt SSC, FSC scatterdiagram av andelen lymfocyter (29 %), monocyter (3,6 %) och granulocyter (65,2 %) i perifert blod lyserat med RBC. a) flödescytometri b) representativa bilder på leukocyter från differentialräkningen med total andel granulocyter på 69 %, monocyter 3 % och lymfocyter på 28 %.

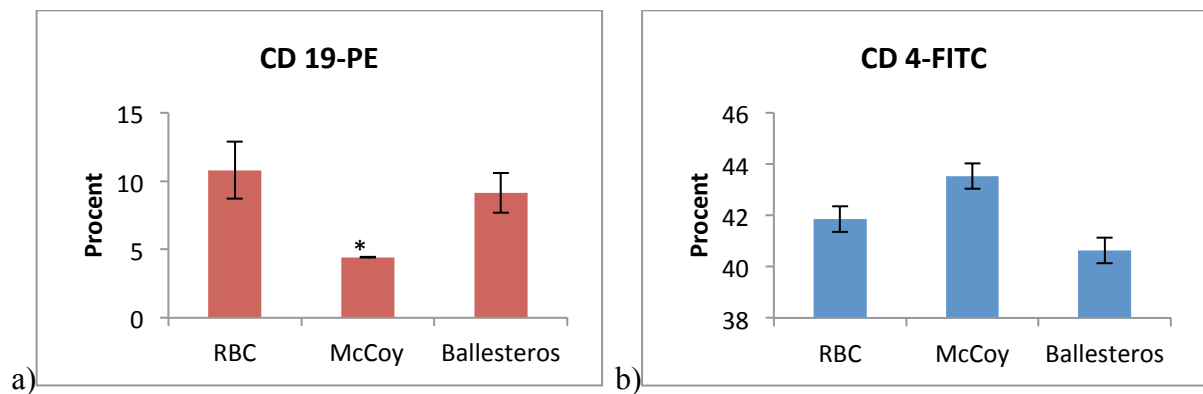
Lysering av erythrocyter

Tre olika buffertar, kommersiell RBC, McCoy och Ballesteros jämfördes för att finna den mest ekonomiska och bäst fungerande metoden att lysera erythrocyter. Protokollet från den kommersiella RBC lyseringen följdes alla fallen. Scatterdiagram med alla populationer analyserades efter preparation med respektive lyseringsbuffert, kommersiell RBC (figur 5a) lyseringsbuffert enligt Ballesteros *et al.* (2014) (figur 5b) samt lyseringsbuffert enligt McCoy (1998) (figur 5c). Genom att jämföra andelen cellpopulationer kunde inga större skillnader mellan preparationerna med olika lyseringsbuffertar ses. Däremot visar resultatet av preparationen med buffert från Ballesteros *et al.* (2014) en mer spridd population av granulocyter (se fig 5b).



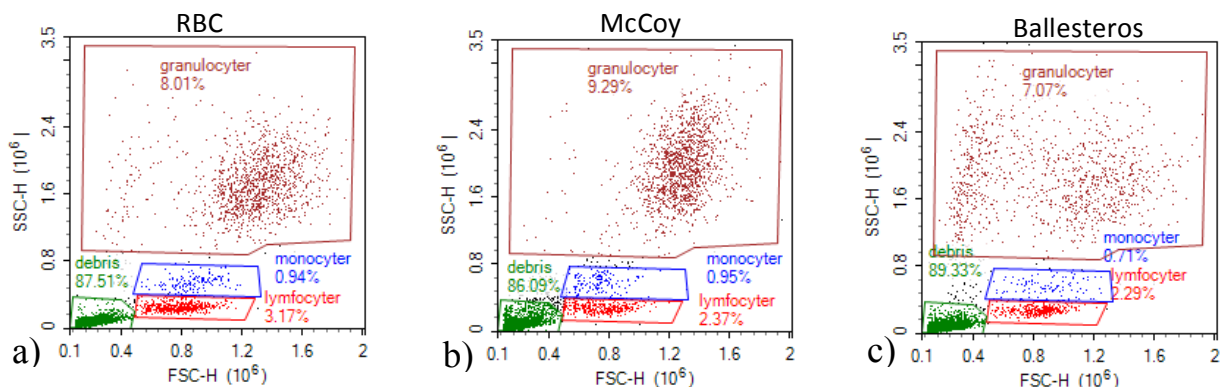
Figur 5. Scatterdiagram över cellpopulationerna och debris erhållna från lyseringsbuffert a) RBC, b) Ballesteros och c) McCoy.

Från SSC och FSC scatterdiagrammet ”gatades” sedan lymfocytpopulationen in och andelen CD 19-PE och CD 4-FITC positiva B- och T-lymfocyter från McCoy och Ballesteros jämfördes mot RBC (figur 6). Ett oparat t-test för antikroppsbindningen visade ingen skillnad i inbindning av CD 4 till T-lymfocyterna i McCoy ($p=0,39$) eller Ballesteros ($p=0,33$) jämfört med RBC, medan inbindning av CD 19 till B-lymfocyter påverkades av lysering enligt McCoy ($p<0,05$).



Figur 6. Jämförelse av antikroppsbindning mellan McCoy och Ballesteros mot kommersiell RBC lyseringsbuffert a) CD 19 positiva B-lymfocyter, b) CD 4 positiva T-lymfocyter, (medelvärden \pm SD $n=2$) * $p \leq 0,05$

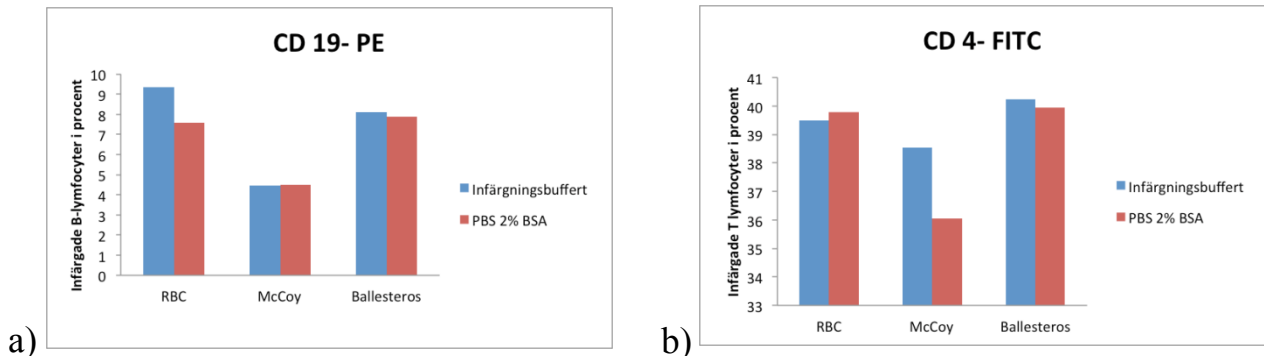
För att analysera om den kommersiella infärgningsbufferten kunde ersättas med PBS-2 % BSA utfördes samma lyseringsprotokoll men där alla steg med infärgningsbuffert byttes ut mot PBS-2 % BSA. SSC och FSC scatterdiagrammen visar ingen skillnad mellan andelen populationer, medan granulocyterna med buffert från Ballesteros visar en mer spridd cellpopulation (figur 7).



Figur 7. Scatterdiagram över cellpopulationerna och debris erhållna när kommersiell infärgningsbuffert byttes ut mot PBS-2 % BSA, a) RBC, b) McCoy och c) Ballesteros.

Samma blodprov analyserades vid samma tillfälle och med samma protokoll för att jämföra om antikroppsbindningen påverkades när kommersiell infärgningsbuffert (eBioscience) byttes ut mot PBS-2 % BSA. McCOys lysningsbuffert med PBS-2 % BSA som infärgningsbuffert hade sämst inbindning av antikroppar både för CD 4 och CD 19 (figur 8 a

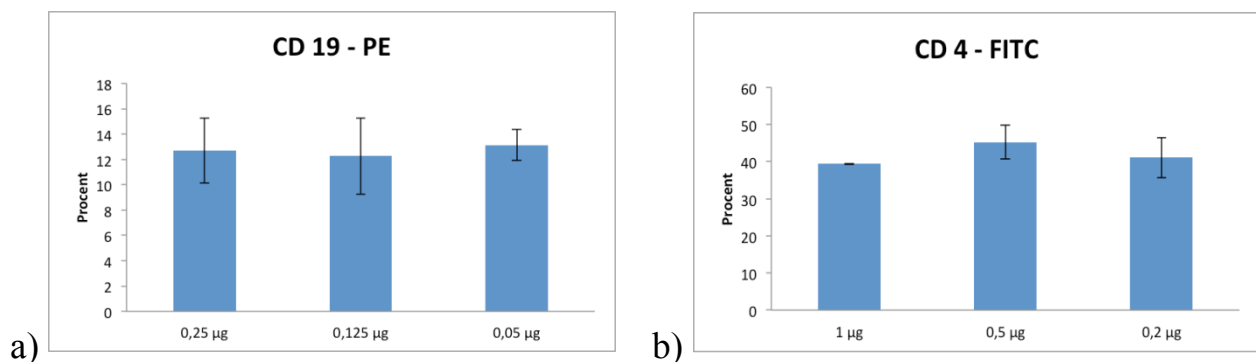
och b). McCoy visade sig ge en signifikant minskning av CD 19 inbindning till B-lymfocyter (figur 6a) och även här blev det en minskad inbindning av CD 4 till T-lymfocyter när kommersiell infärningsbuffert byttes ut mot PBS med 2 % BSA (figur 8 b).



Figur 8. Jämförelse av antikropps-inbindning med kommersiell infärningsbuffert (eBioscience) och PBS med 2 % BSA a) CD 19 inbindning till B-lymfocyter, b) CD 4 inbindning till T-lymfocyter.

Antikropps-spädning

Vid infärgning med antikroppar rekommenderas 0,25 µg för CD 19-PE och 1 µg för CD 4-FITC per prov. För att undersöka om denna mängd antikropp kan minimeras utfördes en antikropps-spädning med 0,25, 0,125 och 0,05µg för PE konjugerad CD 19 och 1,0, 0,5 och 0,2 µg för FITC konjugerad CD 4 antikropp. Mängden utprovades i två blodprov och resultaten från flödescytometri visar att skillnaden mellan koncentrationerna inte är signifikant (figur 9).



Figur 9. Stapeldiagram över antikropps-spädning med a) 0,25µg, 0,125µg och 0,05µg CD 19-PE antikropp och b) 1µg, 0,5µg och 0,2µg CD 4-FITC antikropp. (medelvärden ± SD n=2)

Diskussion

Syftet med denna studie var att utforma två flödescytometriprotokoll för inmärkning av B- och T-lymfocyter som kan användas i laborationer med studenter. Vid isolering av mononukleära celler med LymphoPrep™ kunde tydliga cellpopulationer med monocyter och

lymfocyter ses. Även antikroppsinfärgning med PE konjugerad CD 19 som binder till B-lymfocyter och FITC konjugerad CD 4 som binder till T-lymfocyter visade tydliga och repeterbara resultat då analyser på perifert blod från fem vuxna utfördes. Vad som däremot kunde observeras var en stor population av debris i SSC och FSC scatterdiagrammen. Debris kan bestå av trasiga celler eller trombocyter som kan minskas genom tvättar vilket visas både här och enligt en artikel av Aatonen *et al.* (2014). Därför utfördes en beräkning av levande och döda celler efter första tvätten i protokollet. Analysen resulterade i 46 % döda celler. För att försöka påvisa om tvättarna erhöll mer eller mindre skadade celler utfördes ytterligare beräkning av döda celler efter varje tvättsteg. Den döda populationen av celler ökade med nästan 50 % efter varje tvätt, med 16 % döda celler efter sista tvätten. Dessa resultat tyder på att tvättarna i detta protokoll är funktionella vad gäller att tvätta bort trombocyter men även skadliga i större utsträckning. Debrisen till stor del består av trombocyter som kan vara svåra att få bort vid isolering av MNC med LymphoPrep™. Ett sätt att få bort trombocyter från proverna är att öka antalet tvättsteg, men det kan leda till ökat antal döda celler. Debris kan även uteslutas från scatterplottar genom att ändra inställningarna i flödescytometern (Ballesteros *et al.* 2014) eller som i figur 4 genom att gata bort det. Men då detta är protokoll som är riktat mot studenter som inte har analyserat prover i flödescytometer förut, var det viktigt att protokollet var användarvänligt. Därför försökte jag utreda varför andelen debris blev så stor istället för att ändra inställningar på instrumentet. Ficoll-Paque™ är en annan densitetsgradient som är dyrare än LymphoPrep™. En studie med benmärg som biologiskt material visar att Ficoll-Paque™ separerade celler hade bättre överlevnadsförmåga och gav ett större cellantal (Seeger *et al.* 2007). Denna studie gällde dock stamcelltransplantation för stroke-patienter och kraven på överlevanden av celler och överlevnadsförmågan är inte lika kritiska för en studentlaboration.

Den andra metoden som utfördes var att identifiera B- och T-lymfocyter genom att inkubera antikroppar riktade mot B- och T-lymfocyter i perifert helblod. Detta protokoll baseras på att lysa erythrocyter och därmed erhålla populationer av lymfocyter, monocyter samt granulocyter i flödescytometern. Lyseringsbuffertar som användes var den kommersiella RBC från eBioscience samt två buffertar från vetenskapliga artiklar, Ballesteros *et al.* (2014) och McCoy (1998). Den kommersiella lyseringsbufferten från eBiosciences gav tydliga cellpopulationer både vid ofärgad och antikroppsinfärgad analys, men frågan ställdes om en annan lyseringsbuffert kunde ersätta den kommersiella och därmed minska kostnaderna. Ett urval av lyseringsbuffertar från litteraturen utprovades, kravet på lyseringsbufferten var att kemikalier i recepten var tillgängliga på Högskolan. Lyseringsbuffert från McCoy (1998) och Ballesteros *et al.* (2014) togs med denna studie. Båda buffertarna innehåller NH₄Cl, NaHCO₃ och EDTA. Skillnaderna består i att McCoy har högre koncentration av samtliga kemikalier jämfört med Ballesteros, innehållet i RBC är inte känt. Lyseringsbuffertar från McCoy (1998) och Ballesteros *et al.* (2014) utfördes med samma protokoll som för RBC och resultaten visar att buffert enligt McCoy hade signifikant sämre antikroppsbindning av CD 19 än Ballesteros och RBC. För att frånga kommersiella buffertar gjordes även ett försök där en kommersiell infärgningsbuffert byttes ut mot PBS med 2 % BSA och samma blodprov vid samma tillfälle analyserades. Den kommersiella infärgningsbufferten innehåller fetal bovine serum (FBS) och sodiumazide (konserveringsmedel) (eBioscience, 2015). FBS och BSA skiljer sig åt

genom att FBS innehåller fetalt kalvserum och BSA (bovint serumalbumin). Serumalbumin är serumprotein som minimerar klumpning av celler och fungerar stresskyddande (Finn *et al.* 2012) samt förebygga ospecifik inbindning (Xiao & Isaacs, 2012). FBS har samma funktion och används bland annat som näring i cellkulturer (Arigony *et al.* 2013) och innehåller en ansevärd mängd av varierande hormoner, tillväxtfaktorer, bärarprotein. FBS är betydligt dyrare än BSA. När infärgningsbufferten byttes ut till PBS-BSA erhöles godkända cellpopulation i scatterdiagrammen och en bra antikroppsbindning med RBC och Ballesteros buffert. Däremot så visade sig McCoy's även medföra en minskad CD 4 inbindning. Detta pekar på att det inte är en skillnad i känslighet mellan B- och T-lymfocyter vilket kunde tolkas från resultaten erhållna med kommersiell infärgningsbuffert. EDTA som har antikoagulerande effekt har även i vissa fall fungerat hämmande på antikroppar som vid virologiska studier (Yang *et al.* 2014) och detta kan ha varit fallet även här då McCoy's buffert hade högre koncentration EDTA. Eftersom McCoy's hade högre koncentrationer av samtliga kemikalier behöver ytterligare studier utföras för att undersöka om EDTA påverkar antikroppsbindningen.

Mängden antikropp som rekommenderas av tillverkaren är 5 µl per prov som motsvarar 0,05 µg PE konjugerad CD 19 och 0,2 µg FITC konjugerad CD 4 antikropp. Risken med en för liten mängd antikropp är att man kan missa infärgning av flertalet blodceller, därför är det bättre att använda ett överskott av antikropp än att få missvisande resultat (Virgo & Gibbs, 2012). Eftersom denna studie syftar till att utarbeta ett protokoll som kan användas som studentlaboration gjordes en antikropps-spädning för att se om mängden antikropp per analys kan minskas. Resultaten visar att 1 µl av respektive antikropp ger samma procent av CD 19 och CD 4 positiva lymfocyter som med 5 µl antikropp.

Slutsats

Protokollet där mononukleära celler isolerades med LymphoPrep™ visade sig vara en bra studentlaboration vid identifikation av lymfocyter och monocyter med flödescytometri. Baserat på resultaten av denna studie kan lysering av erythrocyter enligt Ballesteros *et al.* recept från 2014 med PBS- 2 % BSA som infärgningsbuffert användas vid identifiering av B- och T-lymfocyter av perifert helblod. Det visade sig även att antikroppsmängden kan minskas från 5 µl till 1 µl per prov. Antikroppsinfärgning i perifert helblod är en metod utfördes på kortare tid än isolering med LymphoPrep™. Däremot kan LymphoPrep™ protokollet användas för vidare laborationer där monocyter och lymfocyter kan skiljas åt genom vidare odling av cellerna. Metodbeskrivning för studenter finns i bilaga 1 och 2.

TACK

Till de som donerade blodprov till studien, Bio-Rad AbD Serotec Ltd för tillåtelse att använda bilden till figur 1 och till handledare Helena Tassidis Dr. i Medicinsk vetenskap & Leg. Biomedicinsk analytiker.

Referenser

Aatonen, M. T., Öhman, T., Nyman, T.A., Laintinen, S., Grönholm, M.. & Siljander, P. R. M. (2014). Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*. 3:10.3402.

ACEA Biosciences Inc. (2014). Novocyte Flow Cytometer Operator's Guide.

Arigony, A.L., de Oliveira, I.M., Machado, M., Bordin, D.L., Bergter, L., Prá, D. & Henriques, J.A. (2013). The influence of micronutrients in cell culture: a reflection on viability and genomic stability *BioMed Research International*. 2013; 2013: 597282

Ballesteros, I., Cuartero, M.I., Moraga, A., de la Parra, J., Lizasoain, I. & Angeles Moro, M. (2014). Stereological and Flow Cytometry Characterization of Leukocyte Subpopulations in Models of Transient or Permanent Cerebral Ischemia. *Journal of Visualized Experiments*. 94: 52031.

Bio-Rad AbD Serotec Ltd. (2015). *Flow cytometry signal processing*. abdsertec.com. [2015-05-27].

Brown, M. & Wittwer, C. (2000). Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry* 8: 1221–1229.

Bertho, A.L., Santiago, M.A. & Coutinho, S.G. (2000). Flow Cytometry in the Study of Cell Death. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 3: 429-433.

Cifsibasi, E., Ciblak, M., Bayram, K., Badur, S., Fritali, E., & Cintan, S. (2015). The Role of Activated Cytotoxic T Cells in Etiopathogenesis of Periodontal Disease: Does It Harm or Does It Heal? *Scientific Reports* 5; 9262.

Dorian, M., Grellet, J., Saux, M. C. (1998). Uptake of fluoroquinolones in human monocytes isolated from peripheral blood. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 50: 783-788.

eBioscience. (u.å), *Flow cytometry staining buffer*. eBioscience.com. [2015-05-25].

Finn, T.E., Nunez, A.C., Sunde, M. & Easterbrook-Smith, S.B. (2012). Serum Albumin Prevents Protein Aggregation and Amyloid Formation and Retains Chaperone-like Activity in the Presence of Physiological Ligands. *The Journal of Biological Chemistry*. 15; 287(25): 21530–21540.

Gahrton, G. & Juliusson, G. (2012). *Blodets sjukdomar*. Lund: Studentlitteratur AB.

Jayat, C. & Ratinaud, M.H. (1993). Cell cycle by flow cytometry: Principles and applications. *Biol Cell* 78: 15-25.

Labtestonline (2013). *CD4/CD8*. Labtestonline.org. [2015-03-25].

McCoy, J.P. (1998). Handling, storage and preparation of human blood cells. *Current Protocols in Cytometry*.5:5.1.1-5.1.13.

Miwa, S. (1998). Atlas of Blood Cells. Bunkodo Co Ltd, Tokyo.

Metodbeskrivning: Lymfompanel 10C, Cytometrilab Malmö. Dokument ID 9865-3.

Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. (2008). *Janeway's immunobiology 7th edition*. New York & London: Garland Science Taylor & Francis Group.

Nilsson-Elhe, P., Berggren Söderlund, M. & Theodorsson, E. (2012). *Laurells Klinisk Kemi i praktisk medicin*. Lund: Studentlitteratur AB.

Pfeffer, F. & Dombkowski, D. (2009). Advances in complex multiparameter flow cytometry: Applications in stem cell research. *Clinical Cytometry*. 76B, 295-314.

Region Skåne (2015). Flödescytometri, analysförteckning. Skane.se[2015-05-20].

Seeger, F.H., Tonn, T., Krzossok, N., Zeiher, A.M. & Dimmeler, S. (2007). Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. *European Heart Journal*. 6:766-72.

Vernhall, A.J, Hill, S. J. & Kellam, B. (2014). The evolving small molecule fluorescent-conjugate tool-box for class A GPCR. *British Journal of Pharmacology*. (171) 5: 1074-1084.

Virgo, P. F & Gibbs, J. G. (2012). Flow cytometry in clinical pathology. *Annals of Clinical Biochemistry* 49: 17-28.

Xiao, Y & Isaacs, S.N. (2012). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Blocking with Bovine Serum Albumin (BSA) - Not all BSAs are alike. *Journal of Immunological Methods* 384: 148-151.

Yang, J. S., Kang, S.S., Yun, C.H. & Han, S.H. (2014). Evaluation of Anticoagulants for Serologic Assays of Cholera Vaccination. *Clinical Vaccine and Immunology*. 6:854-858.

Populärvetenskaplig sammanfattning

Flödescytometri är en analysmetod där man tittar på celler i en lösning som till exempel blod. Lösningen suggs upp i instrumentet och cellerna skickas en och en genom en laserstråle. När ljuset träffar cellen sprids ljuset på olika sätt beroende på hur stor cellen är och vilket innehåll den har av till exempel DNA. Denna information behandlas av datorns mjukvara och cellen markeras ut på ett diagram beroende på dessa faktorer. Lasern kan också aktivera fluorescerande färger. Dessa används bland annat som identitets-flaggor på antikroppar som binder till cellytornas specifika protein. Detta kan användas för att skilja celler åt som annars hade hamnat på samma ställe i diagrammet som de vita blodkropparna B- och T-lymfocyter.

En flödescytometer har nyligen köpts in till Högskolan Kristianstad och en laboration i flödescytometri efterfrågades till biomedicinska analytiker-programmet. Mitt examensarbete blev just detta uppdrag.

Två olika protokoll jämfördes för att utarbeta den mest högskolevänliga laborationen. Den ena skiljde ut B- och T- lymfocyterna med densitetsgradienten Lymphoprep™ och den andra sprängde erythrocyterna (röda blodkropparna) med lyseringsbuffert. Tre olika lyseringsbuffertar testades för att jämföra en färdigblandad köpt buffert med två olika buffertar som blandats med skolans kemikalier. För att få laborationen ännu lite billigare testades en spädningsserie av antikropparna med fluorescerande färger och ytterligare en kemikalie i protokollet, en infärgningsbuffert, byttes ut mot en billigare, hemmablandad variant.

Resultatet visade att protokollet med Lymphoprep™ kunde spara cellerna till senare laborationer och visade bra diagram över cellerna med fin infärgning. Dock var diagrammen ibland svårlästa och mycket skräp kom med. Av lyseringsbuffertarna var en av de hemmablandade tillräckligt bra för att kunna ersätta den färdigköpta, även tillsammans med den utbytta infärgningsbufferten. Spädningen av antikropparna med fluorescerande färg blev också lyckad, färgningen blev bra även med en femtedel av den rekommenderade volymen.

Bilaga 1

Flödescytometrilaboration

Separation av mononukleära celler (MNC) med LymphoPrep™

Material

Helblod från ett EDTA rör

LymphoPrep™

PBS, fosfatbuffrad saltlösning

BSA

Infärgningsbuffert

Falconrör, 15 ml

FACS rör

Fluorescenskonjugerade antikropp CD19-PE

Fluorescenskonjugerad antikropp CD 4-FITC

Metod

- 1) Blanda LymphoPrep™ noga genom att vända flertalet gånger på flaskan och tillsätt 3 ml vardera till 2 provrör.
- 2) Överför 4 ml helblod till ett nytt provrör. Späd blodet med 4 ml PBS med 2 % BSA. Blanda vätskorna genom att sätta kork på och vända försiktigt på röret.
- 3) Pipettera 4 ml per rör av det spädda blodet mycket försiktigt ovanpå LymphoPrep™ så att det hamnar ovanpå i ett separat skikt.
- 4) Centrifugera rören vid 800 x g i 20 minuter med bromsen av vid rumstemperatur. Om provet är äldre än 2 h, öka centrifugeringstiden till 30 minuter.
- 5) Efter centrifugering avlägsnas det övre plasmalagret försiktigt med Pastörpipett. Under plasman finns buffy coat, lagret med MNC som överförs med försiktighet till ett nytt rör utan att lösa pelleten i botten av röret.
- 6) Tillsätt 3 ml PBS till det nya röret MNC. Centrifugera i 500 x g i 5 minuter och avlägsna supernatanten försiktigt med pipett.
- 7) Resuspendera pelleten med 1 ml PBS per rör.
- 8) Ta 10 µl av lösningen till en Bürkers räknekammare och räkna ut hur mycket celler du har per ml. Du behöver mellan 500 000- $1,0 \cdot 10^6$ celler per FACS rör.
- 9) Pipettera så många µl du behöver per analys i 4 FACS rör. Var noga med att märka FACSrören 1,2,3,4. Tillsätt 1 ml PBS per rör för tvätt.
- 10) Centrifugera i 500 x g i 5 minuter och håll av supernatanten. Resuspendera pelleten med 100 µl PBS/BSA.
- 11) Tillsätt antikropparna enligt tabellen nedan och låt inkubera mörkt i 20 min

	Rör 1	Rör 2	Rör 3	Rör 4
Antikropp CD19	X	1 µl	X	1 µl
Antikropp CD4	X	X	1 µl	1 µl

- 12) Tillsätt 3 ml PBS per rör och centrifugera i 500 x g i 5 minuter. Håll av supernatanten.
- 13) Resuspendera den sista pelleten med 500 µl infärgningsbuffert.
- 14) Analysera proven i flödescytometern.

Bilaga 2

Flödescytometrilaboration
Lysering av erythrocyter

Material

Lyseringsbuffert, 150 mM NH₄Cl, 10 mM NaHCO₃ och 0,1 mM EDTA. Ställ pH till 7,5.

Helblod från ett EDTA rör

PBS, fosfatbuffrad saltlösning

BSA

FACS rör

Fluorescenskonjugerad antikropp CD 19, PE

Fluorescenskonjugerad antikropp, CD 4, FITC

Tabell över hur rör ska märkas

	Rör 1	Rör 2	Rör 3	Rör 4
Antikropp CD19	X	1 µl	X	1 µl
Antikropp CD4	X	X	1 µl	1 µl

Metod

- 1) Märk fyra Eppendorfrör 1-4.
- 2) Överför 100 µl helblod till varje Eppendorfrör.
- 3) Tillsätt antikroppar enligt tabell och blanda röret noggrant med en kort vortex.
- 4) Inkubera mörkt i 30 minuter i rumstemperatur.
- 5) Överför blodet från Eppendorfrören till fyra FACS rör märkta på samma sätt som för Eppendorfrören.
- 6) Tillsätt 2 ml rumstempererad lyseringsbuffert och pulsvortexa röret försiktigt tre gånger.
- 7) Inkubera mörkt i rumstemperatur i 15 minuter. Du kan se om lyseringen av erythrocyter är färdig genom att titta på provets turbiditet. När provet är genomskinligt är lyseringen helt färdig.
- 8) Centrifugera vid 500 x g i 5 minuter i rumstemperatur och dekantera supernatanten.
- 9) Lös pelleten med pipettering med 1 ml lyseringsbuffert i 3 minuter i mörker för ytterligare en lysering.
- 10) Centrifugera vid 500 x g i 5 minuter i rumstemperatur.
- 11) Dekantera supernatanten, lös sedan upp pelleten med pipett i 2 ml PBS-2 % BSA.
- 12) Centrifugera vid 500 x g i 5 minuter i rumstemperatur.
- 13) Dekantera supernatanten och lös upp pelleten med 200 µl PBS-2 % BSA. Om provet inte kan gå till analys mycket snart efter detta bör det förvaras mörkt.
- 14) Analysera provet i flödescytometern.