

CD62P 血小板激活作用的流式细胞术测定法

应用说明

Dr Kelly Brown, Jessica Tang, Stephanie Hughes | University of British Columbia, Child and Family Research Institute, Pediatrics Division of Rheumatology

Salima Janmohamed | Beckman Coulter Life Science, Inc.

本文将为您介绍以下内容

血小板采集的说明

血小板激活作用的单色测定法

前言

本试验使用了流式细胞术来测定体外激活前后全血中人血小板细胞表面上表达的 P- 血清素 (CD62P) 水平。作为激活信号的应答反应, 来自细胞内颗粒的 CD62P 分子能被快速转移至细胞表面; 对于本检测试验, 刺激信号为 ADP。可将本方法得出的 CD62P 测定值用于评估血小板完整性和活化状态, 或用于简单鉴定混合型血细胞群内的血小板, 或用于监控特定试验方法引入的血小板的非特异性活化作用。

材料 —— 设备

- 采集人全血, 放入含柠檬酸钠的采集管 (BD # 369714) 中。
采集样品后尽快进行样品制备工作, 以避免血小板的体外激活。
- PE 偶联的抗 - 人 CD62P / P- 血清素抗体 (Psel. KO2.3, Life Tech #A16339)。
- 腺苷二磷酸 (ADP) (Chrono-Log Corp #384)。
- Dulbecco 氏磷酸盐缓冲液 (1 x PBS pH 7.4, Gibco #14190-144)。
- 聚丙烯样品管 (Fisher Scientific #: 02-681-200)。
- 贝克曼库尔特 CytoFLEX 流式细胞仪。

工作液

1 x PBS (通过 0.2 μ m 滤器除菌)

CD62P-PE 抗体

制备:

- 将抗体储备液进行 1:32 比例稀释:
- 2 μ L Ab + 62 μ L 1xPBS = 64 μ L 的 Anti-CD62P-PE 抗体稀释液 (1:32 倍)

ADP

- 根据生产商提供的说明, 制备 1 mM 储备液, 然后制备 100 μ M 工作液。
- 3 μ L 1 mM ADP + 27 μ L 1xPBS = 30 μ L 的 100 μ M ADP。

A. 血液采集

使用 20 号采血针、通过静脉穿刺无菌采集血液。将第一份约 2 mL 血液采集在任意容器中; 将该样品废弃, 因为其含有激活的血小板。放开止血带, 将另外 3.5 mL 血液采集在柠檬酸钠样品管中; 该样品将被用于染色。

B. 血小板的激活和染色

1. 制备工作液 (见上述内容)。置于室温下。

2. 按以下所示，标记流式细胞术分析使用的聚丙烯管（12x75 mm），每种制备两份：

1. 无 Ab、无 ADP
2. CD62P, 无 ADP
3. CD62P + ADP

3. 根据表 1，将试剂加入合适的管中。每次加液均使用一支新的枪头，并轻轻摇动样品管，将其混匀。

4. 加入样品管的试剂：

	No Ab, 无 ADP (试管 1)	CD62P, 无 ADP (试管 2)	CD62P + ADP (试管 3)
PBS	45 μ L	40 μ L	34 μ L
抗体	-	5 μ L	5 μ L
ADP	-	-	6 μ L

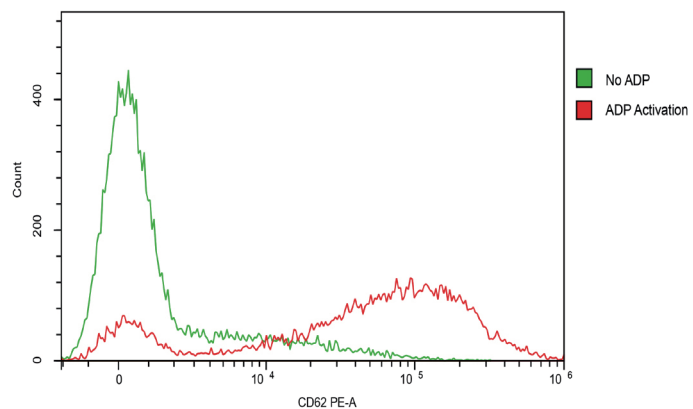
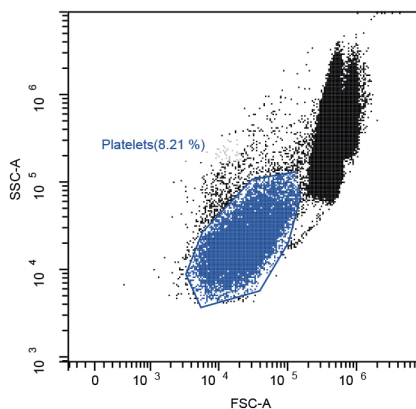
5. 向每支样品管中加入 5 μ L 全血，轻轻摇动混匀，然后在室温下避光孵育 30 分钟。

6. 向每个管中加入 750 μ L 滤过的 1x PBS。

7. 尽快获取数据。

结果

无 ADP：所有阳性分选细胞



ADP 未处理的（绿色）和 ADP 处理的（红色）血小板的 CD62P-PE 染色叠加分析图。

数据获取和分析

初始硬件设置

大致的增益值：

- FSC（对数标度）- 40
- SSC（对数标度）- 90
- FL2（对数标度）- 290

大致的阈值（基于 FSC 和 SSC 的二重阈值）

- FSC：10,800
- SSC：5200

数据获取和分析说明

首先获取激活的血小板样品数据，以鉴定 CD62P+ 血小板。

根据 CD62P 直方图，对 CD62P+ 细胞设门，给该门赋予一种颜色。

- 使用该颜色来帮助定位 FSC vs. SSC 散点图上的血小板位置，在该散点图上的血小板周围设置一个门（“血小板”）。
- 根据“血小板”门内细胞，对 CD62P 直方图进行设门。
注：在 FSC vs. SSC 散点图的右上角，有更多的细胞，这些是需要通过设门将被排除的白细胞。
- 设置阈值，以消除细胞碎片，同时又不会排除任何血小板。

此外，还获取了仅介质对照（仅 PBS）的数据，以确认阈值的理想位置，从而掩蔽任何背景噪声。