

流式分选原理及实验流程

—— 以BD FACSAria III为例，介绍仪器结构和实验操作

汪倩

中国科学技术大学生命科学实验中心

<http://lifetech.ustc.edu.cn>

2022年10月27日

目录：

1. 流式分选的特点和应用
2. 流式分选原理
 - 分选的是包裹细胞的液滴而非细胞
3. 影响分选效果的因素
4. 实验准备
5. BD FACS Aria III 仪器结构与操作

一、流式细胞分选的特点和应用

1、流式细胞分选技术简介

1.1、流式细胞分选是一种从混合（异质性）细胞群体中分离出特定细胞亚群的技术，是基于流式细胞检测技术上的实时分选

1.2、流式细胞分选技术的特点

- 单细胞水平，多参数同时测量
- 速度快：高达上万个evts每秒
- 可以定量分析，大数据提供统计学差异
- 分选纯度模式：富集（yield）、纯度（purity）、单细胞（single cell）等等
- 分选接收模式：收集管、孔板和玻片
- 可根据实验需求调节的纯度、活性和回收率

2、流式分选能够分析、分选的颗粒范围

流式细胞仪可分选颗粒大小：0.1-1500um



3、流式分选的应用

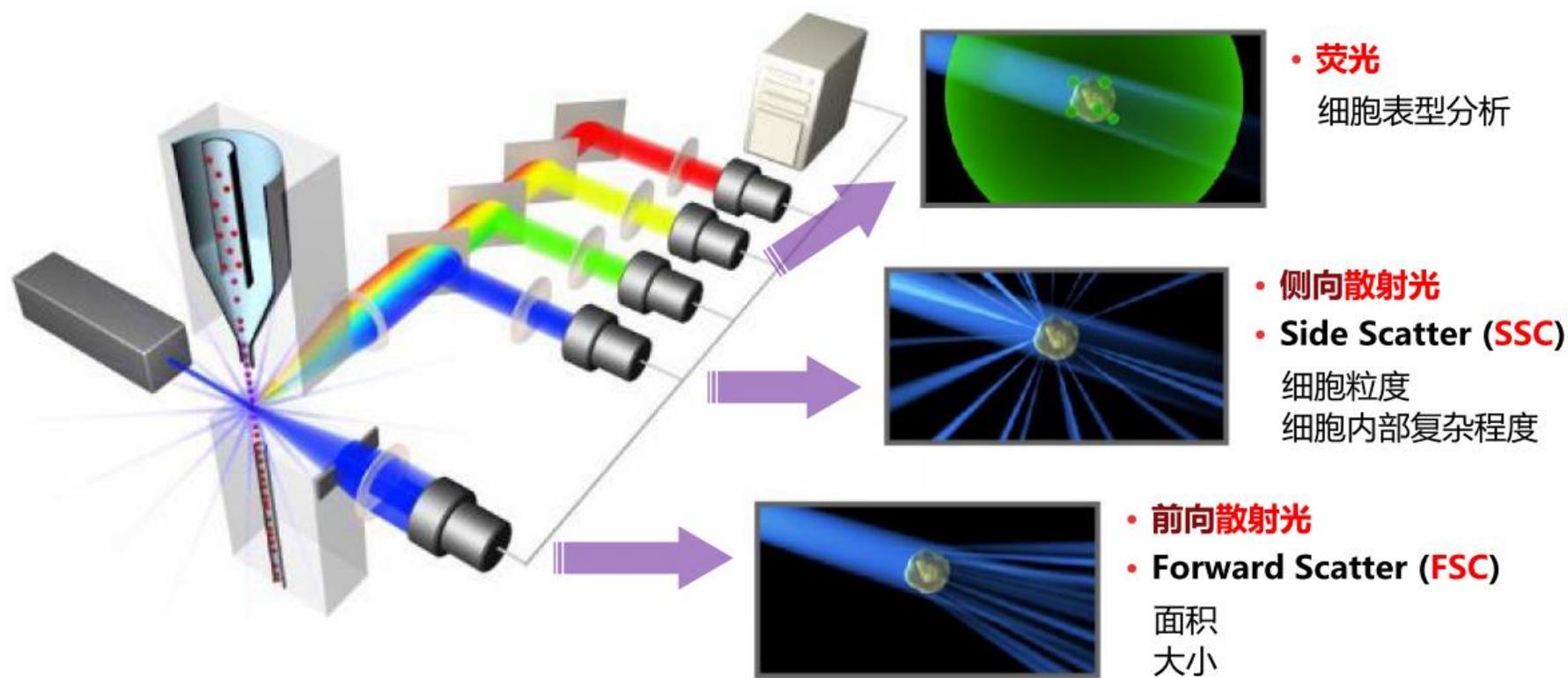
- 何时应当使用流式分选而不是梯度离心、磁珠分选等细胞批量分离纯化方法？

- (1) 需要根据多个细胞参数（多色荧光标记）逐级圈门来分选细胞；
- (2) 需要根据表面蛋白的密度差异（同一信号的强弱差异）来分选细胞；
- (3) 需要分离低密度表面抗原（微弱信号）的细胞；
- (4) 要求目标细胞群有极高的纯度(95%-100%);
- (5) 根据细胞功能活动及状态特征（胞吞、凋亡等，非抗体标记）来分选细胞；
- (6) 根据细胞内的某些标志，如DNA含量、荧光蛋白、胞内抗原等分离细胞；
- (7) 多孔板分选；如单克隆分选，在96、384孔板每个孔中精确的分入1个细胞；
- (8) 需要分选极低含量的稀有细胞（如0.001%或更低）；
- (9) 分选感兴趣的未知特征的细胞亚群。

二、流式细胞分选的基本原理

1、流式细胞术的检测原理

流式细胞术对细胞的检测基于激光和免疫荧光技术，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**散射光**和**荧光**，从而得到各种特征参数。



流式细胞术中的光信号： 散射光和荧光

- 散射光信号

(1) 细胞的固有参数， 不需要标签

(2) 前向散射光 (Forward Scattering, FSC) : 细胞大小

- Mie散射

- 细胞越大， 前向散射光越强

(3) 侧向散射光 (Side Scattering, SSC) : 细胞颗粒度 (复杂度)

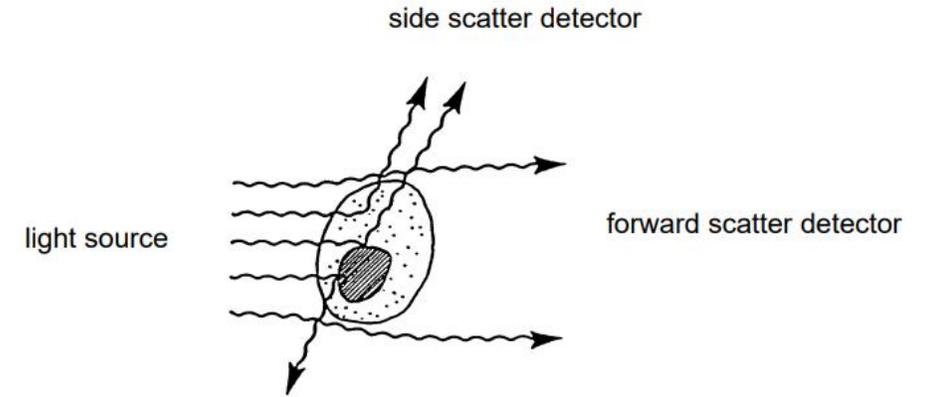
- 光强取决于参与散射的颗粒数

- 细胞复杂度越高， 侧向散射光越强

(4) 影响散射光信号强度

- 细胞膜结构的变化: refractive index差异的变化

- 细胞对光的吸收



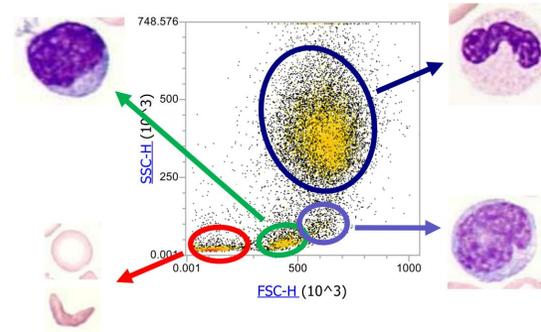
Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide
From Becton Dickinson

流式细胞术中的光信号： 散射光和荧光

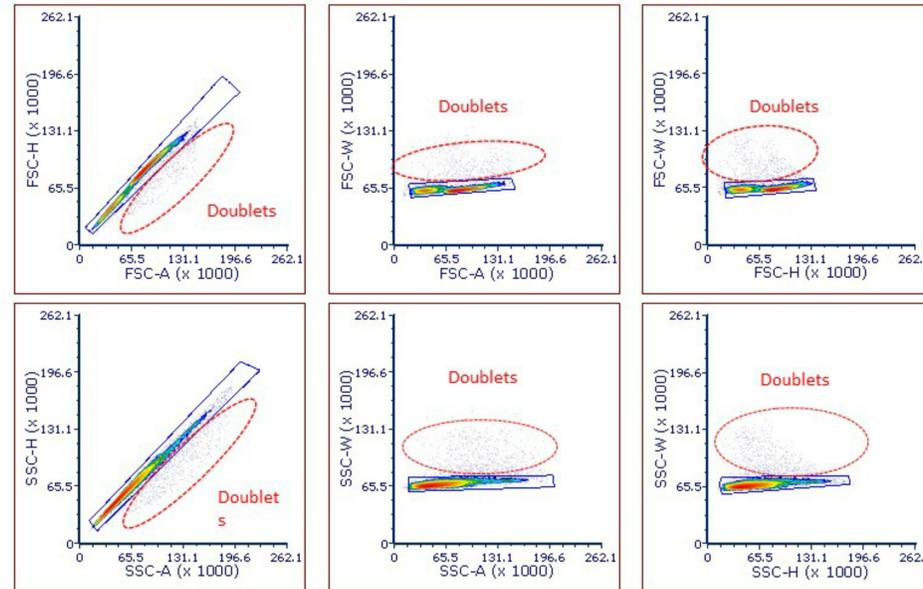
- 散射光信号

- (5) FSC和SSC在流式分析中的作用

- FSC-SSC散点图： 利用细胞大小和颗粒度初步区分细胞群
 - FSC-SSC散点图： 去除细胞碎片
 - 去除粘连细胞： FSC (A) -FSC (H), FSC (H) -FSC (W), FSC (A) -FSC (W), SSC (A) -SSC (H), SSC (H) -SSC (W), SSC (A) -SSC (W), 任一组合区分粘连细胞



裂红后的血液样本



去除粘连细胞

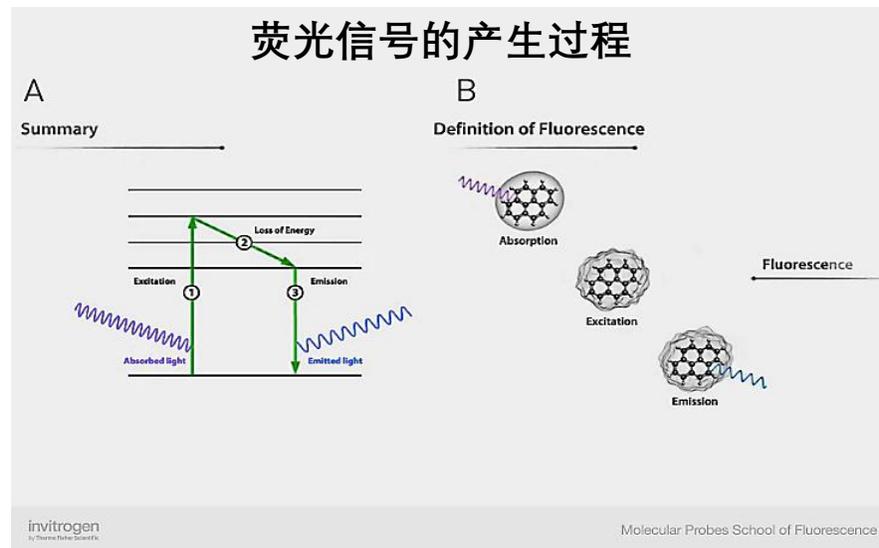
流式细胞术中的光信号：散射光和荧光

• 荧光信号

(1) 荧光信号的产生：荧光的产生是由基态的荧光素分子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

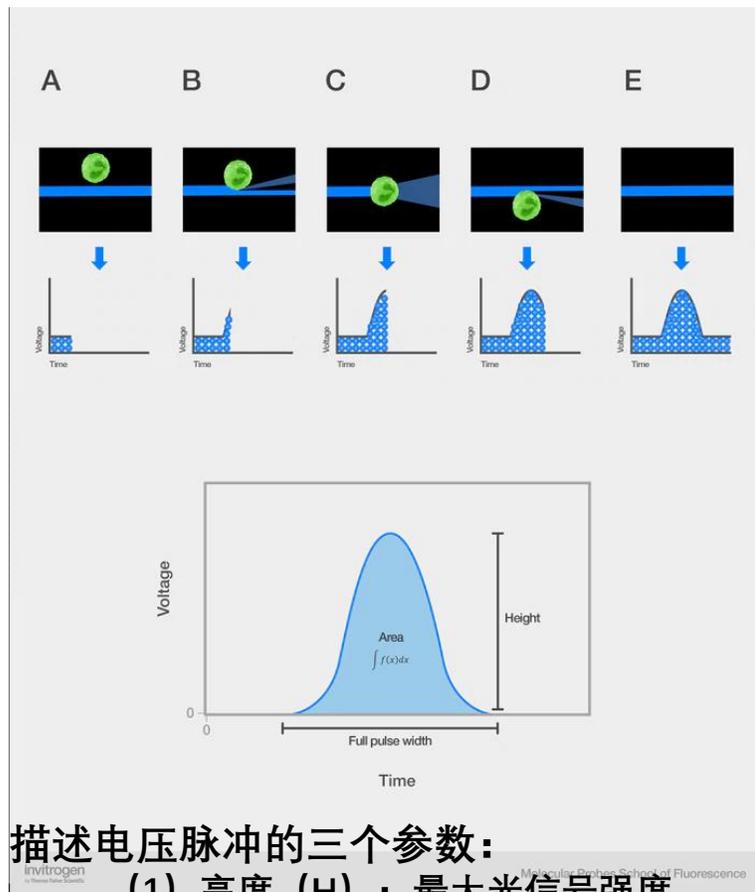
(2) 荧光信号来源

- 自发荧光：通常较弱
 - 最常见的NADPH和核黄素等
- 自带荧光：水生生物，转染了GFP质粒等
- 荧光标签：高特异性
 - 和荧光素结合的高特异性抗体
 - 和细胞成分结合的荧光素分子：核酸染料等



<https://www.thermofisher.com>

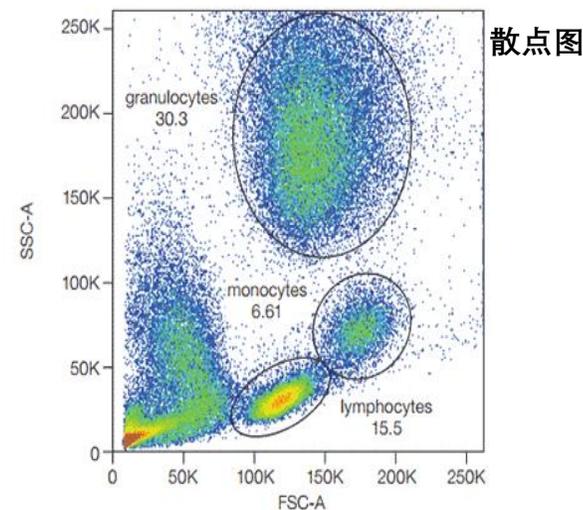
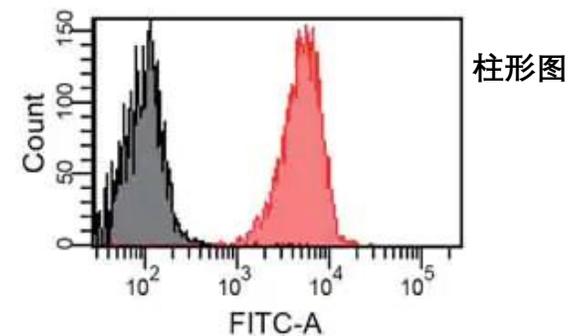
流式数据的生成



描述电压脉冲的三个参数：

- (1) 高度 (H) : 最大光信号强度
- (2) 宽度 (W) : 细胞与激光相互作用的时间
- (3) 面积 (A) : 细胞总体光信号强度
- (4) 去除粘连细胞

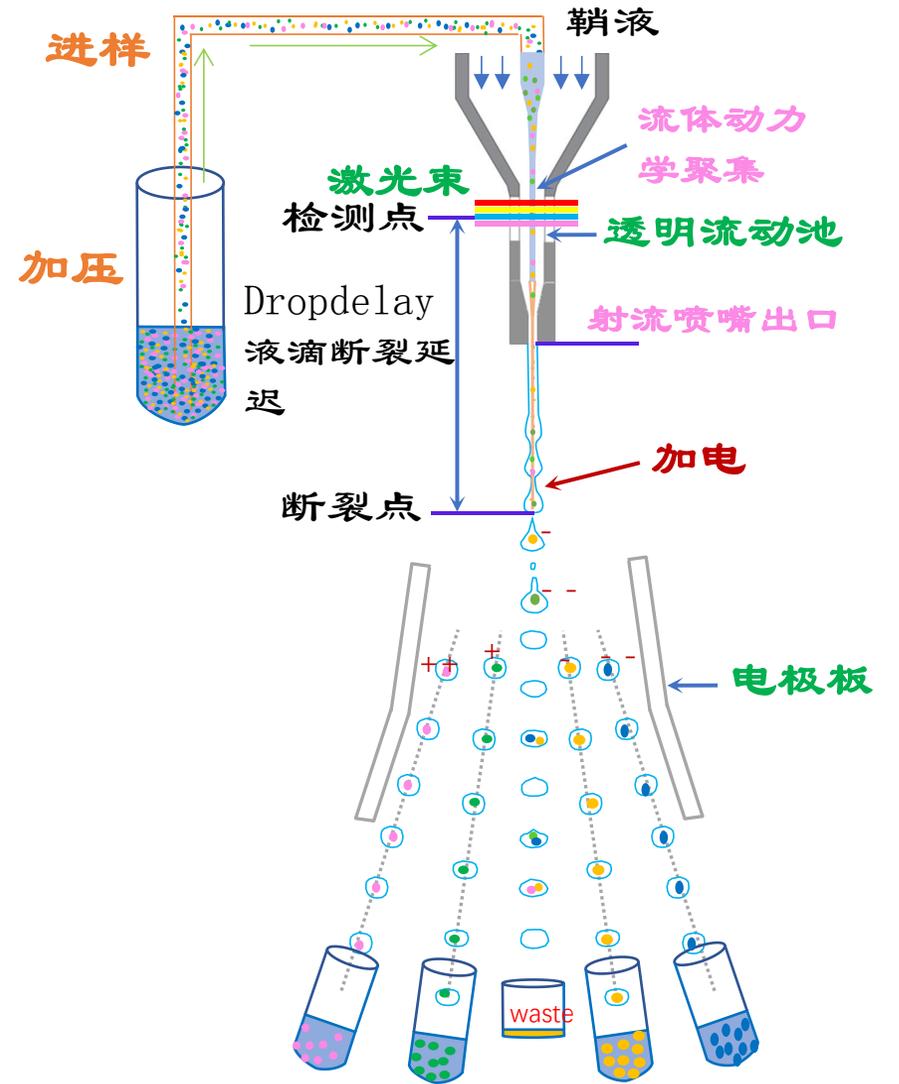
Cell#	FSC-A	SSC-A	FITC-A
1	300	280	100
2	250	300	250
3	320	200	1000
4	400	350	4000
5	300	320	1000
6	290	330	8000
7	330	350	8000
↓	↓	↓	↓



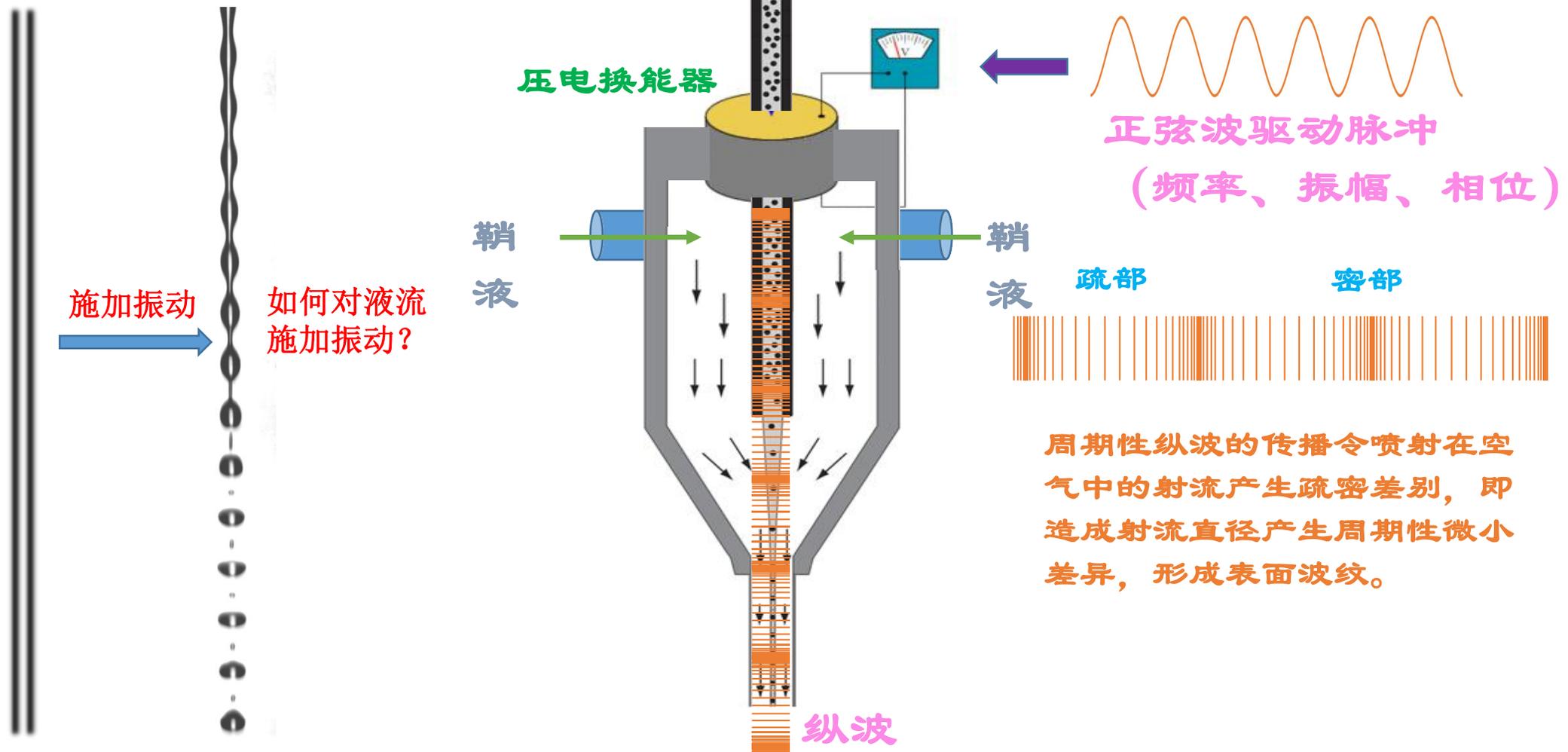
流式分析原理的深入介绍，如仪器结构功能、荧光补偿、实验对照等，请参考流式细胞术原理培训资料

2、流式细胞分选原理

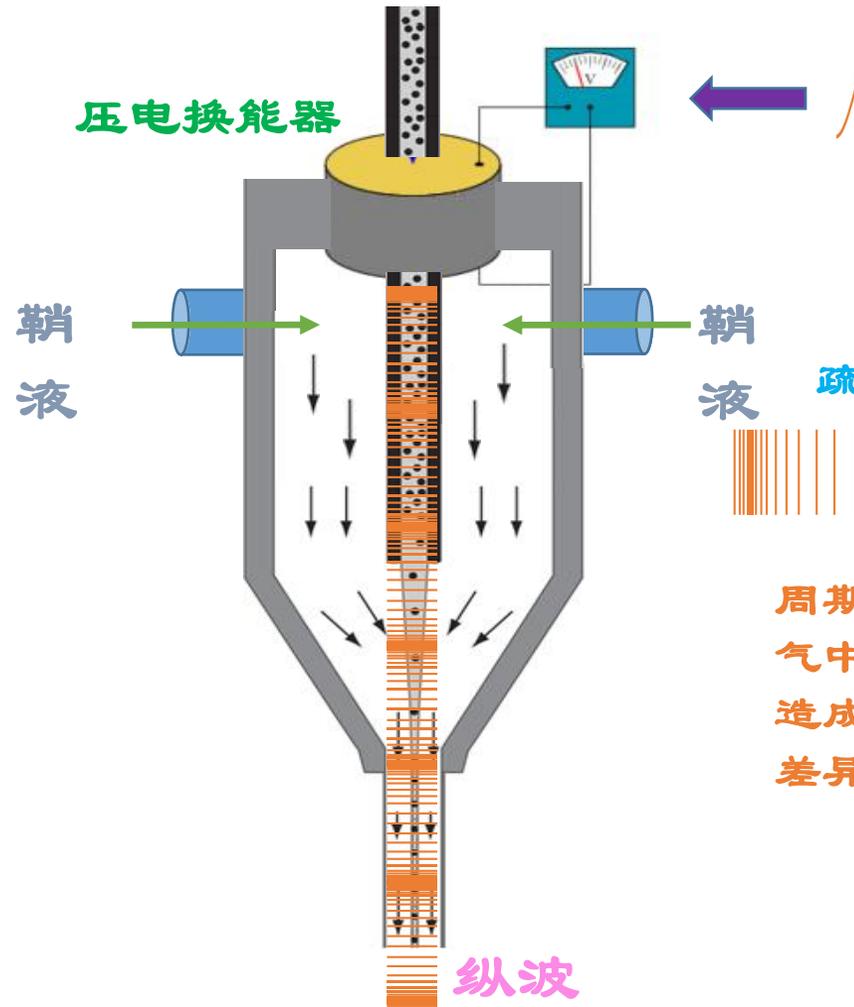
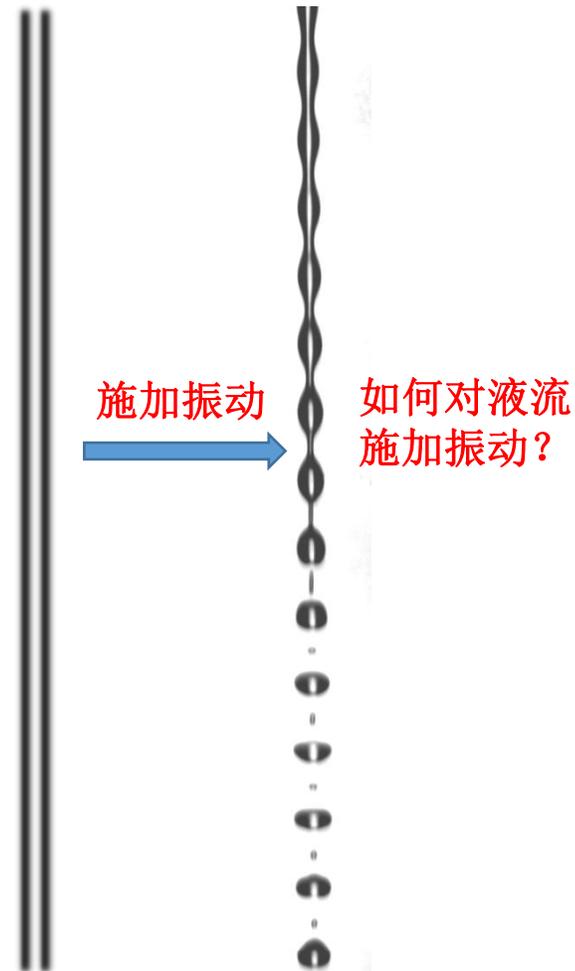
- 传统流式分选：分选的是**液滴**！
- 加电分选：
 - (1) 第一步：液滴形成
 - (2) 第二步：目标液滴加电
 - (3) 第三步：电场偏转



流式细胞分选原理-液滴的形成



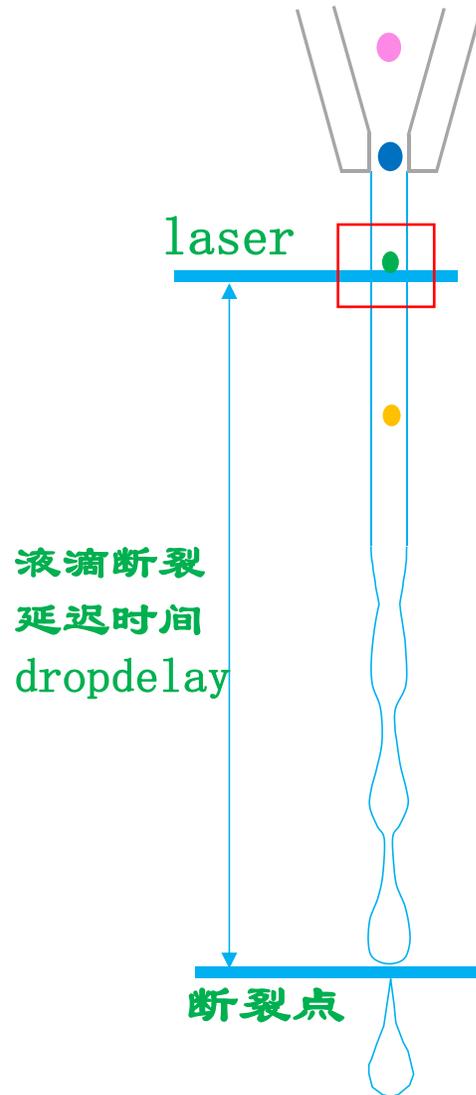
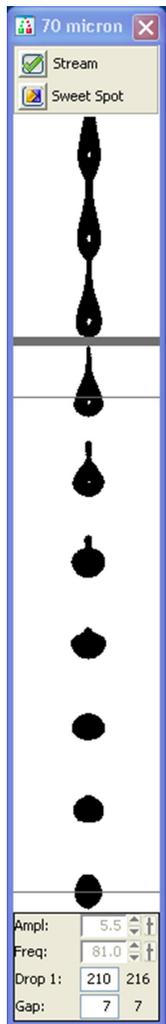
流式细胞分选原理-液滴的形成



- 对于给定直径和速度的射流，存在一个频率范围，使液滴的形成方式规律可控。
- 自然频率范围内的振动脉冲，其频率 (freq) 唯一决定液滴间隔，其振幅 (ampl) 是控制射流断裂位置。

周期性纵波的传播令喷射在空气中的射流产生疏密差别，即造成射流直径产生周期性微小差异，形成表面波纹。

流式细胞分选原理-目标液滴加电

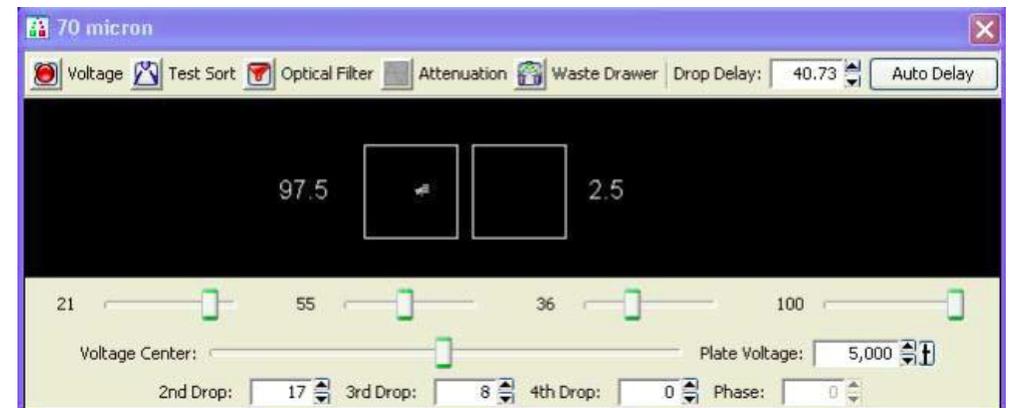


当液流从喷嘴射出后，经过高频振荡（ f ， λ 已知），形成稳定的液滴，即液流的断点维持在一个固定的位置。此时，检测点和液流断点之间的距离（ d ）维持不变，Drop Delay值即可恒定。保证目标液滴充电，保证高纯度和高得率。

$$\text{Dropdelay} = d / \lambda$$

Dropdelay 是流式分选中最重要参数

BD AccuDrop微球“试”出最佳延迟时间



图片来源：刘春春，清华大学蛋白质研究技术中心

三、影响分选结果的因素

1、衡量分选结果的指标

- **纯度**：目标细胞占分选后细胞的比例
- **效率**（efficiency）：分选的目标细胞占检测的目标细胞的比例
 - **得率**（recovery rate）：收集的目标细胞占检测的目标细胞的比例
- **细胞活率**：分选的目标细胞中活下来的细胞比例
- **分选速度**：
 - **分选纯度、效率和速度不可能同时达到最优，需要根据实验目的进行取舍。**
 - **细胞活率主要由样本状态决定，喷嘴尺寸的选择也有很大影响。**
 - **稳定的液流是一切分选的前提！**

2、分选纯度及其影响因素

- 稳定的液流和准确的drop delay值

- 纯度模式的选择：

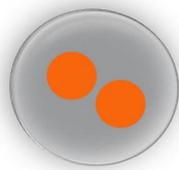
- BD FACS Aria 中，纯度从低到高依次为 yield（富集），purity，4-way purity，single cell

纯度要求越高，目标细胞被丢弃的比例越高。分选得率越低



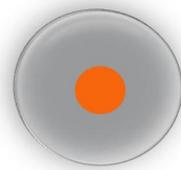
富集模式

通常用于分选低比例细胞，保证得到足够数量的目的细胞，但是纯度会降低



纯度模式

最常用的模式，一个液滴里只有目的细胞，且没有非目的细胞，而且离这个目的细胞前后一定范围（可以设定）没有目标细胞，它才被分选



单细胞模式

目的细胞必须位于液滴中间位置，前后液滴没有其他细胞才会被分选，一般用于多孔板单克隆分选

3、分选得率及其影响因素

- **稳定的液流和准确的drop delay值**
- 得率一般与纯度无法同时达到最优，纯度提高，得率降低
- 减少冲突事件（conflict events），在一定范围内可以在不降低纯度的基础上提高得率
 - 较小的喷嘴形成较小的液滴，降低目标细胞和非目标细胞包裹在一个液滴内的可能性，从而提高得率。**但小喷嘴会降低细胞活率**
 - 较低的上样速度

4、分选速度及其影响因素

- 分选速度与振荡频率（液滴生成频率）

 - 振荡频率越快，分选速度越快

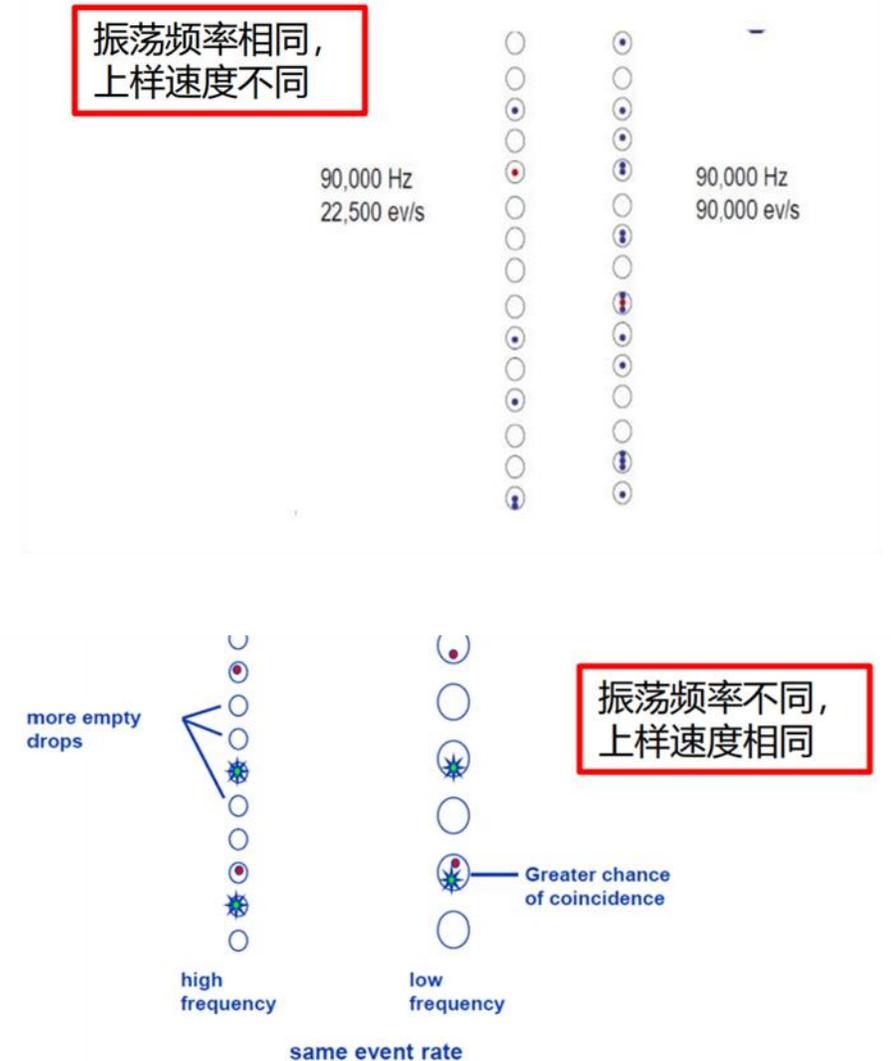
震荡频率由喷嘴尺寸决定。震荡频率越高，喷嘴尺寸越小，鞘液压力越大，细胞活率会降低！

- 分选速度与上样速度

 - 在一定范围内，上样速度越快，分选速度越快

 - 最优上样速度：震荡频率 $f / (3\sim4)$

高于最优上样速度，分选效率会降低！



5、细胞活率及其影响因素

- 分选前细胞的状态（最重要的因素）
 - 尽量温和的制备单细胞悬液
 - 使用死活染料在分选过程中去除死细胞：建议使用核酸染料，可以实时动态检测死细胞比例
- 分选中：
 - 喷嘴的选择：喷嘴越小，鞘液压力越大，细胞运动速度越快，活率越低

Cell Type	Average Volume (μm^3)	Average Diameter (μm)	Recommend Nozzle Size (μm)
sperm cell	30	3.86	70
red blood cell	100	5.76	70
lymphocyte	130	6.29	70
neutrophil	300	8.31	70
fibroblast	2000	15.63	85
HeLa cell	3000	17.89	100
osteoblast	4000	19.69	130

基本原则：细胞直径最好不要超过喷嘴尺寸的1/5，至多1/3。

5、细胞活率及其影响因素

- 分选前细胞的状态（最重要的因素）
 - 尽量温和的制备单细胞悬液
 - 使用死活染料在分选过程中去除死细胞：建议使用核酸染料，可以实时动态检测死细胞比例
- 分选中：
 - 喷嘴的选择：喷嘴越小，鞘液压力越大，细胞运动速度越快，活率越低
 - 合适的偏转电压，让液滴落在接收管液面上而非管壁上
 - 接收管包被：含有BSA或者FBS的buffer 4C过夜
 - 分选时间尽量短，保证合适的温度

四、实验准备

1、样本准备

- 荧光配色，各种对照的准备，荧光补偿计算，圈门与流式分析一致。具体可参见流式细胞原理培训资料
- 待分选样本需制成单细胞悬液：
 - $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cells/ml，上样前200目过滤
 - ✓ 建议高细胞浓度，低上样速度
 - 推荐重悬液：DPBS/HBSS + HEPES (10-25mM) + 2%BSA/FBS
 - 重悬液中可适当添加EDTA (1-5mM) 和/或DNAase (20-200ug/mL) 以防止聚集成团
 - 使用核酸死活染料 (PI, 7-AAD等) 实时检测分选细胞的死活状态
 - 尽量降低分选时间
 - ✓ 大量细胞分选时，可制备一批，分选一批，及时处理分选后细胞

2、鞘液及接收管准备

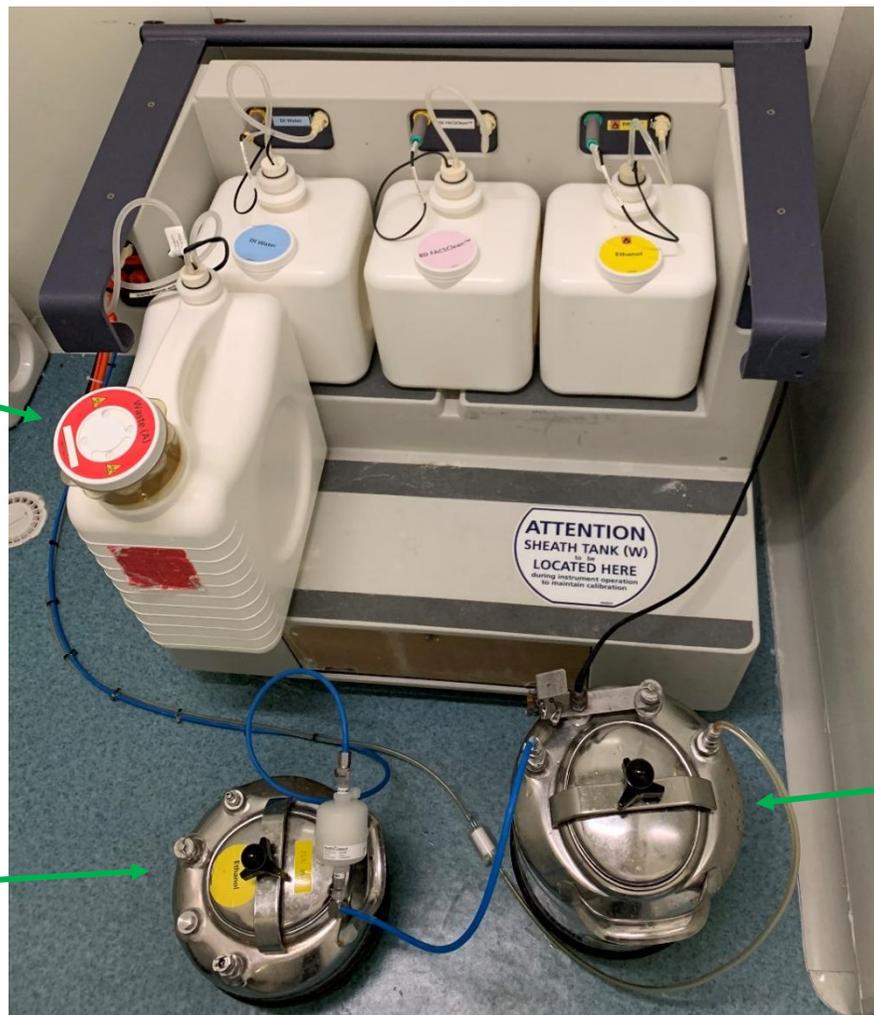
- 鞘液：1X PBS，过滤（0.22um）+灭菌
- 接收液：DPBS/HBSS + HEPES（10-25mM）+ 高浓度血清（也可以直接用纯血清作为接收液）+ 抗生素（细菌+真菌）
 - 高浓度血清有利保持细胞活性，但可能会改变细胞形态，并产生许多非细胞颗粒
 - 非培养的分选，接收液可按实际需要选择，如细胞裂解液等
- 较长时间分选，应及时混匀接收管溶液。接收到的细胞应尽快培养、处理。

五、BD FACSAria III仪器结构和操作

1、仪器结构-液流车

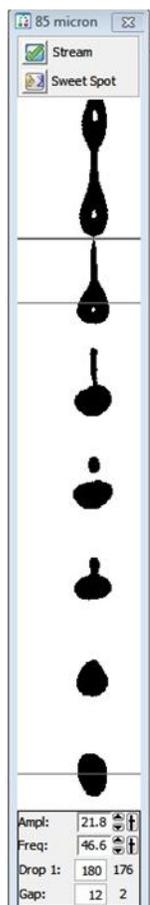
清空废液桶后加入
150~200mL84消毒液

酒精桶，内装75%
乙醇溶液，用于执行
shutdown程序，
为液流管路灭菌

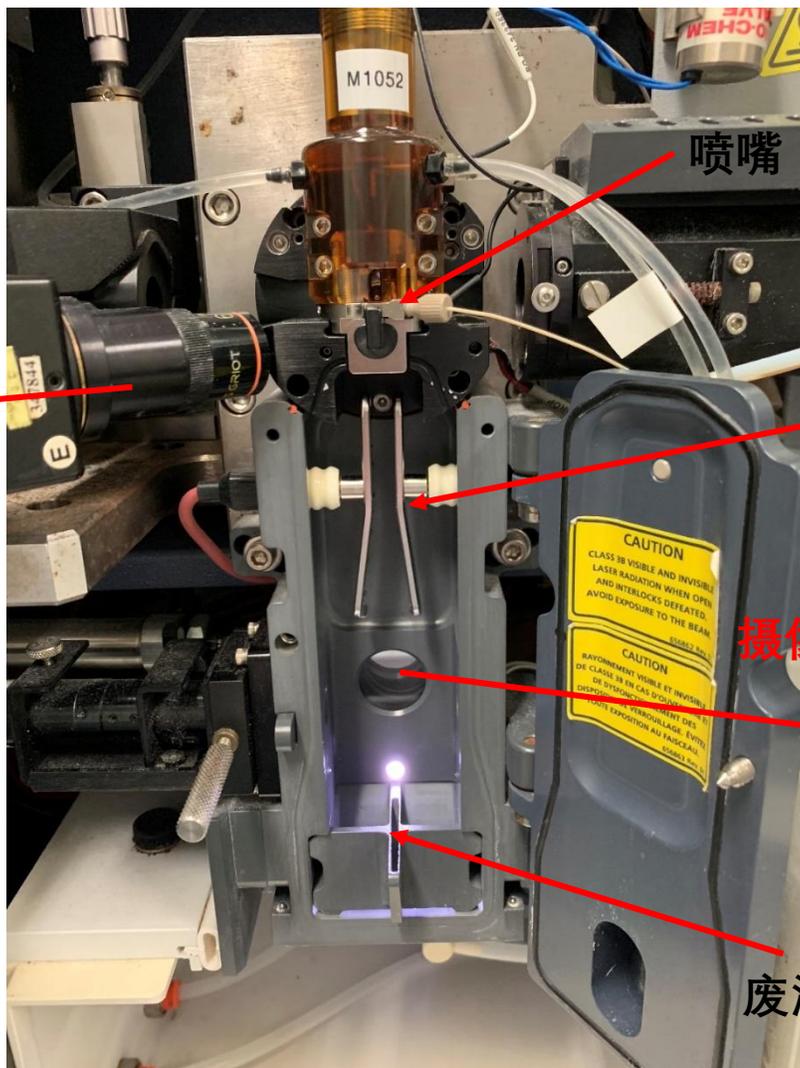


鞘液桶，内装灭菌过滤
的1X PBS。需要注意，
鞘液装入鞘液桶时必须
凉至室温。

1、仪器结构-分选模块



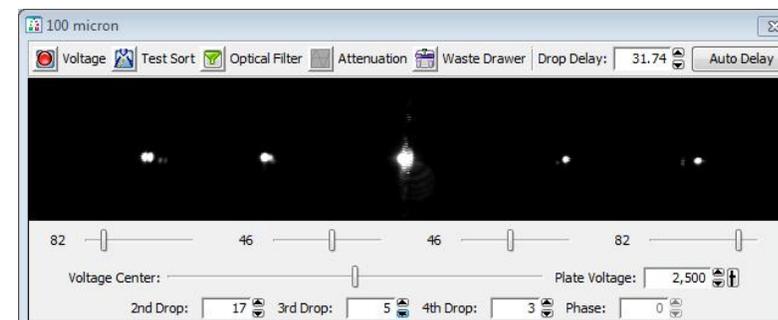
摄像头1



电极板

摄像头2

废液槽



2、软件界面

The screenshot displays the BD FACSDiva software interface with several key components highlighted by red boxes and annotated with Chinese text:

- Browser, 实验管理 (Browser, Experiment Management):** Located on the left side, showing a hierarchical tree view of folders and experiments.
- Cytometer, 参数设置 (Cytometer, Parameter Settings):** A central panel showing a table of parameters for the Cytometer. The table includes columns for Parameter, Voltage, Log, A, H, and W.
- Worksheet, 实验结果展示 (Worksheet, Experiment Results Display):** A large central area displaying a flow cytometry plot (Sheet1) with a histogram showing 'Count' vs 'FSC-A'. The plot is titled 'Specimen_001-Tube_001'.
- Acquisition dashboard, 实验操作控制面板 (Acquisition Dashboard, Experiment Operation Control Panel):** A panel below the Cytometer settings, showing acquisition status, elapsed time, and various control buttons like 'Record' and 'Restart'.
- 侧液流窗口, 调节侧液流偏转角度, dropdelay确定等 (Side Flow Window, Adjust Side Flow Deflection Angle, Drop Delay Confirmation, etc.):** A panel at the bottom left showing various flow parameters and controls.
- Sort Layout, 分选设置 (Sort Layout, Sorting Settings):** A panel at the bottom right showing sorting parameters for 'Tube_001: Sort Layout_012', including 'Sort Rate', 'Confl. Cnt.', and 'Efficiency'.
- 断点窗口 (Breakpoint Window):** A vertical panel on the far right showing a series of droplet images and a 'Sweet Spot' indicator.

3、上机操作

3.1、选择合适的喷嘴并设置对于的鞘液流速和压力

不同细胞推荐的喷嘴尺寸

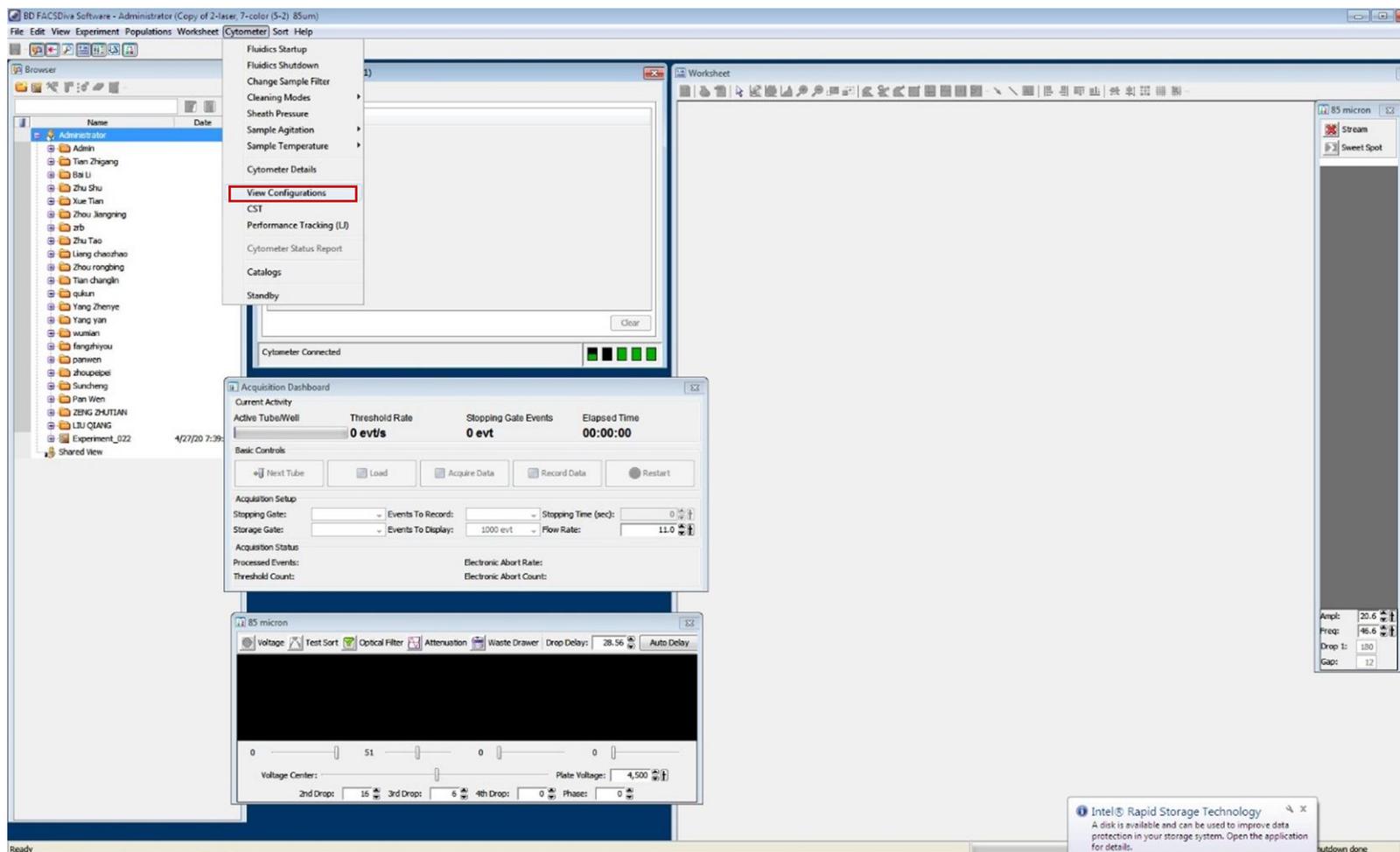
Cell Type	Average Volume (μm^3)	Average Diameter (μm)	Recommend Nozzle Size (μm)
sperm cell	30	3.86	70
red blood cell	100	5.76	70
lymphocyte	130	6.29	70
neutrophil	300	8.31	70
fibroblast	2000	15.63	85
HeLa cell	3000	17.89	100
osteoblast	4000	19.69	130

Setting	70 micron	85 micron	100 micron	130 micron
Sheath Pressure	70	45	20	10
Amplitude	60	32	12	24
Frequency kHz	87	47	30	12

不同尺寸喷嘴对应的鞘液压力，固有频率和推荐振幅。建议调节液流时从固有频率开始，不要偏离太多。振幅只是参考，可能与实际值差别较大。

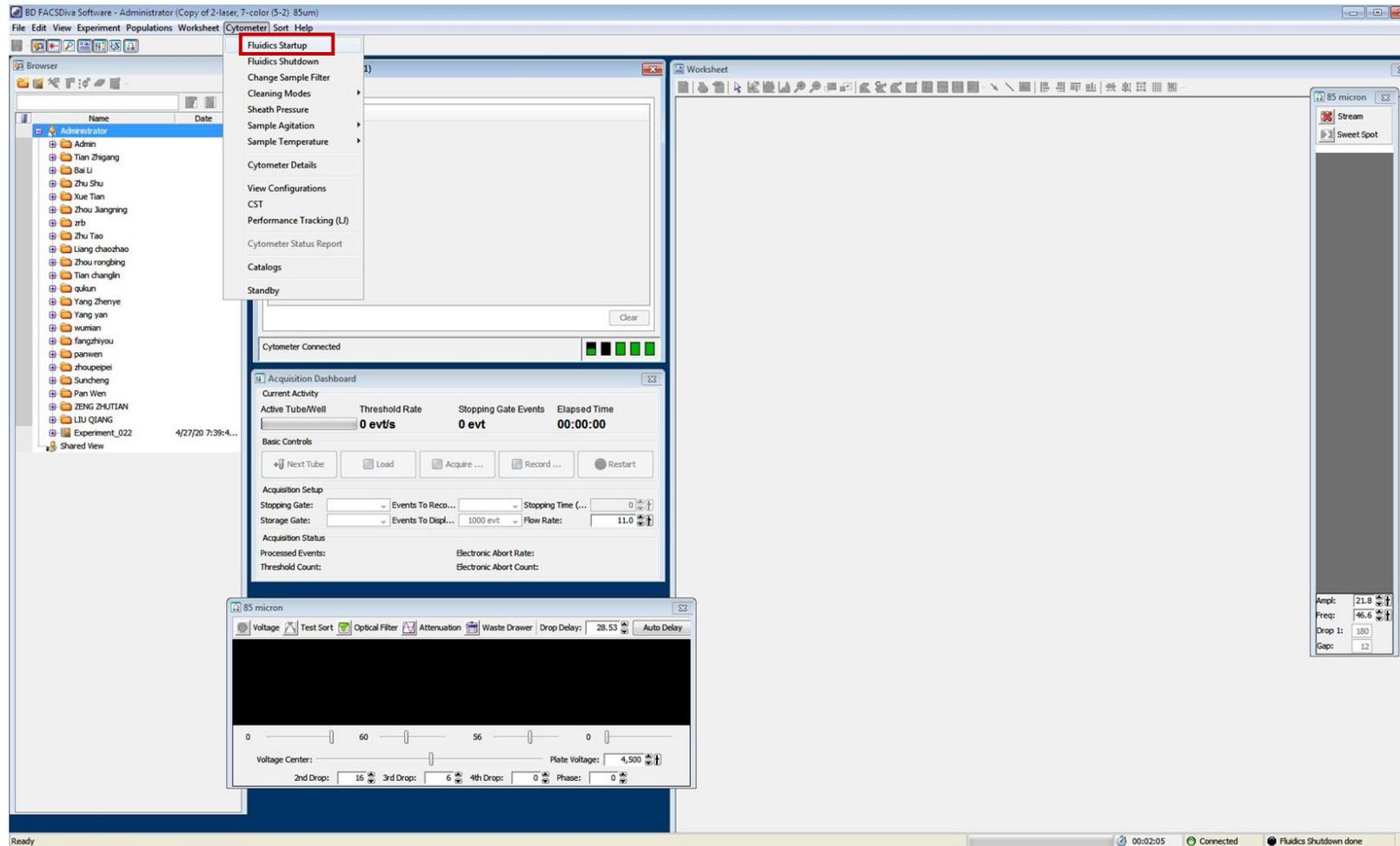
3、上机操作

3.1、选择合适的喷嘴并设置对于的鞘液流速和压力



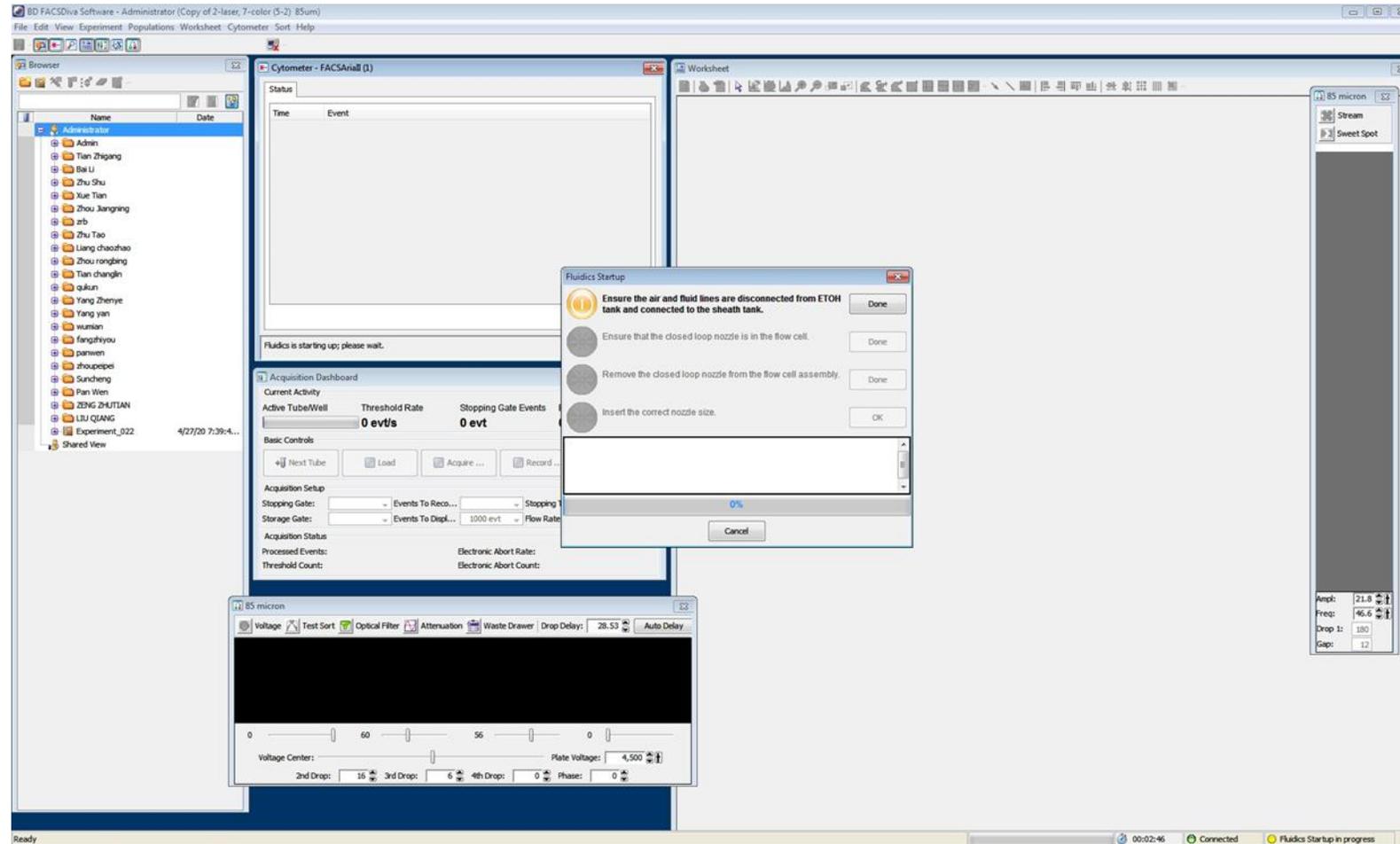
3、上机操作

3.2、开机流程 (start up, 新鲜的鞘液替换管路中原有的液体, 排除气泡)



3、上机操作

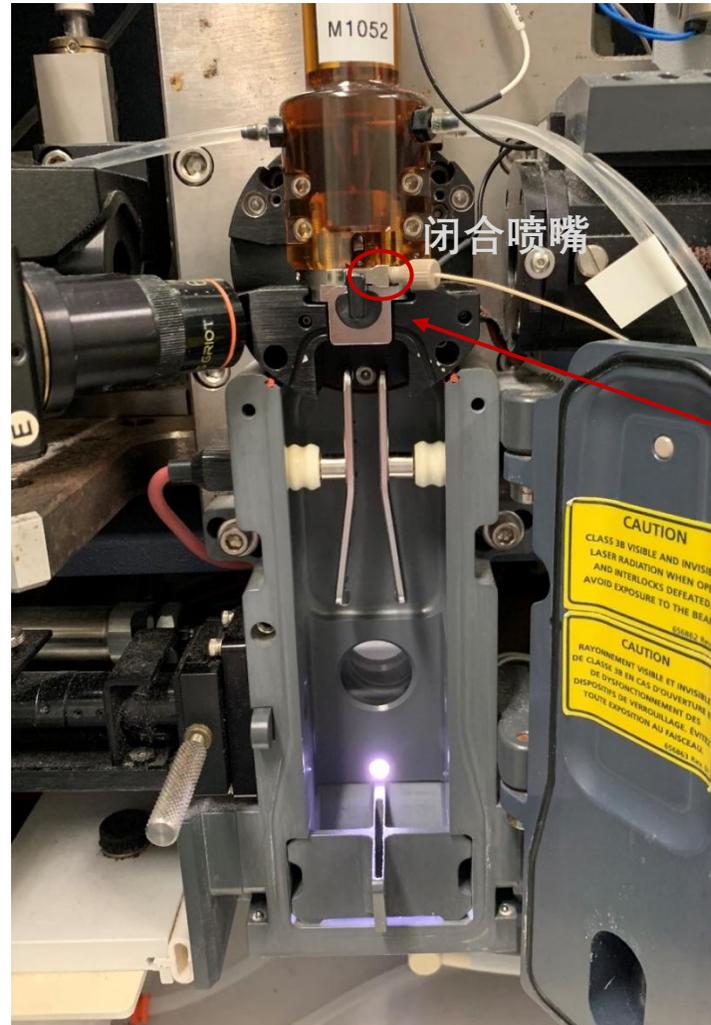
3.2、开机流程 (start up, 新鲜的鞘液替换管路中原有的液体, 排除气泡)



3、上机操作

3.3、插入喷嘴，打开液流

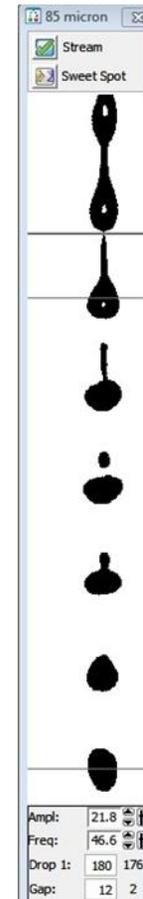
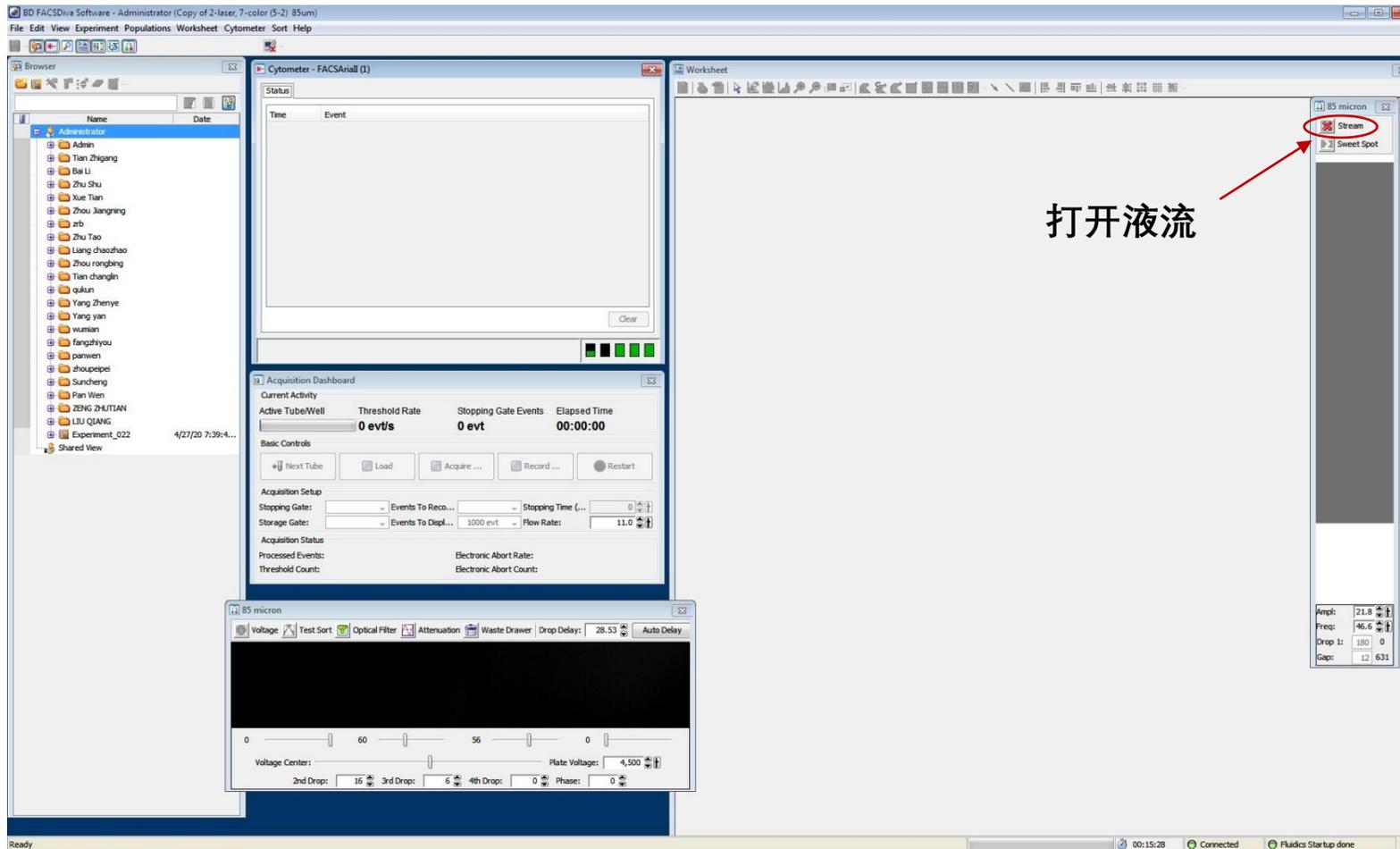
1. 超声分选喷嘴10秒钟，并擦干
2. 取出闭合喷嘴
3. 擦干喷嘴放置位置以及分选舱
4. 插入分选喷嘴



分选喷嘴

3、上机操作

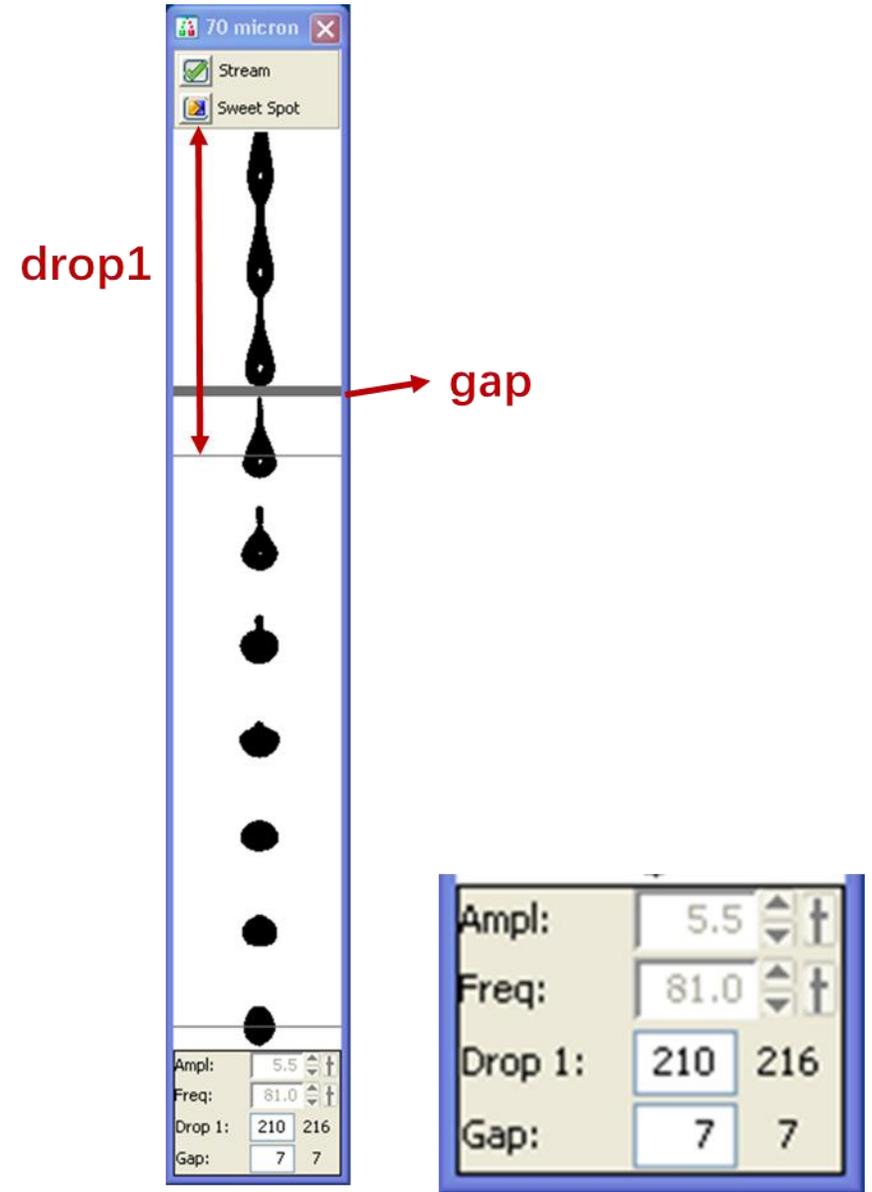
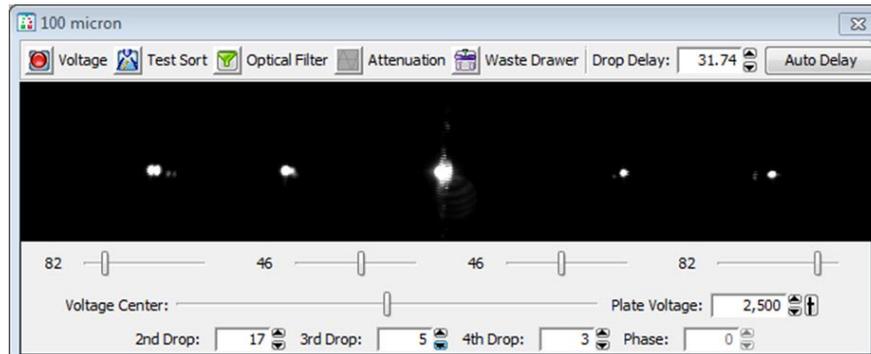
3.3、插入喷嘴，打开液流



3、上机操作

3.4、调节液流参数

- 不同尺寸喷嘴有相应的推荐频率。建议调节液流时从推荐频率 (Freq) 开始，不要偏离太多。
- 调节振幅 (Ampl) 让drop1与gap的测量值与框内值尽量接近
- 液流调好的标准是
 - Drop1和gap值没有大的波动，尤其是gap值，波动不能超过2
 - 卫星液滴视野内融合
 - 打开分液，能观察到4个清晰的分液



断点窗口

3、上机操作

3.5、测量drop delay（手动）

- 手动确认dropdelay一般用于仪器状态稳定，调节液流后的drop1和gap值与前次使用差别不大的情况
- 打开accudrop实验模板，上accudrop微球，调节流速置合适的范围（仪器旁的使用说明）。
- 打开sort layout窗口，纯度模式选择fine tune，点击 sort，选择cancel。手动在侧液流窗口打开电压和optical filter。调节左一电压让分选的微球落入框内，微调accudrop值，使左一框数值不低于98%即可。

3、上机操作

3.5、测量drop delay (手动)

The screenshot displays the BD FACSDiva software interface with several key components:

- Browser - Accudrop Drop Delay:** A tree view on the left showing the experimental setup hierarchy. The 'Accudrop Drop Delay' folder is highlighted with a red box.
- Cytometer - FACSArial (1):** A central panel showing acquisition parameters. The 'Parameters' tab is active, displaying a table of settings:

Parameter	Voltage	Log	A	H	W
FSC	200	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
SSC	300	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
FITC	500	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

- Acquisition Dashboard:** A floating window showing real-time acquisition data for 'Tube_001':
 - Current Activity: Tube_001
 - Threshold Rate: 1292 evt/s
 - Stopping Gate Events: 0 evt
 - Elapsed Time: 00:01:55
- 85 micron:** A floating window for the nozzle. The 'Optical Filter' is highlighted with a red box. It shows a scale from 74 to 78 with a red box around the value 28. Other parameters include Voltage Center (4,500), Plate Voltage (4,500), and Drop Delay (28.26).
- Tube_001: Sort Layout_001:** A floating window for the sort layout. The 'Precision' dropdown is highlighted with a red box and set to 'Fine Tune'. It shows a sort rate of 1292 evt/s and various performance metrics.
- Normal Worksheet - Sheet1:** A plot window showing a histogram of 'Specimen_001-Tube_001' with a peak labeled 'P1'.

3、上机操作

3.5、测量drop delay（自动）

- 自动确认dropdelay一般用于仪器状态变化较大，或是某个喷嘴设置长时间未使用过，调节液流后的drop1和gap值与前次使用差别较大的情况
- 打开accudrop实验模板，上accudrop微球，调节流速置合适的范围（仪器旁的使用说明）。
- 打开sort layout窗口，纯度模式选择initial，点击 sort，选择cancel。手动在侧液流窗口打开电压和optical filter。调节左一电压让分选的微球落入框内，点击auto delay。
- 当上一进程结束后，将纯度模式改为fine tune，再次点击auto delay。

3、上机操作

3.5、测量drop delay (自动)

The screenshot displays the BD FACSDiva software interface with several key components:

- Browser - Accudrop Drop Delay:** A tree view on the left showing a folder structure. The 'Accudrop Drop Delay' folder is highlighted with a red box.
- Cytometer - FACSArial (1):** A table showing parameters for the instrument. The 'Parameters' tab is active, displaying a table with columns for Parameter, Voltage, Log, A, H, and W.
- Normal Worksheet - Sheet1:** A plot titled 'Specimen_001-Tube_001' showing a histogram of 'Count' vs 'FSC-A (x 1,000)'. A gate labeled 'P1' is visible.
- Acquisition Dashboard:** A central panel showing 'Current Activity' with 'Active Tube/Well' set to 'Tube_001', 'Threshold Rate' at '1292 evt/s', 'Stopping Gate Events' at '0 evt', and 'Elapsed Time' at '00:01:55'. It includes 'Basic Controls' (Next Tube, Unload, Stop Acquir..., Record Data, Restart) and 'Acquisition Setup' (Stopping Gate, Storage Gate, Events To Record, Events To Display, Stopping Time, Flow Rate).
- 85 micron:** A control panel at the bottom showing 'Drop Delay' set to '28.26' with an 'Auto Delay' button highlighted in red. It also displays 'Voltage Center' and 'Plate Voltage'.
- Tube_001: Sort Layout_001:** A panel on the right showing 'Sort Rate' at '1292 evt/s' and 'Efficiency' at '100%'. It includes 'Sort', 'Pause', and 'View Counters' buttons.

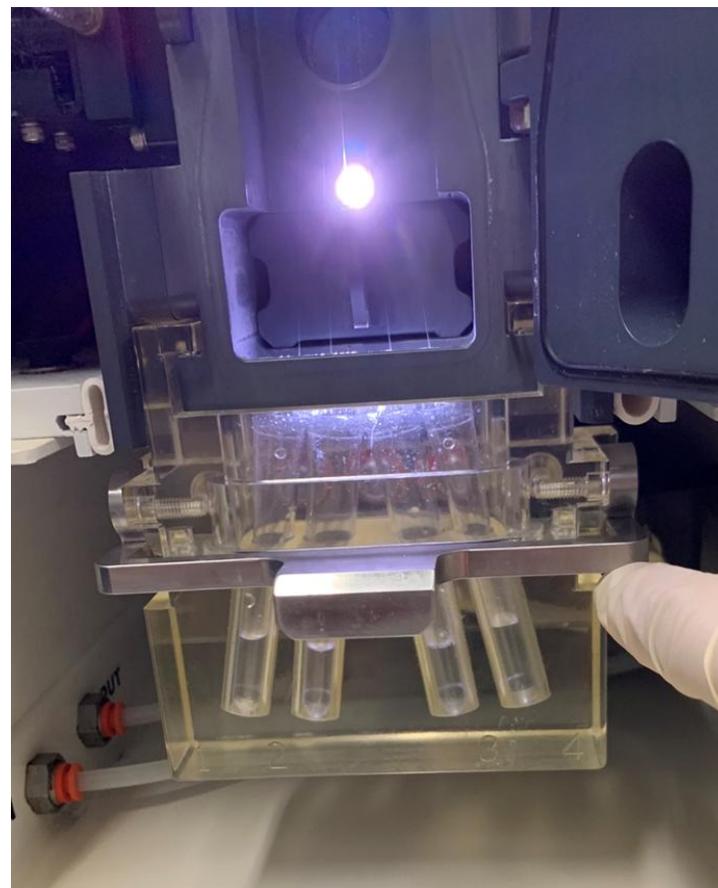
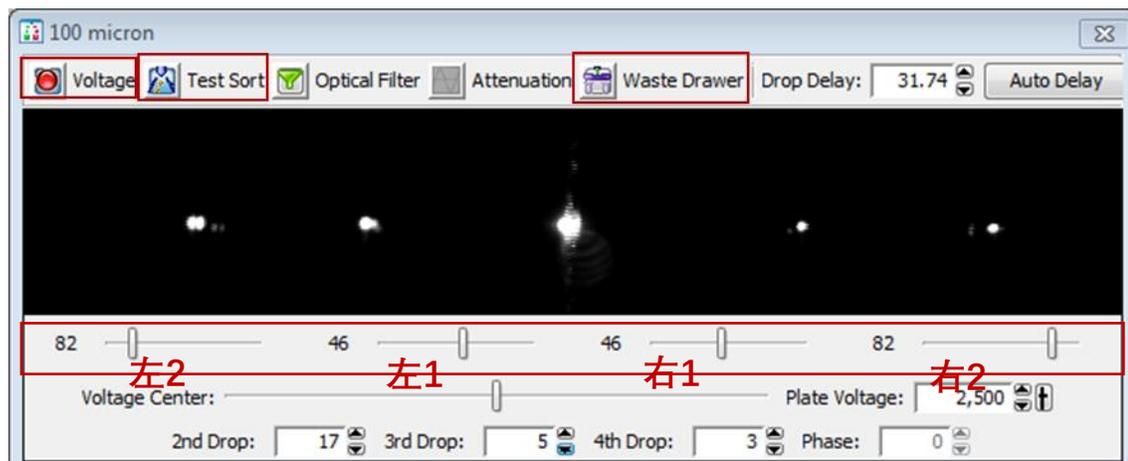
Parameter	Voltage	Log	A	H	W
FSC	200	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
SSC	300	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
FITC	500	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Sort Rate	Conf. Cnt	Conf. Rate	Efficiency
1292 evt/s	0 evt	0 evt/s	100%

3、上机操作

3.6、调节侧液流偏转角度：

- Test sort模式下，调节4路电压，使得侧液流正好落到接收管液面上。



3、上机操作

3.7、分选设置

- 根据接收模块选择device
- 根据实验需求选择纯度（precision）、所需要分选的细胞数（可选）
- 确定每路各自分选的细胞所对应的门

Global Sheet1: Sort Layout_001

Device: 2 Tube Precision: Purity Target Events: Continuous Save Sort Reports: Ask User Save Conflicts: Index Sorting:

	Left	Right
Sort Rate:	NA	13 evt/s
Confl.Cnt:	NA	13876 evt
Confl. Rate:	NA	5 evt/s
Efficiency:	NA	71%

Buttons: Sort, Resume, View Counters

3、上机操作

3.8、上样本，开始分选

- 装好接收管，点击“Acquire Data”获取数据，点击分选面板的“Sort”，弹出的窗口点击OK，开始分选
- 如果要换接收管，点击“Stop acquiring”，稍后点击“Acquire Data”—“Resume”继续分选（Resume 累计计数）
- 如果要换上样管，点击“unload”，稍后点击“load”—“Sort”或“Resume”继续分选（Sort 重新计数）

3、上机操作

3.8、关机

- 分别高速（流速设为12）上10%clean液、DI water各10分钟，清洗进样管道
- 关闭液流，将喷嘴取下来，换上闭合喷嘴，超声分选喷嘴10秒钟。擦干喷嘴，放进盒子里。
- 关闭软件，关电脑。
- 关闭激光器，关闭电源。

4、注意事项

- **关于无菌分选：** 需要分细胞打鼠的用户，务必在分选前提前和我们确认仪器目前的无菌状况。分选的细胞需要培养的，也尽量提前和我们联系。分选时请自备无菌枪头，无菌滤膜（200目），无菌接收管，无菌接收液或PBS（以防到时候需要稀释样品、重新过滤样品或者增加接收管）。接收液中需要加入至少双倍的抗生素（细菌和真菌）。
- **样品浓度：** 样品浓度不要太稀。流式分选建议高浓度低速上样（样品体积太大，分选很慢，加大流速会影响液流的稳定性以及信号的分辨率）。做孔板分选，细胞浓度则稀一些比较好，如 10^6 cells/ml。
- **样品得率：** 由于细胞偏转可能会有一小部分细胞不能很好地打入接收液面以及后期细胞离心的损失，所以最后获得的细胞很有可能只有仪器显示的百分之八十。这是正常的。
- **样品回测：** 没有特殊情况（获得的细胞极少），分选得到的细胞最好都做一下回测以确定目标细胞群。
- **数据拷贝：** 务必用格式化的U盘

关于上机培训

- 要求每个实验室必须至少有一个人员可以独立上机操作（分选，加鞘液，关机等）。
- 仪器中心定期安排BD Aria分选流式集体上机培训（每月一次），不再提供单独培训。
- 分选培训必须在中心网站首页报名（分选房间需要控制参加人数）。
- 报名参加培训的用户在培训前满足以下条件：1. 正在或即将使用BD分选流式；2. 有分析流式使用经验；3. 完成中心网站分选流式PPT的理论学习。