

质谱流式实验流程介绍

Version 3.0 2020-7-2

前言

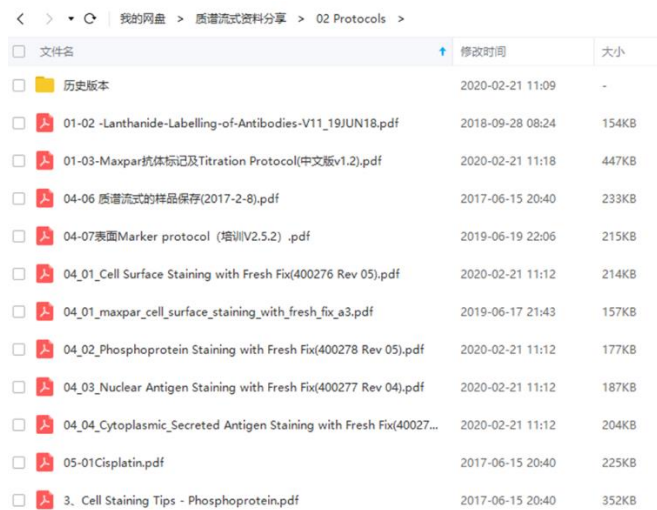
质谱流式技术 (Mass Cytometry)，从本质上讲就是利用质谱的原理实现类似流式的功能。由于使用了金属标签作为抗体的标签，用 ICP 质谱的方式对细胞进行信号检测，从原理上解决了困扰传统流式的串色问题，从而大幅提高检测通道的数量和信号质量。

经过多年的发展，质谱流式技术已经进入其成熟期，其应用也扩展到包含免疫、肿瘤、干细胞、白血病等不同领域的研究中；在国内，越来越多的实验室也开始使用质谱流式，为了帮助大家快速掌握质谱流式的实验要领，顺利的开展相关研究，我们对相关的技术要点进行了总结，希望对大家有帮助。

文章中涉及的 Protocol 详见以下链接：

链接：<https://pan.baidu.com/s/1OLVtLQDoRVr3YJ1CdksScA>

提取码：9kmo



文件名	修改时间	大小
历史版本	2020-02-21 11:09	-
01-02 -Lanthanide-Labeling-of-Antibodies-V11_19JUN18.pdf	2018-09-28 08:24	154KB
01-03-Maxpar抗体标记及Titration Protocol(中文版v1.2).pdf	2020-02-21 11:18	447KB
04-06 质谱流式的样品保存(2017-2-8).pdf	2017-06-15 20:40	233KB
04-07表面Marker protocol (培训V2.5.2) .pdf	2019-06-19 22:06	215KB
04_01_Cell Surface Staining with Fresh Fix(400276 Rev 05).pdf	2020-02-21 11:12	214KB
04_01_maxpar_cell_surface_staining_with_fresh_fix_a3.pdf	2019-06-17 21:43	157KB
04_02_Phosphoprotein Staining with Fresh Fix(400278 Rev 05).pdf	2020-02-21 11:12	177KB
04_03_Nuclear Antigen Staining with Fresh Fix(400277 Rev 04).pdf	2020-02-21 11:12	187KB
04_04_Cytoplasmic_Secreted Antigen Staining with Fresh Fix(40027...	2020-02-21 11:12	204KB
05-01Cisplatin.pdf	2017-06-15 20:40	225KB
3. Cell Staining Tips - Phosphoprotein.pdf	2017-06-15 20:40	352KB

目录

第一节：一些重要的背景知识.....	3
1 质谱流式的原理.....	3
2 试剂和标签	3
2.1 预标记抗体和抗体标记试剂盒.....	3
2.2 Cell-Id 系列试剂.....	3
3 染色 Protocol.....	4
4 Mass Tag Cellular Barcoding.....	4
第二节：实验设计.....	4
1 质谱流式的样本选择.....	4
1.1 样本的类型：	4
1.2 样本的筛选.....	5
2 质谱流式的 Panel 设计	5
2.1 目标蛋白数量控制： 单个 Panel 中抗体数量要控制在 42 或者 44 个以内	5
2.2 目标蛋白列表确定.....	5
2.3 给每个抗体匹配合适的标签.....	7
第三节：第三方抗体的选择和标记.....	8
1 标记试剂盒对于抗体的要求.....	9
2 标记试剂盒的种类.....	9
3 标记后抗体的质控.....	9
第四节：预实验.....	10
1 样本的储存和运输条件的确定：	10
2 染色体系的预实验.....	11
3 Barcoding 的预实验.....	13
4 考虑充分，有效应对批次效应（optical）	14
第五节：正式实验和数据分析.....	14

第一节：一些重要的背景知识

本节内容是为了方便大家理解后面的内容而整理的基础知识,如已经对质谱流式技术有一定了解,可跳过。

1 质谱流式的原理

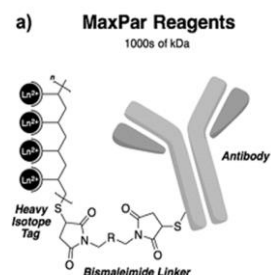
质谱流式技术的英文名称是 Mass Cytometry, 它使用金属标签作为抗体的标签, 利用质谱的原理进行单细胞水平的多参数检测。相对传统基于荧光的流式技术来说, 具有通道多, 无需进行补偿调整等优点。

Tips: 质谱流式检测系统能检测的原子量范围是 75~209Da, 所有作为标签的元素原子量都在此范围内。

2 试剂和标签

2.1 预标记抗体和抗体标记试剂盒

质谱流式使用稳定金属核素（无放射性）作为抗体标签, 金属离子通过多聚螯合物的形式共价结合在抗体上, 如右图所示。



Fluidigm 在提供金属预标记抗体的同时, 还提供金属标记试剂盒, 大家可以通过这些标记试剂盒给第三方的裸抗加上金属标签, 然后用于质谱流式的检测, 大大提高实验的灵活性。

在官方目录中, 以不同形式提供了 44 种不同的抗体标签, 下表简单列出了标签的相关情况:

金属标签	预标记抗体	抗体标记试剂盒
镧系金属 (Ln3) *	有	35
Y 和 Bi	有	无
镉 (Cd) *	无	7

2.2 Cell-Id 系列试剂

除抗体以外, 质谱流式还需要使用一些带有元素标签染料, 常用的有:

cisplatin: 顺铂, 在较低浓度、较短时间的孵育细胞, 死细胞会染上更多的铂, 已达到区

分细胞死活的目的。

Intercalator-Ir: 一种含有依元素的核酸嵌合剂, 在质谱流式中用来辅助单细胞的识别。

3 染色 Protocol

质谱流式的染色与传统流式大致相同。胞外蛋白的染色可以用抗体直接与细胞孵育, 胞内蛋白的染色则需要在胞外染色后, 进行相应的固定打孔步骤后, 再进行染色。

Fluidigm 官方提供三种不同的胞内蛋白染色的 Protocol: **1) Cytokine 及胞浆蛋白, 2) 转录因子 3) 信号通路磷酸化蛋白**, 详情在下面的章节展示;

4 Mass Tag Cellular Barcoding

Barcoding 是在染抗体前, 用含有不同钯 (Pd) 元素的金属染料对各个样本进行染色, 使每个样本的细胞都带有独特的金属标签。这些样本可以混合在一起进行后续的抗体染色和检测, 可以达到提高均一性, 减小实验误差的目的。目前 Fluidigm 的 barcoding kit 可以支持 20 个样本的混合检测。

第二节：实验设计

质谱流式的实验设计要从两个方面进行考虑: **样本和 Panel**, 下面让我们来仔细了解一下相关的细节。

1 质谱流式的样本选择

1.1 样本的类型:

质谱流式检测的是单细胞悬液, PBMC 或者经过单细胞化的实体组织样本都可以进行检测。

在临床相关的研究中, 人 PBMC 通常是最容易获得的样本, 因此它也成为质谱流式文章中使用频率最高的样本类型。不过, 要注意使用 PBMC 也有它的缺点: 1) PBMC 会受到人体各方面的因素的显著影响; 2) PBMC 不能直接反映实体组织内部的情况, 例如, 在肿瘤免疫研究中更多使用了手术取出的肿瘤组织, 用来研究肿瘤浸润免疫细胞。

如果使用实体组织, 需要建立与组织类型适合的组织单细胞化方法, 具体可以参照相

关组织的质谱流式文献或者传统流式文献。

1.2 样本的筛选

动物模型可以通过良好的条件控制，排除外部其他因素对于实验结果的影响，而临床相关研究则需要对病例进行严格的筛选，去掉有其他影响因素的病例，否则，其他因素引起的“噪声”可能会将所要寻找的差异或规律掩盖。

2 质谱流式的 Panel 设计

2.1 目标蛋白数量控制： 单个 Panel 中抗体数量要控制在 42 或者 44 个以内

如表一中所示，在 Fluidigm 目录中，总有 44 个不同的标签用于抗体标记。其中 35 个来自镧系元素，2 种（89Y 和 209Bi）仅在预标记抗体中出现；另外 7 个基于 Cd 抗体的标签仅提供标记试剂盒。

由于 Cd106 和 Cd110 两个标签与 barcoding kit（后面会提到）重合，所以如果要进行 barcoding，抗体总数应控制在 42 个以内。

此外，使用第三方金属标签可以进一步扩展抗体的数量，例如：金属铟 In 等、金属铂 Pt、纳米 Au、纳米 Ag 第三方抗体标签在文献中也有使用，不过相关 Protocol 需要自己在文献中查阅和测试，我们推荐优先使用商品化的标签；

2.2 目标蛋白列表确定

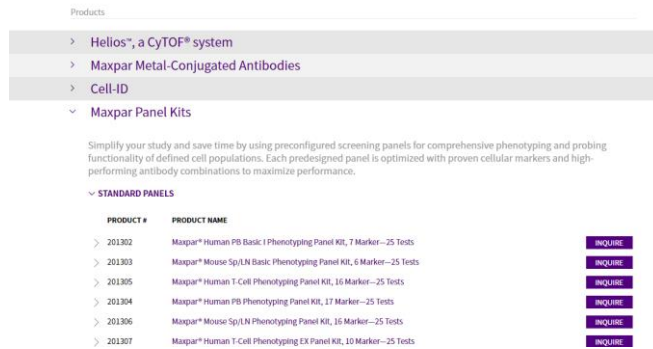
根据研究目的列出需要检测的目标蛋白列表，是整个实验中非常关键的一步，它会直接决定所获得的数据中是否包含我们所要的信息，因此在此解决多花一些时间和精力是绝对值得的。

具体的筛选靶蛋白的方法则是非常灵活的，最经常的方法可能是根据我们的专业背景知识或者文献资料直接把自己想检测的 marker 放进列表中；对于一些已经有了一些单细胞测序的结果，也可以挑选一些组间差异较大、有抗体可用的靶蛋白加入列表；而在有的研究中，甚至直接用传统流式方法在大量抗体（例如所有的 CD marker）中筛选出能够体现组间差别的 marker 加入列表中。

如果是免疫方面的研究可以参照 Fluidigm 已有的二十多个 Panel kit 中的抗体列表来设计自己的 Panel，有时可以事半功倍。

相关内容见以下链接：

<https://www.fluidigm.com/reagents/mass-cytometry>



此外，制定靶蛋白列表时要注意一些问题：

1) 目标亚群的 marker

首先明确关注的亚群，Panel 中要有识别这些细胞亚群的 marker，例如如果研究的目标是 T 细胞的细分亚群，那么 Panel 中一定要有 CD3e、CD8a、CD4 以及其他识别 T 细胞及其细分亚群的 marker；

2) 负选的 marker

为了提高数据质量，可以加入一些其他亚群的 marker 进行必要的负选。例如，研究 T 细胞时，我们依然建议加入 CD20、CD16 等部分其他主要免疫亚群的 marker，以便得到更纯的 T 细胞数据；再比如，研究 PBMC 的时候可以考虑加入 CD66b，用来排除残留粒细胞对数据的影响。

3) 胞内蛋白

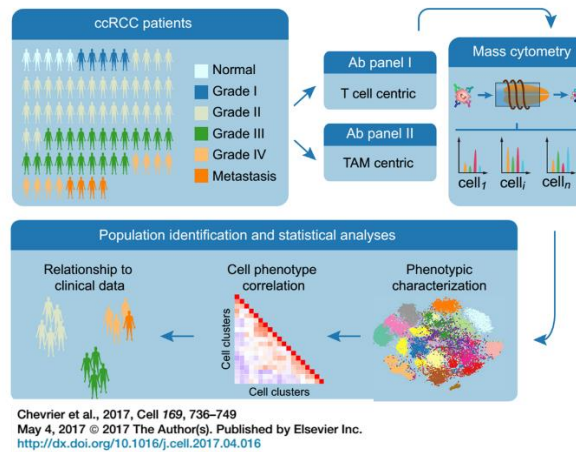
如果涉及到胞内蛋白染色，应该注意相关胞内蛋白染色 Protocol 的兼容性。例如：磷酸化蛋白最好不要和 Cytokine/转录因子放在一个 Panel 里面（染色条件差异较大，Protocol 不一定兼容）。

4) Panel 的拆分

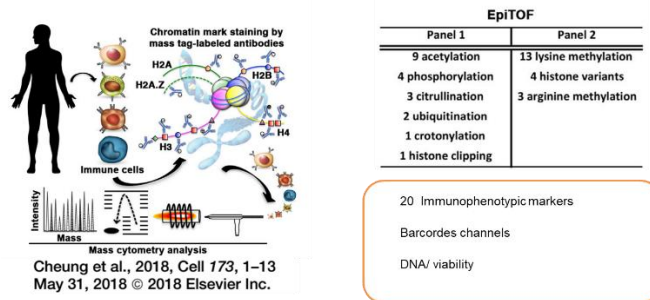
当要检测的 marker 数量超过了我们要求的上限，而又不好进行取舍的时候，可以考虑将 Panel 拆成两个或者多个，分别进行检测。当然 Panel 的拆分可以很灵活，具体还需要根据研究目的以及不同数据整合的需要进行。下面举两个例子以便说明不同的拆分思路：

示例一、针对同一样本不同的亚群，采用独立的 Panel

下图是 2017 年在 Cell 上发表的关于肾细胞癌的一篇文章，同时关注了 T 细胞和肿瘤相关的巨噬细胞(TAM) 两种细胞，为了同时对两种细胞进行精细的分群，作者采用了两个独立的 Panel 分别对其进行检测。后期在样本水平对所得的数据进行整合，联系临床数据，寻找 biomarker。



示例二、保持分群 marker 重合，分开两个或多个 Panel 研究各个亚群的功能：



上图 2018 年 Garry Nolan 实验室发表的关于表观遗传的研究例子。在这个例子中，要检测的各种组蛋白修饰的种类达到 40 种，而分群需要的 marker 有 20 种，已经超出了现有的标签数量。所以作者将 40 个组蛋白修饰蛋白拆分到两个 Panel 中，同时两个 Panel 共用 20 个用于分群的表面 marker，这样后续的分析中就可以进行亚群层次的数据整合。

当然，以上只是两个经典的例子，具体的 Panel 拆分可以根据自己的实际情况进行。

2.3 给每个抗体匹配合适的标签

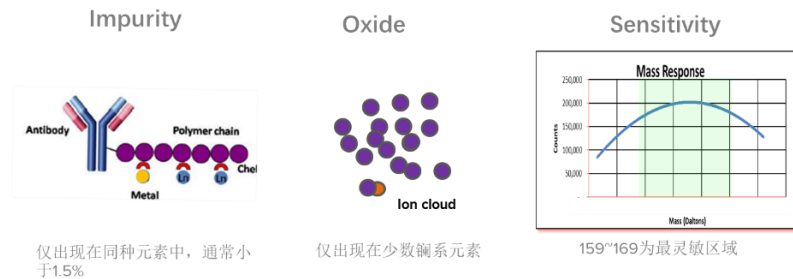
在确定目标蛋白列表以后，就需要对每个抗体配上合适的金属标签了。给每个蛋白匹配那个金属标签主要有以下几点考虑：

1) 预标记抗体的标签种类

预标记抗体可以直接用来标记样本，尽量多的使用预标记抗体可以减少实验环节，减少前期标记、滴定抗体的工作量。

2) 通道之间的相互影响

质谱流式通道之间的影响主要来自 Impurity(同位素混杂)和 Oxide(氧化物), 不过这些影响只出现在少数同位素之间, 影响比例都很小, 与传统流式的串色有本质区别。我们在设计 Panel 的时候, 应该把信号强度悬殊的 marker 安排在没有相互影响通道上。



3) 目标蛋白的表达强度

2019 年 Fluidigm 推出 7 个基于 Cd (镉元素) 的新金属标签。因这些标签所在的通道灵敏度要比镧系金属弱一些, 因此一般会被用来标记表达较强的 marker, 例如: CD8, CD4, CD19 等等; 159~169 是最为灵敏的通道区间, 表达最弱的蛋白可以考虑放在这个区间里; 其实对于整个镧系标签区间来说强弱之间的差别仅在 2~3 倍, 所以此方面的考虑可以放在相对次要的位置。

在这一环节, 推荐使用 *Panel Design Helper*, 一个基于 Excel VBA 的第三方 Panel 设计软件, 软件中的表格和图形可以帮助您很快找出 Panel 中可能存在的问题, 并进行相关的调整。

相关的软件及其说明请见下载地址:

链接: <https://pan.baidu.com/s/1ATFOLpsbW-UCcKpWGHmESQ> 密码: f36a

如果您是刚开始质谱流式相关的研究项目, 可以咨询 Fluidigm 的技术人员协助您完成相关的标签的搭配工作。

第三节：第三方抗体的选择和标记

设计好的 Panel 一般会分为两个部分: 预标记抗体和需要自行标记的抗体。预标记抗体

比较简单，直接从 Fluidigm 购买即可。需要自行标记的抗体，需要从 biolegend、BD 等公司购买不带标记的裸抗抗体，使用金属标记 kit 进行标记。

1 标记试剂盒对于抗体的要求

抗体的选择需要满足一定的条件，要认真进行筛选：

- i. 抗体可以用于 Flow Cytometry（在抗体说明书：Application 一栏可以看到，有的抗体公司会直接标注 Cytof 或者 Mass Cytometry，都是可以选择的。对于有的抗体，无法找到相关的抗体，可以尝试其他应用类型,例如 IF/IHC-F 等，不过可能有一定的风险。）
- ii. 抗体本身是裸抗，即不带有荧光或其他性质的标签；
- iii. 抗体中不含有 BSA、血清这些大分子添加物；
- iv. 对抗体种属来源、单克隆或多克隆没有要求，但是最好是 IgG。（IgM 也有标记成功的案例，但是不推荐。）

注意：甘油、叠氮化钠、寡糖等小分子添加物是允许的，它们会在最初的 buffer exchange 阶段直接被去除，不会影响标记反应的进行（较高浓度的甘油需要在一开始稀释）。

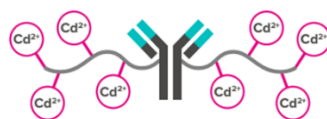
2 标记试剂盒的种类

目前 Fluidigm 提供两类金属标记试剂盒一种是用于标记镧系金属（X-8 antibody labeling kit），另一种标记 Cd 金属（MCP-9 antibody labeling kit）两种 kit 使用的 Protocol 存在很大差异，使用时要认真阅读相关内容，以防混淆出错。

Lanthanides (X-8 Polymer)



Cadmium (MCP9 Polymer)



3 标记后抗体的质控

抗体标记完成后，需要对已标记好的抗体进行 Titration，即把抗体按照 1: 50、1: 100、

1: 200、1: 400 的稀释度去染相同的细胞，在 Helios 上检测，根据其信号和背景的情况选择合适的稀释度。（对于一些信号较强的预标记抗体如 CD4、CD8、CD57 等等，同样可以进行 Titration，已达到节约抗体用量的目的）

(抗体标记和抗体 titration Protocol, 详见 01-02、01-03)

第四节：预实验

本阶段的任务是建立一套可靠的样本制备、运输、检测的实验体系。合理完善的预实验设计和开展，对于后续正式实验以及数据分析的顺利开展非常关键，因此，必须予以足够的重视。

1 样本的储存和运输条件的确定：

样本的储存一般分为以下几种方式：

1) 液氮冻存：

新鲜细胞，使用普通细胞冻存的方法，将其存于液氮长期保存；

这是最通用的样本保存方法，适用于绝大多数表面 Marker，冻存会引起少部分 Marker 的下降；如果要做 Cytokine 或者磷酸化蛋白等胞内蛋白，需要考虑冻存复苏过程对细胞状态的影响，预实验中应该进行相关的验证。

注意：

- i. 长时间(超过一周)冻存于-80 度的新鲜细胞，细胞活力会受到很大影响，死细胞释放的核酸等物质可能会导致仪器管路堵塞，因此要做好实验规划，避免使用此类样本。
- ii. 一些活力相对较差的细胞，例如组织单细胞化的细胞，建议使用“固定冻存”的方法，以防止细胞在冻存复苏过程中。

2) 新鲜细胞固定后、冻存于-80 度长期保存：

兼容大多数表面 Marker，可以存储 2 年。如果涉及胞内蛋白，需要在冻存前对细胞进行刺激；

(注：此方法来自文献，因为有可能会有抗体的信号因为固定而显著降低，因此需

要预实验确认所有抗体的信号都 OK，具体 Protocol 详见：[04-06](#)，其中包含 PBMC 分离的方法)

3) 细胞染抗体后，在 Fix and Perm buffer 阶段放在 4 度：可以存放 48h；

4) 染好的细胞用冻存液冻存于-80 冰箱：可保存大约 1 个月

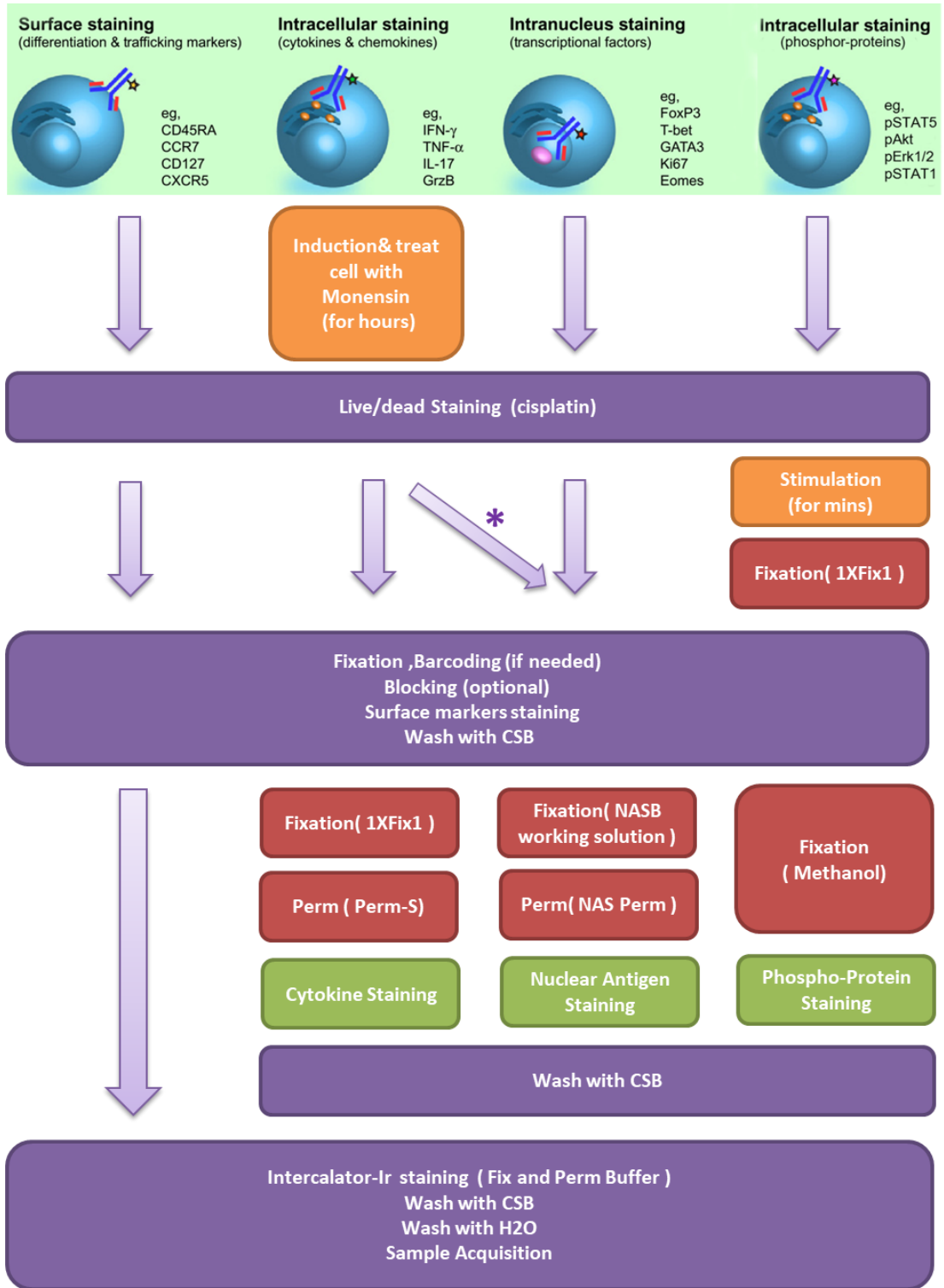
(注：此方法来自文献，根据国内客户的经验，barcoding kit Pd 通道信号冻存后会发生下降)。

2 染色体系的预实验:

染色体系的预实验目的在于确定整个染色体系同所有的染色条件、Panel 中的所有抗体都是 OK 的，可以得到高质量的数据。

Fluidigm 提供一种表面 marker 和三种不同的胞内蛋白细胞染色 Protocol。与传统流式类似，质谱流式进行胞内染色的时候也遵循先胞外染色，固定打孔后，再进行胞内染色的流程。只是胞内蛋白的种类不同，所用的固定打孔的条件也有差异。相关的区别可以从下图了解：

(详见 [04-07 \(表面 Marker 的中文版\)](#)、[04-01](#)、[04-02](#)、[04-03](#)、[04-04](#))。



*** OK for most cytokines, validation is needed**

注意：由于磷酸化蛋白使用甲醇进行固定（打孔），所用的条件与 Cytokine/TF 差异较大，因此不建议将其放在同一个 Panel 中染色。

3 Barcoding 的预实验

Barcoding Kit 的默认染色过程是这样的，先对分别对各个样本进行固定和打孔，染上与每个样本对应的 Pd 金属标签组合，然后混合样本后进行抗体染色。

这个过程对于大多数抗体都是没有问题的，但是仍有少部分抗体信号会因为前面的固定打孔步骤受到较大影响。因此，我们需要用预实验确定 barcoding 对于每一个抗体信号的影响。

以下是 barcoding 预实验的实验设计模板，预实验分为 3 组，一组为正常染色对照，第二组为先 barcord 再进行表面 marker 染色（即默认的 barcoding 步骤）；第三组则是先进行表面 marker 染色，再进行 barcoding；

Con	Barcoding_Surface Staining	Surface Staining_Barcoding	Final Protocol
cisplatin (具体步骤省略)	cisplatin (具体步骤省略)	cisplatin (具体步骤省略)	cisplatin (具体步骤省略)
	1*Fixl		Blocking
	Barcoding PermX2		Surface Antibody Cocktail1 (Sensitive Markers)
	Barcoding		CSB washesX2
	CSB washesX2		1*Fixl
	Mix Samples(跳过)		Barcoding Perm
Blocking	Blocking	Blocking	Barcoding
Surface Antibody Cocktail	Surface Antibody Cocktail	Surface Antibody Cocktail	CSB washesX2
CSB washesX2	CSB washesX2	CSB washesX2	Mix Samples
		1*Fixl	Surface Antibody Cocktail2(Insensitive Markers)
		Barcoding PermX2	CSB washesX2
		Barcoding	
		CSB washesX2	
		Mix Samples (跳过)	
Fix and Perm+lr	Fix and Perm+lr	Fix and Perm+lr	Fix and Perm+lr
...

重点比较前两组中每个抗体的信号，相对于 Con 组，如果两组相差不大或者第二组信号有所改善，则将其归入“Unsesitive Abs”；如果第二组的抗体存在信号下降明显或者背景显著升高等问题时，则将其归入“Sensitive Abs”。在正式实验的 Protocol 中按照上图右侧 Final Protocol 中所示，按照“**Sensitive Abs**”的染色→**barcoding**→“**Unsesitive Abs**”的过程进行染色。

此外，对于“Sensitive Abs”，应该同时留意预实验第三组的信号，绝大多数情况下，这一组的信号与 Con 组基本相同，如果发现其信号也不正常，则应考虑更换不同克隆号的抗体，再进行验证。

4 考虑充分，有效应对批次效应（可选）

批次效应是我们在进行较大规模实验过程中需要考虑的一个重要方面。前面提到，barcoding kit 可以帮助我们消除样本之间的偶然性差异，这是降低批次效应的一个有用工具。不过当样本数量较大时，就需要拆成很多批来做（Fluidigm barcoding kit 也最多只能支持 20 个样本的混合检测），这个时候可能就要考虑使用生信方法消除批次效应了。

目前，已经有很多个不同的相关工具包相关发表，这里向大家推荐 CytoNorm，可以达到较好的效果。

注意：CytoNorm 工具包需要在每个批次的样本中添加 2 个的共同的样本作为 Anchor Sample 和 Test Sample，用于批次校准；

第五节：正式实验和数据分析

需要和检测平台沟通好，仪器要得到良好的维护，做好实验规划，确保实验的顺利进行和高质量原始数据的获得。

按照预实验优化的技术方案进行正式实验后，数据分析工作绝对是值得和需要花很多时间和精力进行的。

通常，质谱流式数据分析按照其内容可以分为两部分：

1) 常规流式分析方法的应用

这里面包括根据需要对各个亚群进行手工设门（manual gating）、二维散点图、直方图等常规的流式文件处理方法。

此部分使用传统的流式分析软件处理即可，例如：Flowjo、FcsExpress7 等

2) 质谱流式数据的生信分析

在质谱流式文章中经常出现的 tSNE、PhenoGraph、FlowSOM 等降维和聚类方法，已经都有公开的 R 语言工具包，这里推荐 Cytofkit，一个综合性的质谱流式数据分析工具。

网络上也第三方的介绍 R 语言数据分析的 0 基础视频教程，整合了 Cytofkit 及其他多种分析工具的使用方法，感兴趣可以访问以下链接：

<https://www.bilibili.com/video/BV1cJ41137Pn/>