

流式细胞仪理论及实验培训

中国科学技术大学生命科学学院实验中心流式平台

汪倩

2021/04/15

目录

- 流式平台仪器总览
- 流式细胞术的应用
- 流式细胞仪的组成和工作原理
- 实验设计
- 总结

流式平台仪器总览

I. 分选型流式细胞仪（可用于分析）

- Beckman Moflo 6激光流式细胞分选仪
- BD Aria III 3激光流式细胞分选仪

II. 分析型流式细胞仪

- Beckman Cytoflex 3激光流式细胞仪（高通量96孔板上样）
- BD LSRFortessa 3激光流式细胞仪

III. 量化成像分析流式细胞仪

- Amnis ImageStream MarkII 4激光量化成像流式细胞仪

IV. 质谱流式（使用金属标签，不同的工作原理）

- Fluidigm Helios + Hyperion™组织成像系统

流式分平台仪器总览

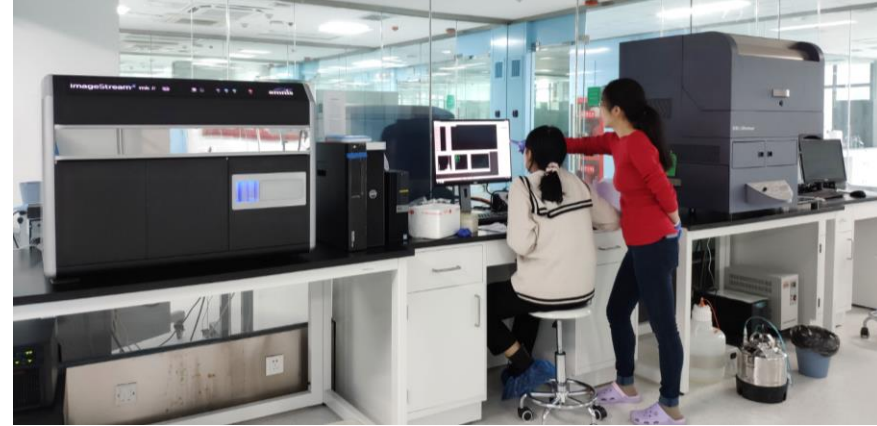
Fluidigm Hyperion
组织成像质谱流式系统



BD FACS Aria III
细胞分选仪



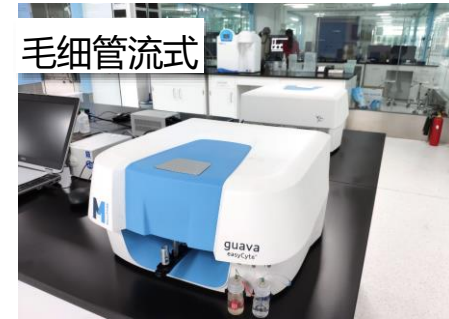
Luminex ImageStream
量化成像流式细胞仪



BD LSRFortessa
分析流式



Beckman MoFlo Astrios细胞分选仪



毛细管流式



Beckman Cytoflex
分析流式

流式细胞术简介

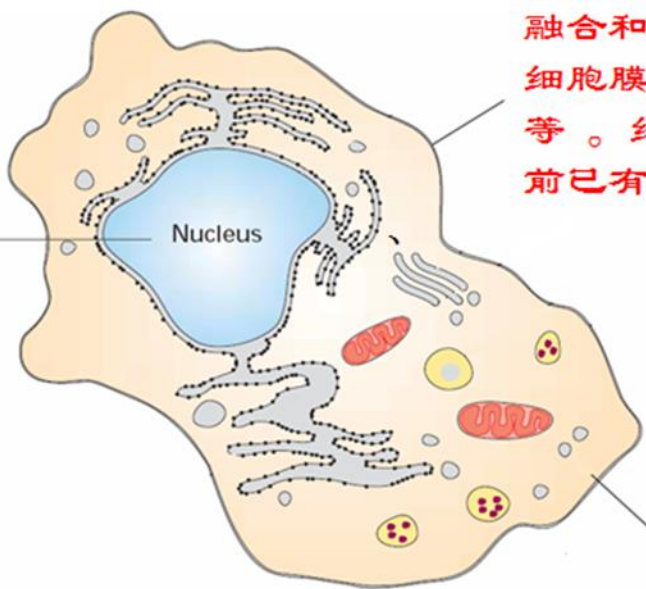
- 流式 + 细胞术： 测量**流动**中的**细胞/颗粒**的物理或化学性质
- 流式细胞仪： 通过测量流动的细胞/小颗粒通过检测点时与激光相互作用产生的**光学信号**， 从而得到各种特征参数的仪器
 - 散射光
 - 荧光
- 特点
 - 单细胞水平， 多参数同时测量
 - 高速检测
 - 大数据提供统计学差异
- 应用： 根据测量参数的差异来分辨细胞差异
 - 免疫分型、 细胞功能等等

流式细胞术的应用

可测量的细胞参数

核酸分析：DNA、RNA含量，DNA合成、降解、断裂，区分核酸单、双链，测量端粒长度、染色核型分析和染色体分选、核内蛋白检测

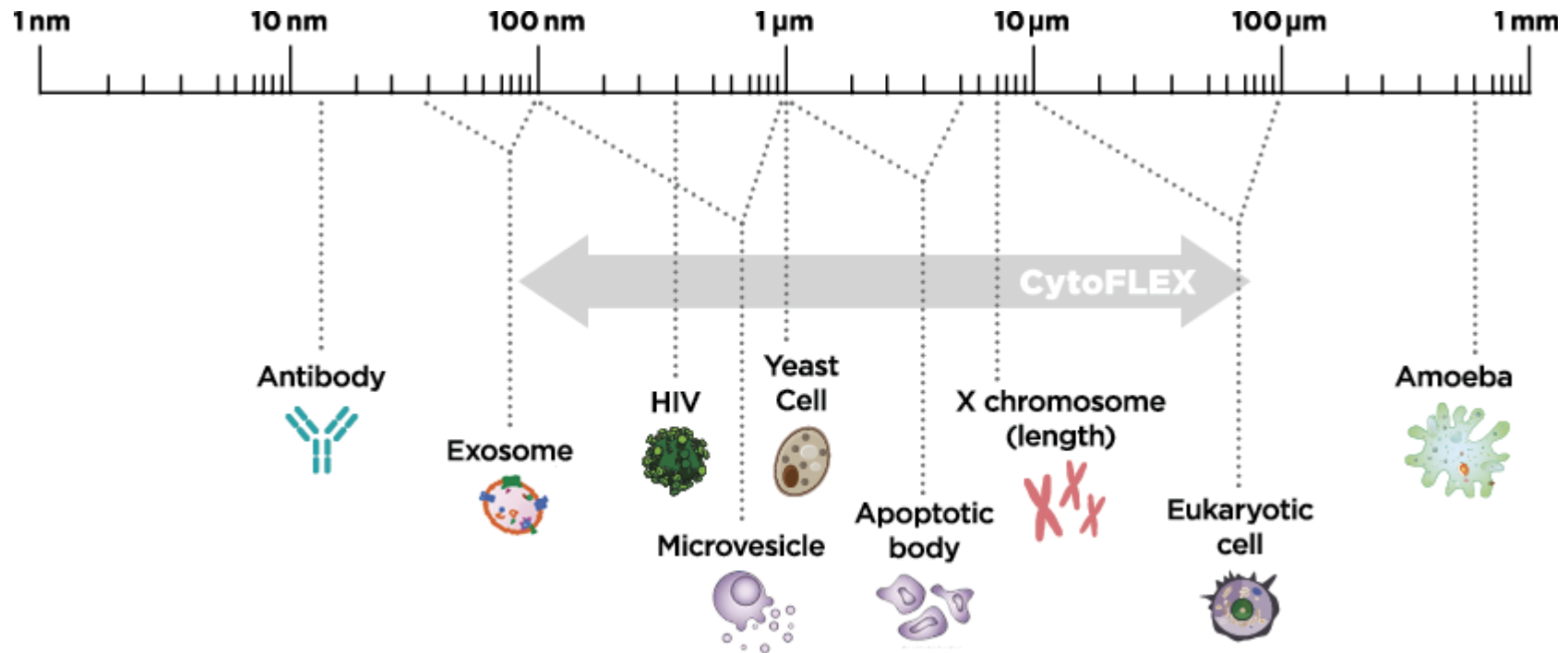
无需染色：大小，颗粒度，自发荧光，色素，绝对计数等



细胞膜：表面糖分子、细胞膜流动性和通透性、膜融合和翻转、膜脂质构成、细胞膜及线粒体膜电位等。细胞表面CD分子目前已有357个。

胞质：(1) Ca^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 H^{+} (2) 信号网络调控蛋白、转录因子、酶分子、细胞骨架蛋白、荧光蛋白、细胞因子、mRNA分子 (PLAYR assay) 等等 (3) 酶活 (荧光底物)、蛋白磷酸化、乙酰化、甲基化修饰等

流式细胞术的应用



第一部分：流式细胞仪的结构和工作原理

流式细胞仪的结构、功能和工作原理

- 液路系统

- 液路系统将样品（单细胞/颗粒悬液）排列成单列细胞/颗粒流，并使细胞/颗粒稳定高速的通过流式细胞仪的检测点

- 光学系统：激光 + 透镜 + 滤光片 + 检测器

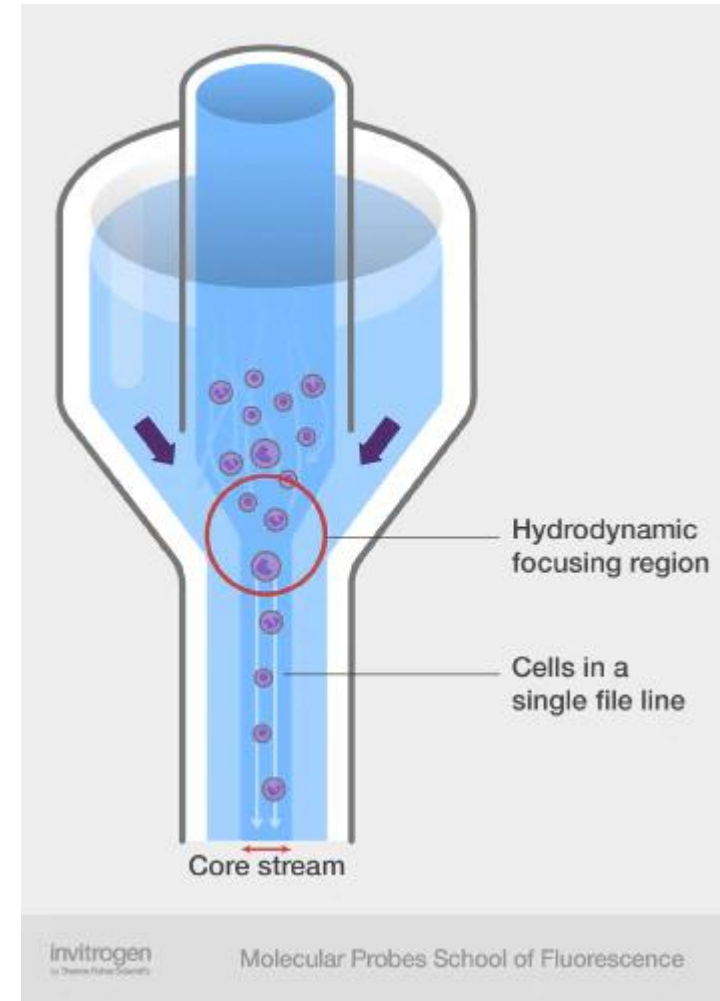
- 当细胞/颗粒通过检测点时，激光束照射到单个细胞/颗粒上，一些光被细胞表面的物理结构和细胞内颗粒散射，产生前向角散射（FSC）和侧角散射（SSC）；同时，激光激发细胞表面和细胞内所有的荧光基团，产生荧光。所有这些光被相应的检测器收集。

- 电子系统：

- 对收集的信号进行处理和保存，以备后续分析或下一步操作（分选流式）

流式细胞仪的液路系统

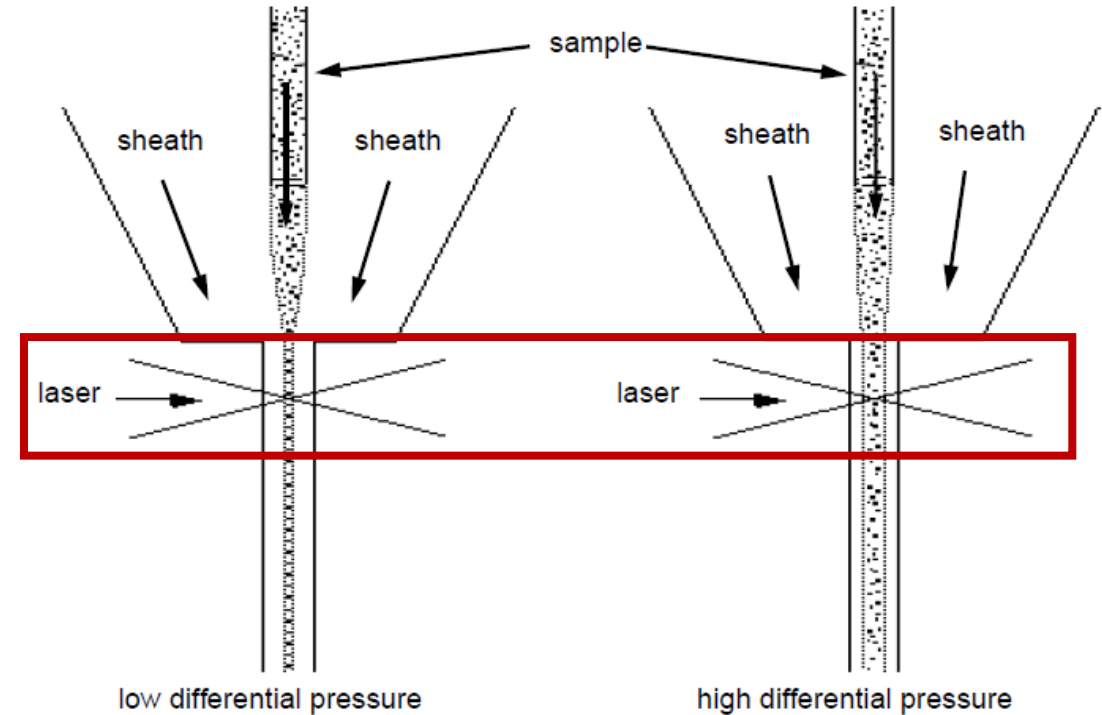
- 作用：将样品（单细胞/颗粒悬液）排列成单列细胞/颗粒流，并使细胞/颗粒稳定高速的通过流式细胞仪的检测点
- 原理：流体动力学聚焦
 - 样品以相对较慢的速度注入鞘液中，较快移动的鞘液迫使样品进入更细的sample core，使得所有颗粒沿同一轴线，以大致相同的速度行进。
 - Laminar flow保证各层之间彼此平行移动而不混合
 - 颗粒以相同的速度移动到检测点，减少数据波动



流式细胞仪的液路系统

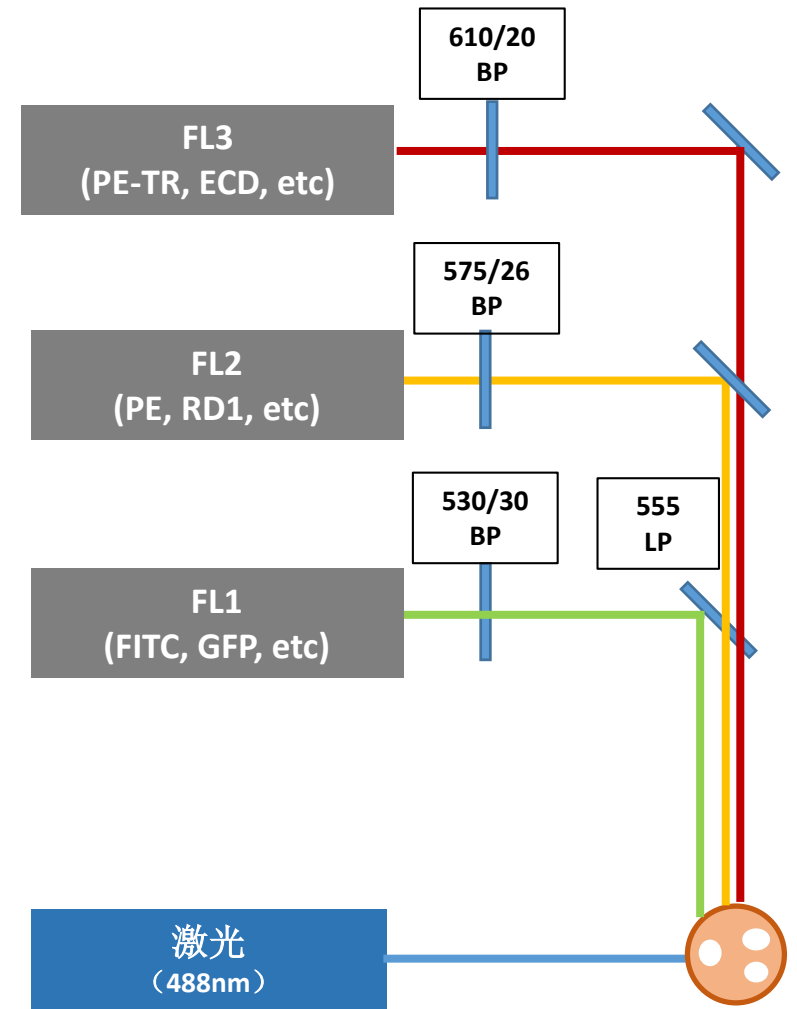
为什么建议低/中速上样?

- 上样速度越高，sample core越粗，激光聚焦越差，分辨率越低



流式细胞仪的光学系统

- 作用：将激光照射到细胞上，收集产生的光信号（前向、侧向散射光和荧光），并将这些光信号转换成电信号，导入电子系统。
- 流式细胞仪收集的光信号
- 激光光源的布局
- 光学系统中的滤光片
- 信号检测器



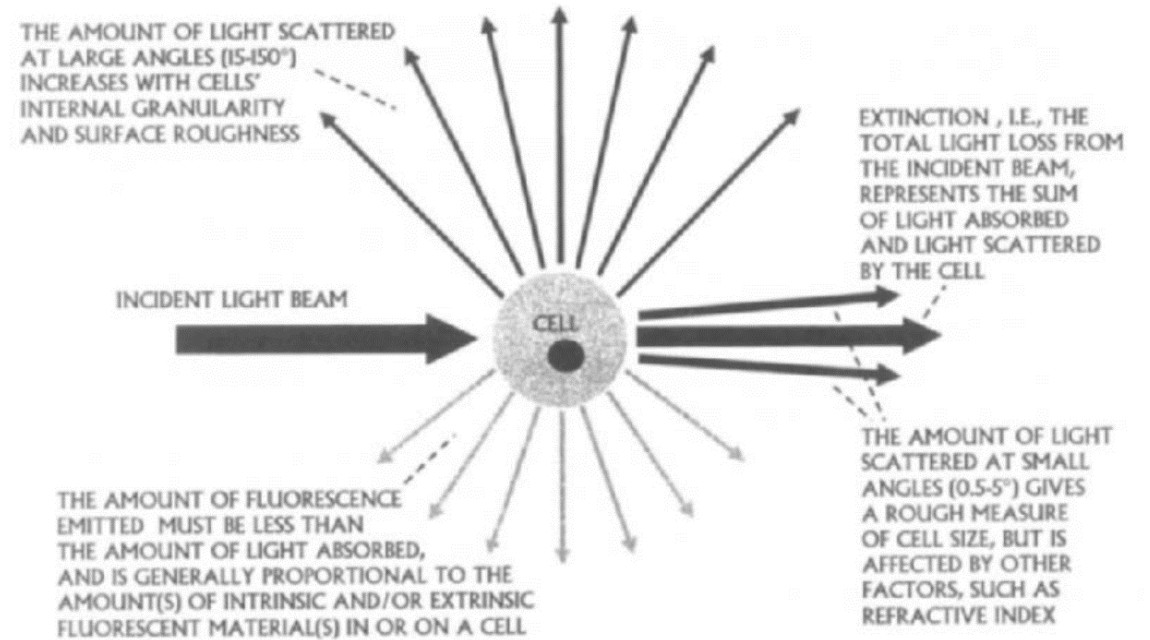
流式细胞仪的光学系统

• 流式细胞仪收集的光信号

➤ 散射光

- ✓ 细胞固有
- ✓ 根据细胞大小和复杂度对不同种类的细胞进行分群
- ✓ 前向散射 (FSC)
 - 细胞大小: 信号越强, 细胞越大
- ✓ 侧向散射 (SSC)
 - 细胞复杂度: 信号越强, 细胞内颗粒度越大/细胞表面越粗糙
- ✓ 细胞膜结构的变化会影响散射光信号强度

➤ 荧光



流式细胞仪的光学系统

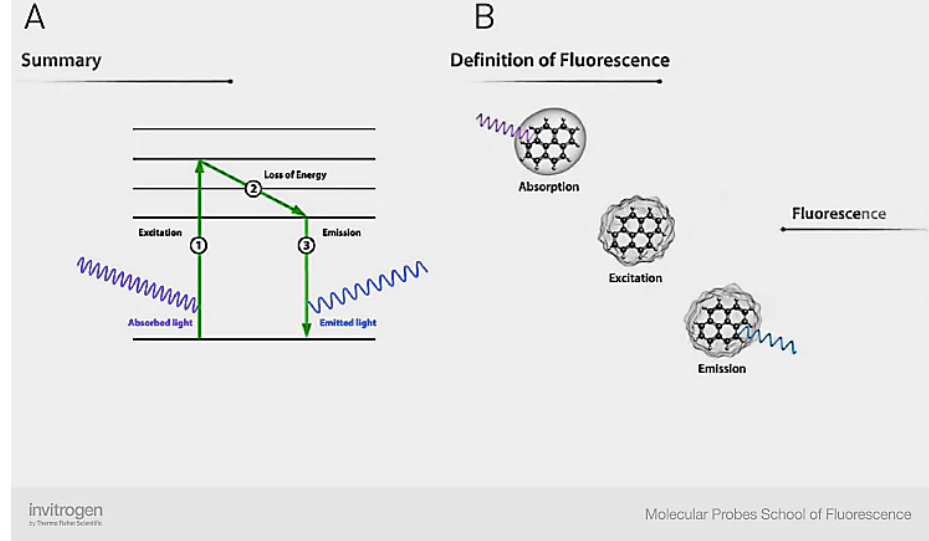
• 流式细胞仪收集的光信号

➤ 散射光

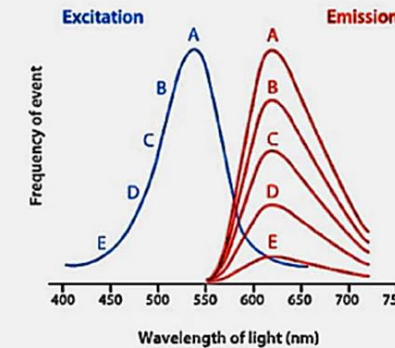
➤ 荧光

- ✓ 一般需要带有荧光素的标记物
- ✓ 荧光的产生是由基态的荧光素吸收一定波长的光跃迁到激发态，再释放光子（荧光）回到基态
- ✓ 吸收范围内波长的改变不影响发射光谱的位置和形状，只影响效率
- ✓ **荧光溢漏和补偿**：荧光素的发射光信号被非接收通道检测到，即产生荧光溢漏；荧光补偿就是修正荧光溢漏所产生的假阳性的荧光信号的过程。

荧光信号的产生过程



Fluorescence Emission



激发波长的改变不影响发射光谱的位置和形状，但影响效率

Illumination at lower or higher wavelengths affects only the intensity of the emitted light

流式细胞仪的光学系统

- 激光光源的布局

- 激光的平行与共线

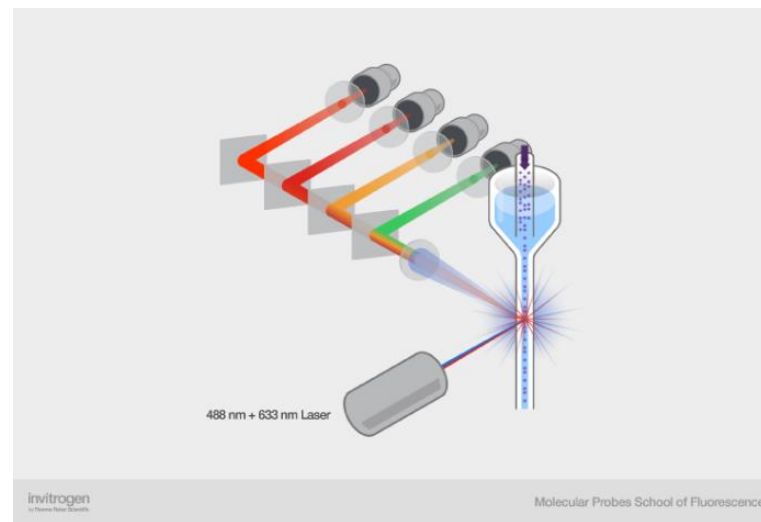
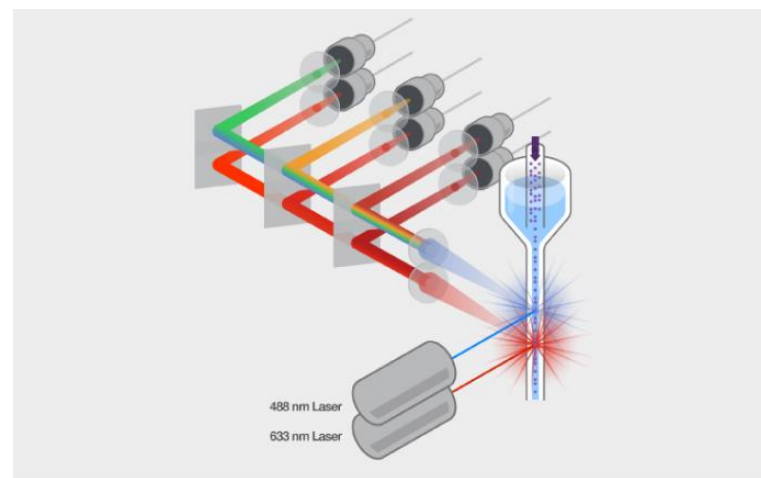
- ✓ 平行装置中的激光器在空间上是分离的，检测器是独立的，不存在发射重叠的问题

- 主流布局

- ✓ 减低荧光溢漏造成的影响

- 平行激光布局中的激光延迟

- ✓ 主要受流速影响
 - ✓ 由CS&T日常校准确定



流式细胞仪的光学系统

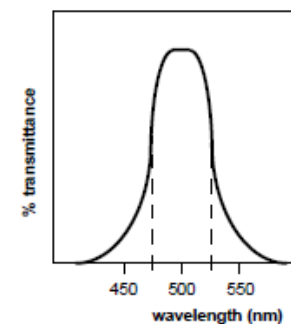
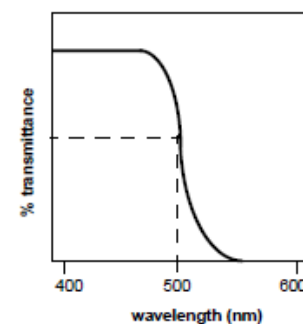
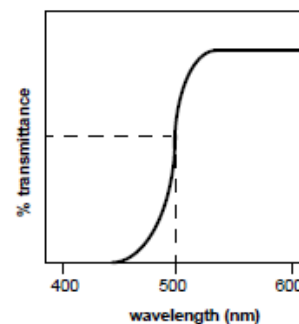
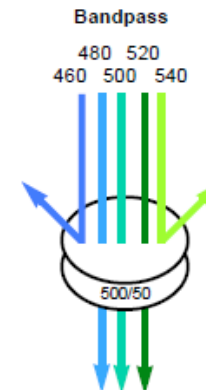
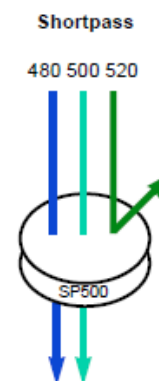
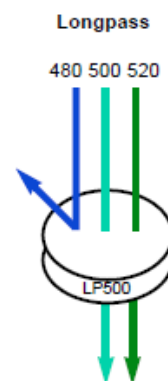
- 光学系统中的滤光片

- 长通: longpass (LP) LP500

- 短通: shortpass (SP) SP500

- 带通: bandpass (BP)

- ✓ 举例: 530/30的意思是 530 ± 15

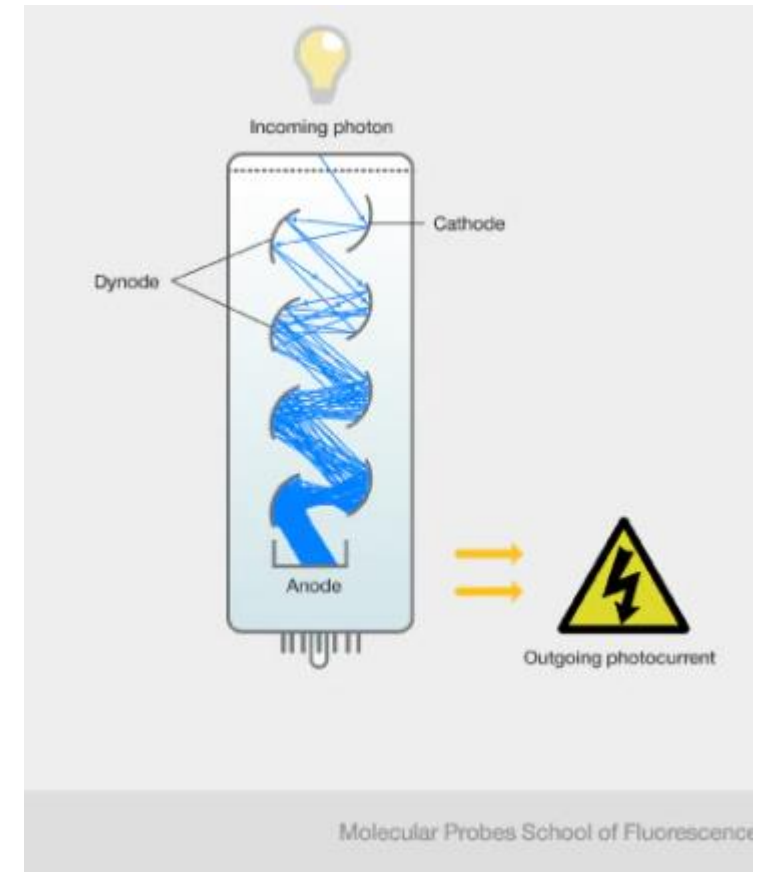


流式细胞仪的光学系统

- 信号检测器

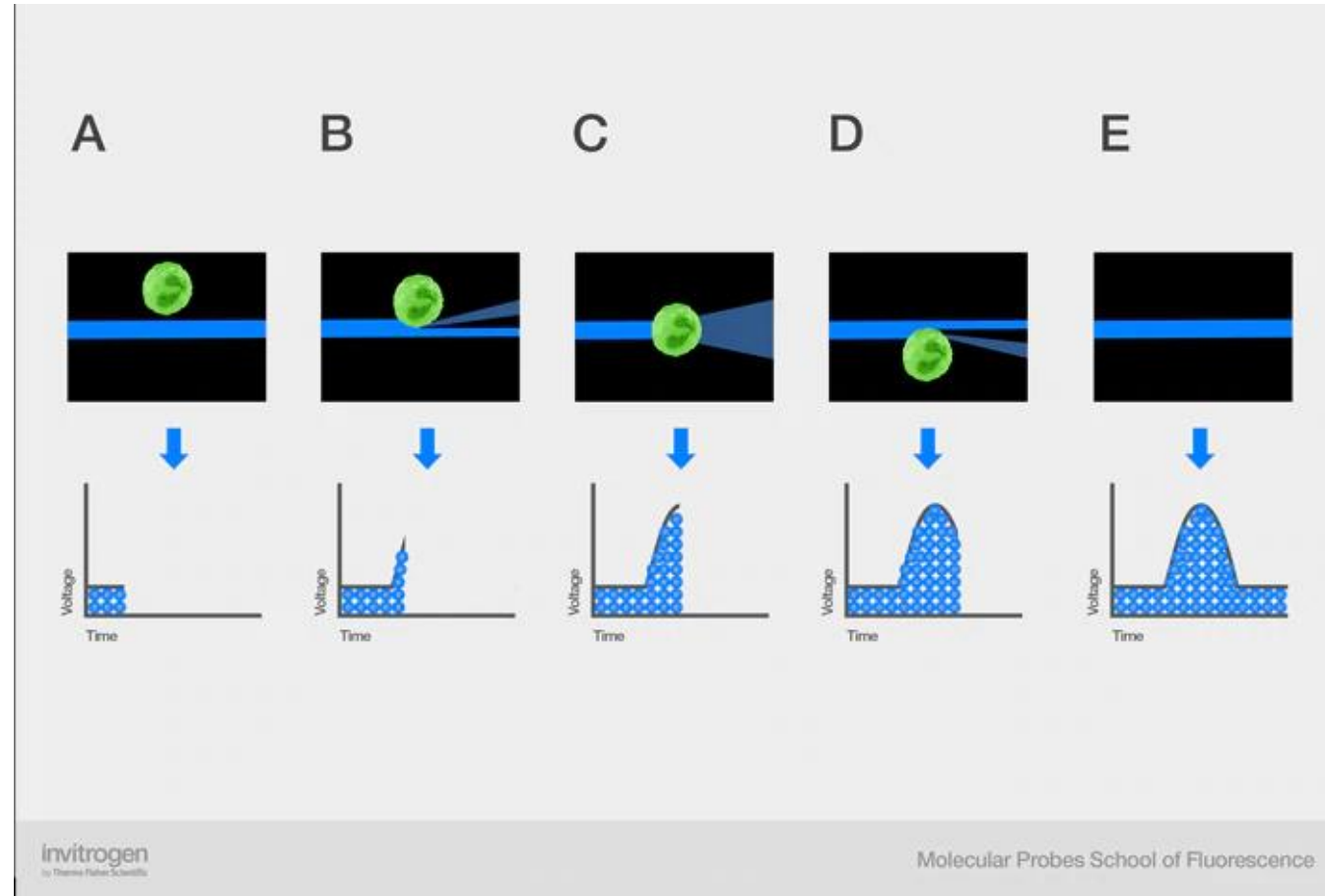
- 光信号转化为电信号并放大
- 光电二极管（PD）、光电倍增管（PMT）、雪崩光电二极管（APD）
- PMT vs. APD
 - ✓ 均用于测量SSC和荧光信号
 - ✓ APD在长波长区域灵敏度更高
- 信号检测器放大倍数由电压调节

光电倍增管



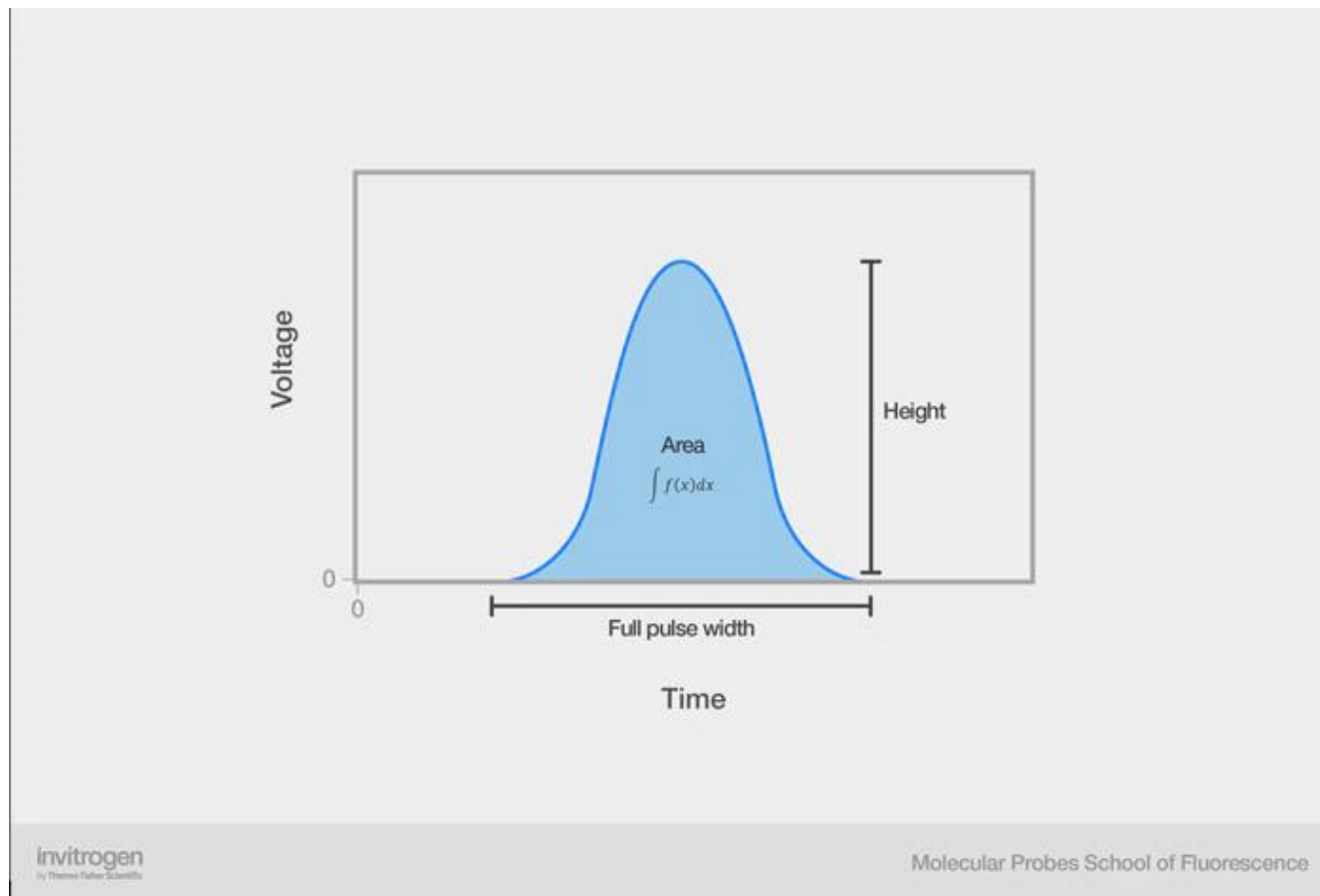
流式细胞仪的电子系统

- 作用：对收集的信号进行处理和保存，以备后续分析或下一步操作
- 光信号是如何转化为测量数据的
 - 第一步：光信号转化为电脉冲信号
 - ✓ 电脉冲信号的三个参数：
 - 高度（H）：信号强度
 - 宽度（W）：流速 + 细胞大小
 - 流速稳定
 - 面积（A）： $\sim H \times W$ （默认数据）
 - 第二步：电脉冲信号数字化

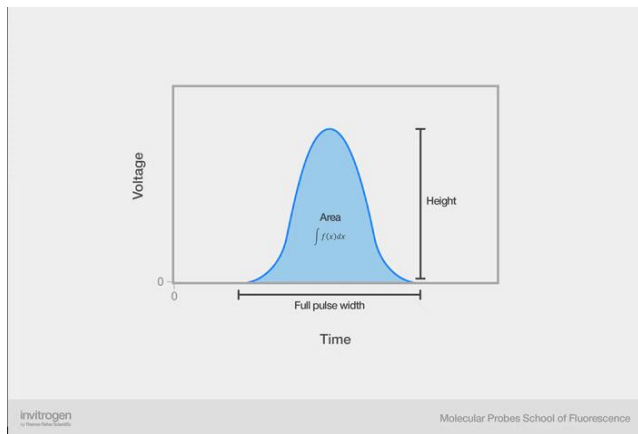


流式细胞仪的电子系统

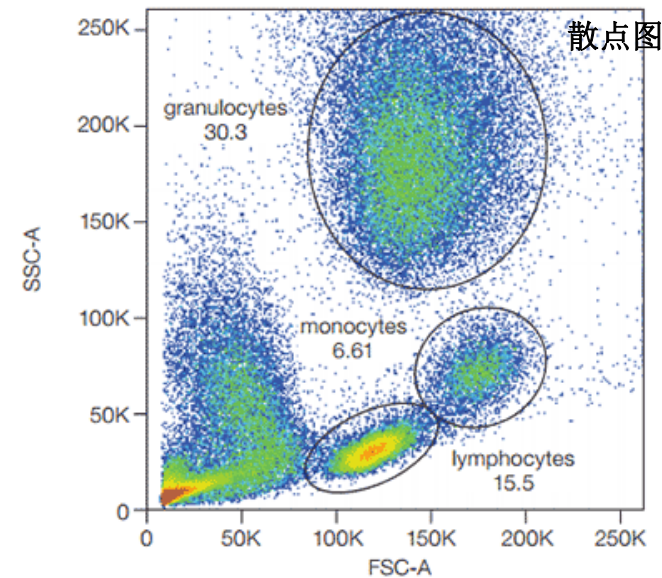
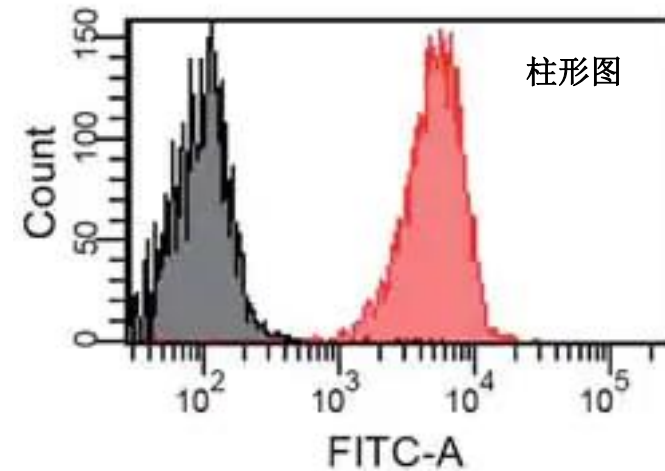
- 作用：对收集的信号进行处理和保存，以备后续分析或下一步操作
- 光信号是如何转化为测量数据的
 - 第一步：光信号转化为电脉冲信号
 - ✓ 电脉冲信号的两个参数：
 - 高度（H）：信号强度
 - 宽度（W）：流速 + 细胞大小
 - 流速稳定
 - 面积（A）：默认数据
 - 第二步：电脉冲信号数字化



流式细胞仪的数据生成:



Cell#	FSC-A	SSC-A	FITC-A
1	300	280	100
2	250	300	250
3	320	200	1000
4	400	350	4000
5	300	320	1000
6	290	330	8000
7	330	350	8000
↓	↓	↓	↓

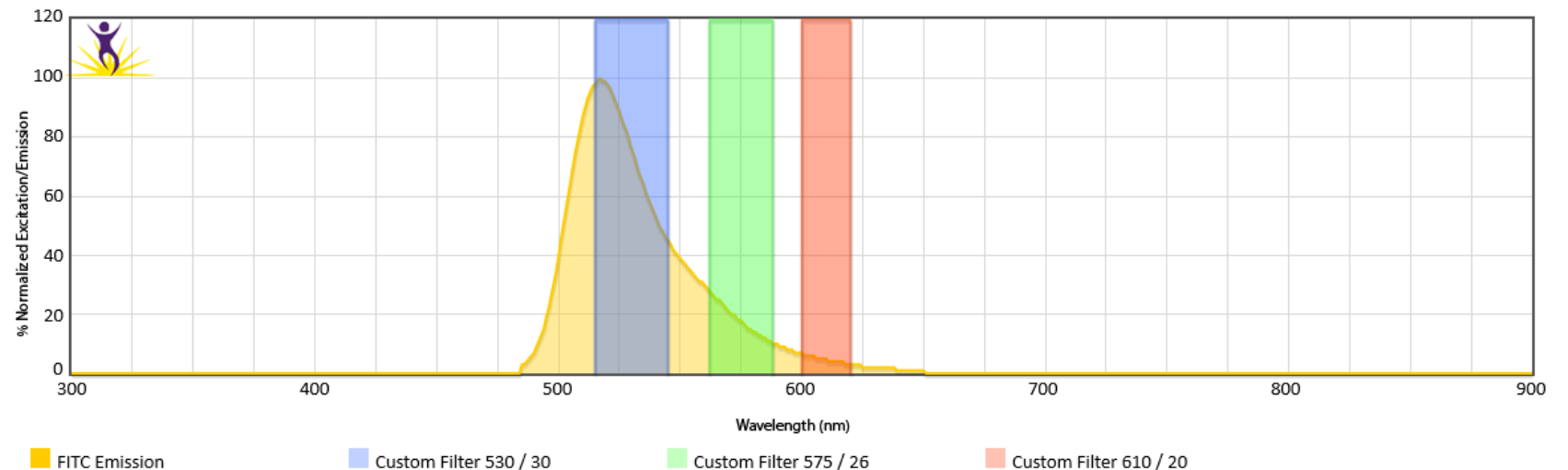


第二部分：荧光溢漏及补偿

荧光溢漏

- 荧光溢漏：荧光染料的发射光信号被不止一个通道检测到。
 - 主要原因：荧光染料的发射光谱有一定的范围（一般在 100 nm-200 nm）
 - 其他原因：
 - ✓ 荧光素可以被多于一个激光激发，比如Percp-Cy5.5可以同时被488 和405激发，会溢漏到BV711
 - ✓ 复合荧光素在donor通道有溢漏，比如，PE-Cy7在PE通道的溢漏
 - 被溢漏通道的假阳性信号
 - ✓ 可以通过荧光补偿修正
 - Spreading Error：降低分辨率
 - ✓ 只能通过荧光配色来避免

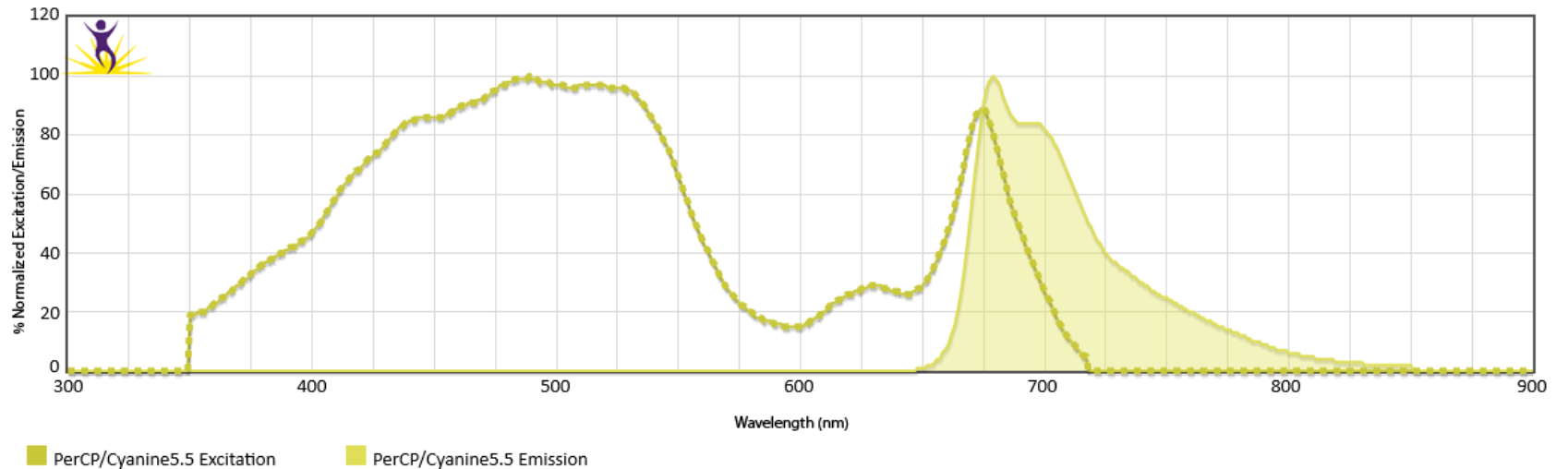
FITC的发射光谱除了在主接收通道 FITC（530/30），在PE通道（575/26）和 PE-TexRed（610/20）均有溢出。



荧光溢漏

- 荧光溢漏：荧光染料的发射光信号被不止一个通道检测到。
 - 主要原因：荧光染料的发射光谱有一定的范围（一般在 100 nm-200 nm）
 - 其他原因：
 - ✓ 荧光素可以被多于一个激光激发
 - ✓ 复合荧光素在donor通道有溢漏，比如，PE-Cy7在PE通道的溢漏
 - 被溢漏通道的假阳性信号
 - ✓ 可以通过荧光补偿修正
 - Spreading Error：降低分辨率
 - ✓ 只能通过荧光配色来避免

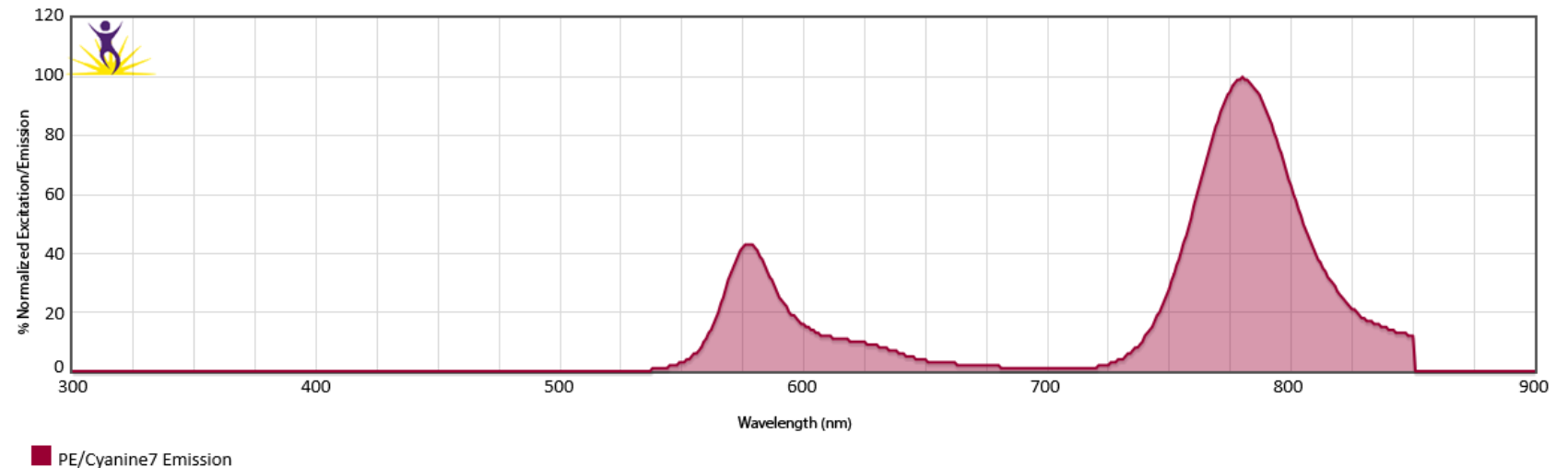
PerCP-Cy5.5可以同时被488和405激光激发，会溢漏405激光对应的发射波长在700左右的通道（BV786，780/60）



荧光溢漏

- 荧光溢漏：荧光染料的发射光信号被不止一个通道检测到。
 - 主要原因：荧光染料的发射光谱有一定的范围（一般在 100 nm-200 nm）
 - 其他原因：
 - ✓ 荧光素可以被多于一个激光激发
 - ✓ 复合荧光素在donor通道有溢漏
 - 被溢漏通道的假阳性信号
 - ✓ 可以通过荧光补偿修正
 - Spreading Error：降低分辨率
 - ✓ 只能通过荧光配色来避免

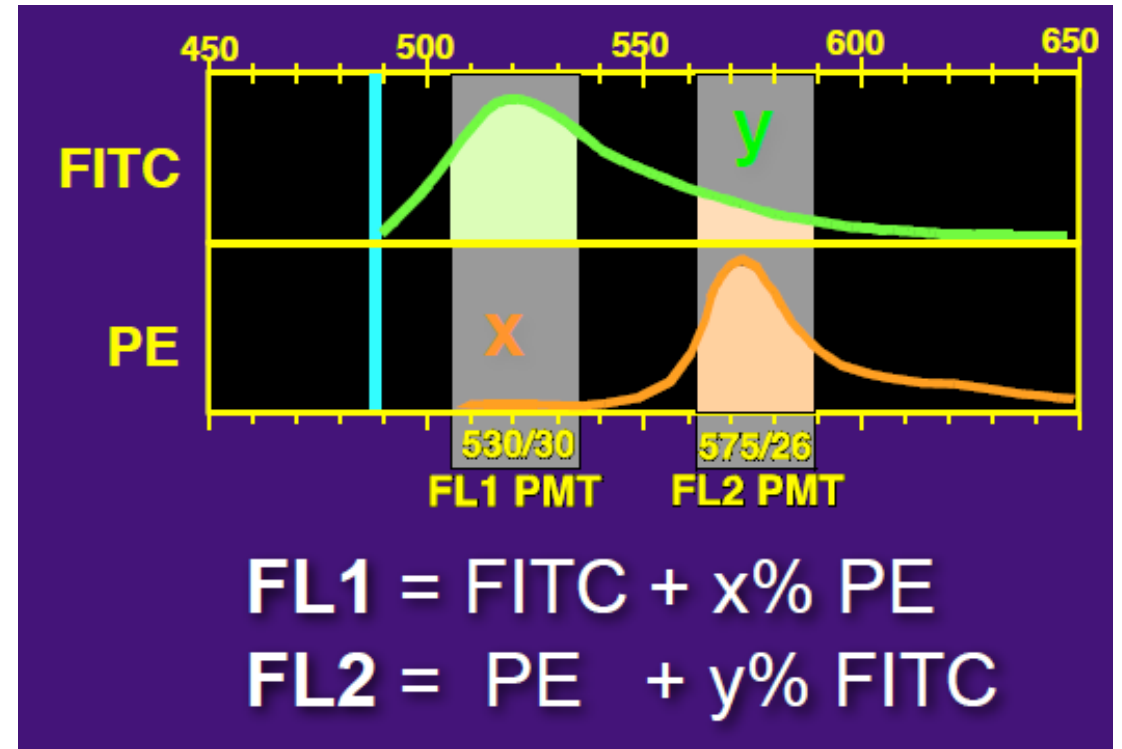
PE-Cy7的发射光谱除了在主接收通道（780/60），在donor荧光素PE通道（575/26）也有溢出。



荧光补偿

- 荧光补偿：修正荧光溢漏所产生的假阳性的荧光信号
 - 数学计算，建议软件处理
- 计算补偿需要单色补偿管
 - 荧光素匹配
 - ✓ 一定要使用相同的荧光素，例如GFP和FITC不可互作补偿
 - ✓ 复合类荧光素，例如PE-CY7，需要批次一致
 - 阴性群的自发荧光要与阳性群一致
 - ✓ 举例：不可使用CD3+T细胞作为阳性群，CD3-粒细胞作为阴性群
 - 必须有明显的阳性细胞群，阳性群的荧光强度应不低于样本
 - ✓ 至少要收集400个阳性细胞用于计算（5% CV）
 - 如果抗原表达很弱、抗原表达缺失、细胞数有限：
 - ✓ 补偿微球（推荐）
 - ✓ 其它细胞/高表达抗原（必须满足前两个条件）
 - 补偿样本必须和样本经过同样的处理，例如固定
 - ✓ 包括补偿微球
- 补偿值受电压影响，样本必须和单色补偿管在同一电压下收集。

以FITC，PE双染样本为例

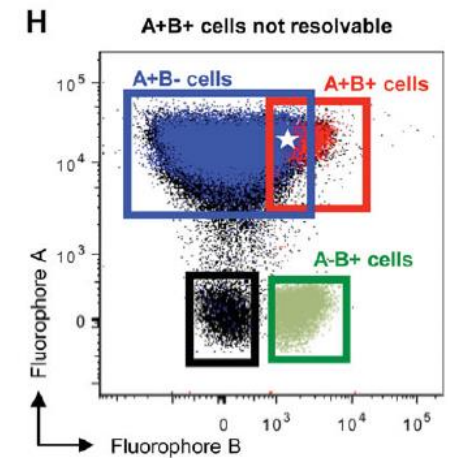
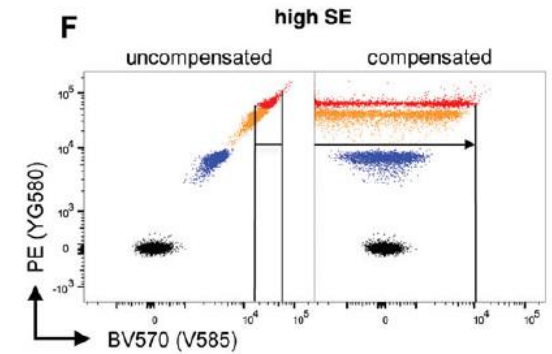
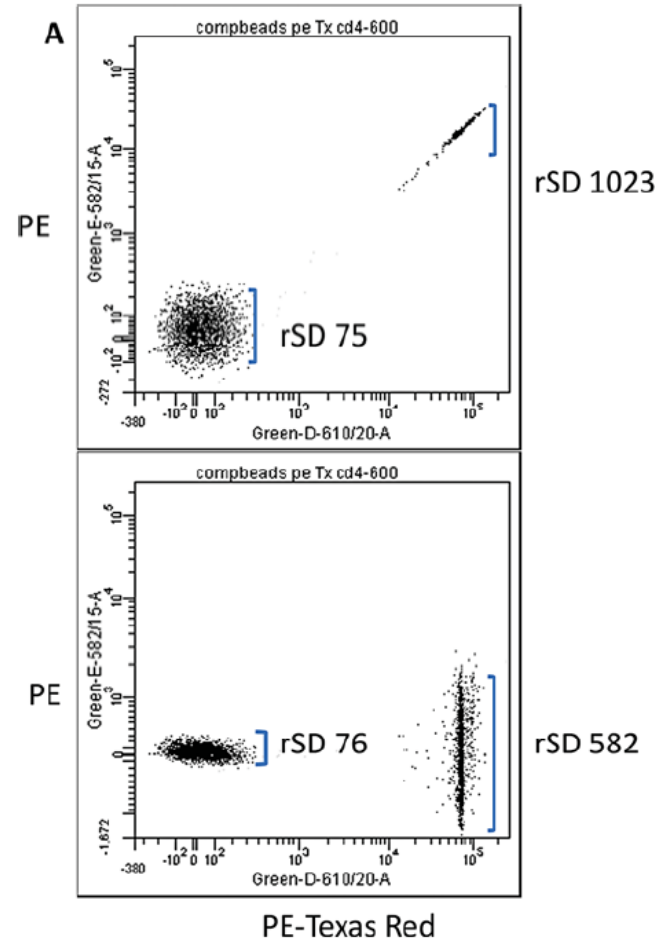


如果荧光补偿可以修正荧光溢漏导致的假阳性信号，为什么通常不建议补偿很高的荧光素同时使用呢？

荧光溢漏导致的Spreading Error降低了信号分辨率

- Spreading Error

- Spreading error是一种**测量误差**，表现为在**被溢漏通道**的弥散，是由**荧光溢漏**造成的，不是由**补偿**造成的
- Spreading error 降低了双阳性细胞在被溢漏通道的分辨率。一般需要**阴性对照**辅助圈门。
 - ✓ 补偿数值的改变不会提高分辨率
 - ✓ 只能通过**配色方案**来降低spreading error的影响



第三部分：实验设计及样本准备

配色方案设计的基本原则

1. 了解实验目的
 - 根据实验目的，确定需要检测的marker，以及各个细胞亚群的marker的表达情况
2. 了解仪器配置
 - 仪器通道越多，配色的难度越低
3. 在准备测试的仪器上对荧光素进行测试
 - 测试荧光素亮度（staining index）和spreading error
 - 实际实验中，可以由网上数据进行预估
4. 了解各个marker的表达情况
 - 强弱排序
5. 将marker和荧光素配对
 - 将荧光素排序，亮度 优先， spreading error其次
 - 将表达按由弱到强的顺序与荧光素匹配，即亮的荧光素配弱的marker
 - 共表达的markers，如果有弱表达，强表达对弱表达的spreading error要尽量少
6. 抗体滴定

流式平台流式细胞仪的仪器配置

仪器	激光配置	通道
CytoFlex 分析	405 488 633	405/10, 450/45, 525/40, 610/20, 660/10, 780/60 (选2) 488/8, 525/40, 585/42, 610/20, 690/50, 780/60 (选3) 638/6, 660/10, 712/25, 780/60 (选2)
BD LSRFortessa分析	405 488 640	450/50, 525/50, 560/20, 585/15, 605/12, 655/8 488/10, 530/30, 575/26, 610/20, 695/40, 780/60 670/14, 730/45, 780/60
Beckman Moflo分选	355 405 488 561 592 640	448/59, 620/29, 692/75 448/59, 546/20 513/26, 576/21, 620/29, 664/22, 710/45, 795/70 579/16, 614/20, 692/75 620/29, 671/30, 722/44, 795/70 671/30, 722/44, 795/70
BD ArialIII分选	405 488 638	450/40, 510/50, 610/20, 660/20, 690-715, 780/60 530/30, 585/42, 616/23, 695/40, 780/60 660/20, 730/45, 780/60
Amnis成像流式	405 642 488 561	430-505, 505-570, 570-595, 595-642, 642-745, 745-800 420-480, 480-560, 560-595, 595-642, 642-745, 745-800

骨髓造血细胞的26色配色方案

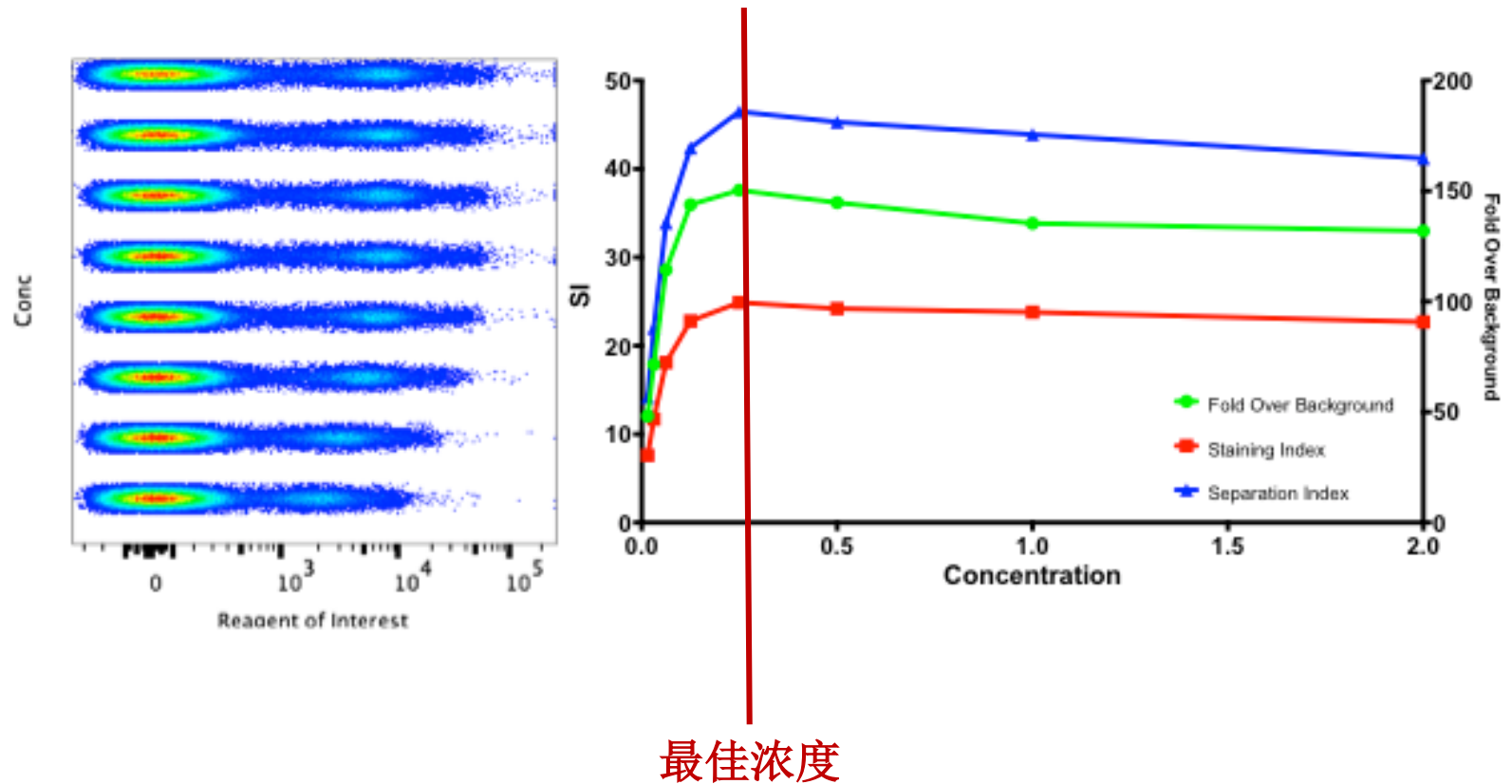
A

1. 将荧光素排序：亮度优先，spreading error其次
2. 将表达按由弱到强的顺序与荧光素匹配，即亮的荧光素配弱的marker
3. 不清楚表达强弱的marker，表达强度存在由弱到强一系列区间的，一般按照弱表达分配
4. 共表达的markers，如果有弱表达，强表达对弱表达的spreading error要尽量少
5. 考虑其他因素

Category	Fluorophore	Fluorophores		Comments
		SE received	SE contributed	
Very bright	BB515	5.6935	2.304	
Very bright	BUV661	22.2865	96.3104	
Very bright	PE/Cy7	31.1855	17.2354	
Very bright	PE	42.14	25.1831	
Very bright	PE/Cy5	42.8218	57.2084	
Very bright	PE/Cy5.5	47.379	53.2355	Only few conjugates available
Very bright	BUV615	48.2128	85.138	Not available commercially
Very bright	PE/CF594	119.5642	32.0647	
Very bright	BB700	123.8952	28.373	
Bright	BV711	21.3507	67.761	
Bright	BV421	21.7601	7.9191	
Bright	BV650	26.8716	61.951	
Bright	AF594	68.353	80.357	
Bright	APC	157.083	17.0803	
Intermediate	BV510	6.9305	49.5546	
Intermediate	BV750	35.7376	62.666	
Intermediate	BV785	46.018	40.211	
Intermediate	BUV395	46.505	4.8988	
Intermediate	BV605	54.775	60.431	
Intermediate	BUV737	68.359	31.4886	
Dim	DL800 (SA-Bio)	5.7562	32.388	
Dim	Live/dead blue	9.4571	66.377	Live/dead dye
Dim	BV570	11.688	100.868	
Dim	BUV805	22.4786	28.143	
Dim	APC/Cy7	33.675	32.2115	
Dim	AF700	50.1014	28.7199	

Low	Intermediate	High	Antibodies		Comments
			Very high		
CD34					
NK1.1					
			Ly6C		Looking to identify high and low expression
CD127					
	CD19				
	CD3e				
Siglec-F					
CD135					
CD16/32					
	SCA-1				Looking to identify high and low expression
	CD117				
CD150					
	CD115				
	CD62L				
			MHCII		
	CD11c	Ter119			
	F4/80	CD11b			
		B220			
			Ly6G		
			Live/dead		
		CD45			
		CD8a			Only few conjugate options available
	CD48				Already know APC/Cy7 works well for CD48
		CD45			

阳性群与阴性群的分辨率 (SI) 随浓度而变化



选择对照

1. 针对补偿的单染管对照（多色实验必须）：

- 荧光素匹配
 - ✓ 一定要使用相同的荧光素，例如GFP和FITC不可互作补偿
 - ✓ 复合类荧光素，例如PE-CY7，需要批次一致
- 阴性群的自发荧光要与阳性群一致
 - ✓ 举例：不可使用CD3+T细胞作为阳性群，CD3-粒细胞作为阴性群
- 必须有明显的阳性细胞群，阳性群的荧光强度应不低于样本
 - ✓ 至少要收集400个阳性细胞用于计算（5% CV）
- 如果抗原表达很弱、抗原表达缺失、细胞数有限：
 - ✓ 补偿微球（推荐）
 - ✓ 其它细胞/高表达抗原（必须满足前两个条件）
- 补偿样本必须和样本经过同样的处理，例如固定
 - ✓ 包括补偿微球

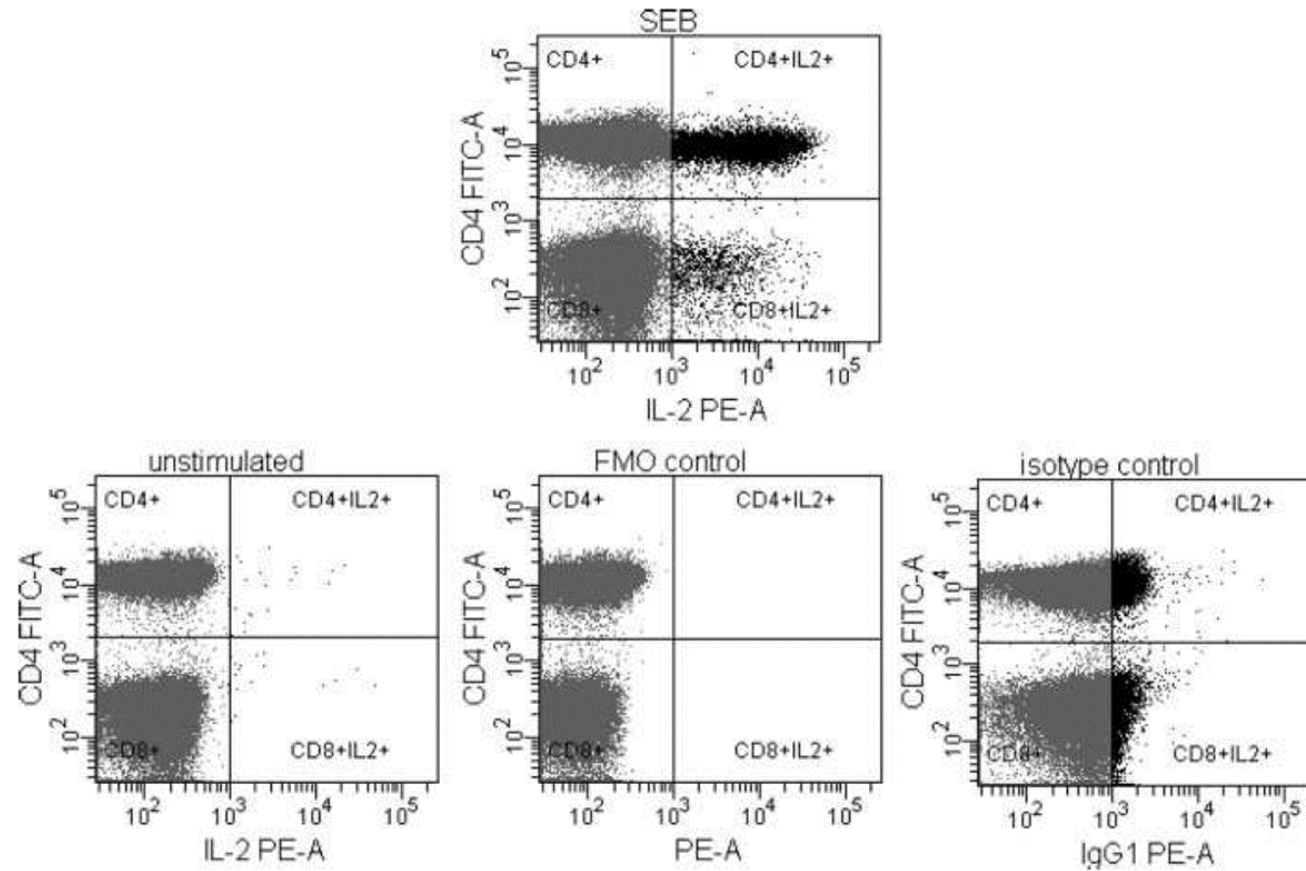
2. 针对圈门（区分阴阳群边界）的对照

- Isotype: 去除非特异性结合造成的背景荧光
 - ✓ 局限性：即使同型对照抗体和目标抗体的免疫球蛋白亚类匹配一致，其浓度、荧光素/抗体比、结合能力等等一系列因素也会造成背景荧光的差异
- FMO: 减一荧光对照（Fluorescence-Minus-One）
- 不同的圈门对照可能会造成结果偏差，要视具体情况决定

3. 实验组对照

- 阴性对照：有时可做圈门对照
- 阳性对照：确保实验操作正确

不同的对照下，对阳性群圈门位置的影响



样本准备

➤ 染色前需要确认：

✓ 荧光素染色的条件（试剂公司官网）

- FITC不可在酸性条件下使用
- 当同时使用多于一种大分子染料，例如BV系列，SuperBright系列，需要特殊的staining buffer，以防大分子相互作用降低染色效率

✓ 酶处理的组织样本，对某些抗原的epitope会有损伤，需要谨慎选择相应的抗体clone

➤ 细胞悬液：

✓ 参考文献中protocols

✓ 浓度为 $\sim 10^6$ /mL（数量级）

✓ 防止细胞聚团是获得好数据的前提

- 样本在冰上操作/保存：降低代谢，减少细胞死亡
- 重悬液中加入EDTA（50mM）/DNAase I（25-50 μ g/mL）
- 上样前细胞过筛网 70 μ m/200目
- 如果需要等待较长的时间才能测试，固定细胞

➤ 使用封闭液、死/活染料，增加洗细胞的次数可以降低非特异性结合造成的假阳性，增加分辨率

➤ 采样数量：以最少的目标细胞群计数，至少400（计数误差CV 5%）

上机操作

- 优化电压

- 主要目的是提高信噪比，提高分辨率

- **前提：细胞的荧光强度（阴阳群）都应在仪器的线性工作区间！！！！**

- 三种方法

- ✓ BD仪器的CS&T电压

- 最简单；但是一般偏高

- ✓ 设置未染色细胞的位置的rSD在2.5倍rSD（电子噪音）

- 只能在BD仪器上使用，因为Cytotflex不提供相关参数

- ✓ 电压滴定

- 参考：Perfetto, S. P., Ambrozak, D., Nguyen, R., Chattopadhyay, P. K., & Roederer, M. (2012).

- Quality assurance for polychromatic flow cytometry using a suite of calibration beads, 7(12), 2067–2079

- 实际操作中定电压（非最优电压）

- 方法一：使用CS&T电压，同时确认最亮的阳性群信号仍在线性范围内（不超过 2×10^5 ）

- 方法二：阴性群的位置放在200左右（不适用于自发荧光较高的样本），同时确认最亮的阳性群信号仍在线性范围内（不超过 2×10^5 ）

总结

➤ 实验前：

- ✓ 了解仪器配置
- ✓ 根据实验需求，合理搭配荧光染料
 - 基本原则：亮的、受荧光溢漏影响小的荧光素留给弱表达

➤ 实验中：

- ✓ 好的单细胞悬液是获得好数据的前提
- ✓ CS&T电压是很好的参考，尤其对弱表达
- ✓ 合适的对照对区分阴阳群很重要

➤ 实验结束：

- ✓ 如果操作正确且补偿正确的情况下仍无法区分阴阳群（的确应该有阳性群），应该考虑修改荧光染料搭配，而不是修改电压

➤ 上机培训时间

- Cytoflex：每月的第三个星期二
- LSRFortessa：每月的第一个星期二

总结

相关培训文件可以在中心网站的仪器页面找到

首页 >> 仪器预览 >> BD Fortessa 分析流式细胞仪



BD Fortessa 分析流式细胞仪

仪器分类：流式细胞仪 仪器状态：空闲

所属单位：中国科学技术大学 > 公共实验中心 > 生命科学实验中心 > 仪器测试中心 > 细胞组

仪器生产商：BD 购置日期：2019-07-07

使用模式：项目委托, 按时预约 规格型号：LSRFortessa

放置房间号：----

[🕒 预约](#) [📁 收藏](#)

仪器介绍	仪器管理员	业务信息	预约权限	文件下载	预约日历	
序号	标题			文件数量	添加时间	操作
1	BD流式基础理论—工程师安装培训视频			1	2020-08-04 15:59:52	文件下载