

流式细胞术

--原理、仪器结构和实验流程

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19日

目录

平台仪器总览

一. 流式细胞术的基本原理

二. 分析型流式细胞仪的结构

三. 荧光素、荧光特性及荧光补偿

四. 实验流程

五. 应用

流式平台仪器总览

传统流式细胞仪

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 FACSAria III 3激光流式细胞分选仪
- BD FACSAria Fusion 5激光流式细胞分选仪（即将安装）

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

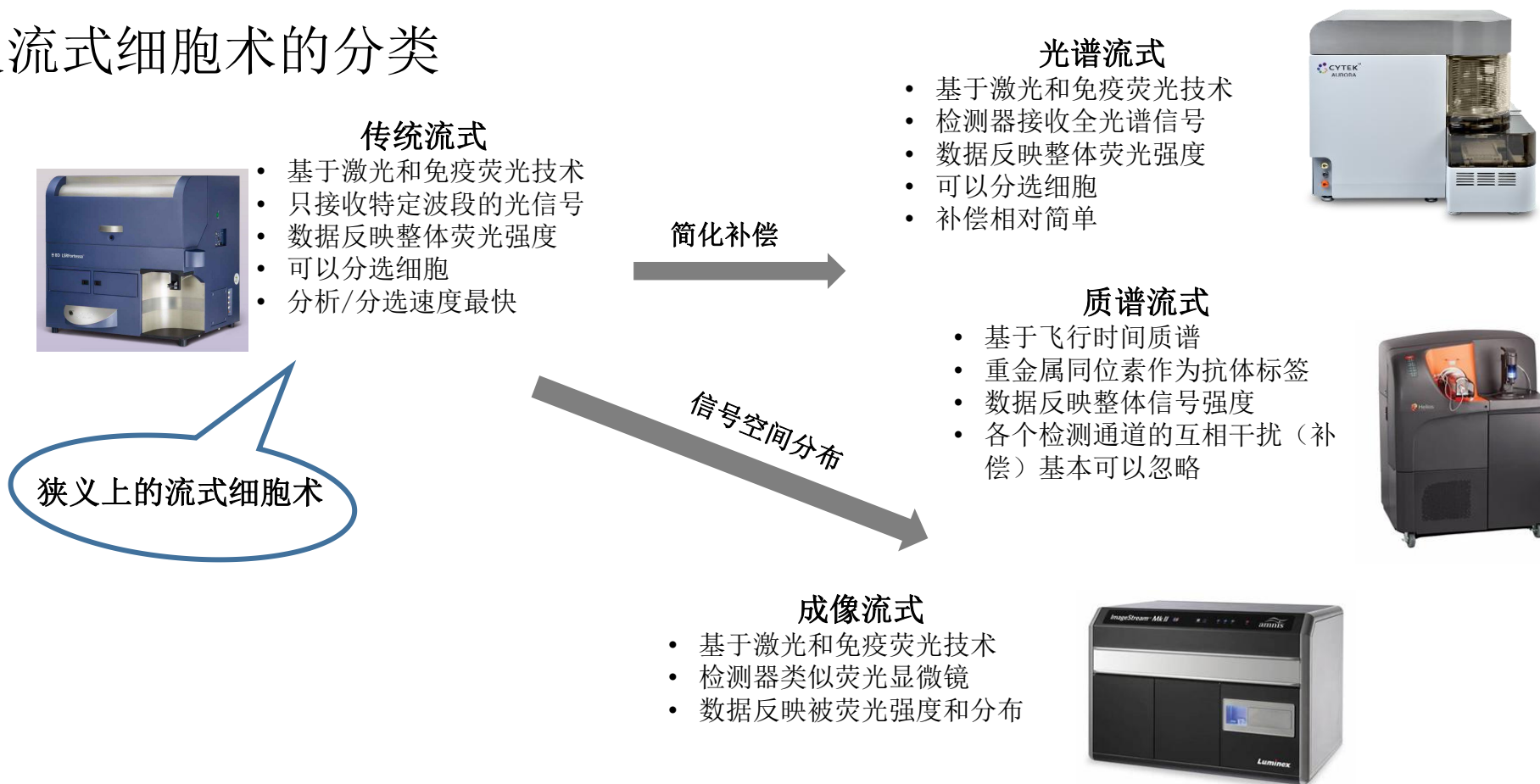
一、流式细胞术的基本原理

1.1 流式细胞术简介

1.1.1 什么是流式细胞术（Flow Cytometry, FCM）？

- 流式 + 细胞术：测量**流动**中的**细胞/颗粒**的（光信号）物理或化学性质的技术

1.1.2 广义流式细胞术的分类



1.1 流式细胞术简介

1.1.3 传统流式细胞仪：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**散射光**和**荧光**，从而得到各种特征参数的仪器

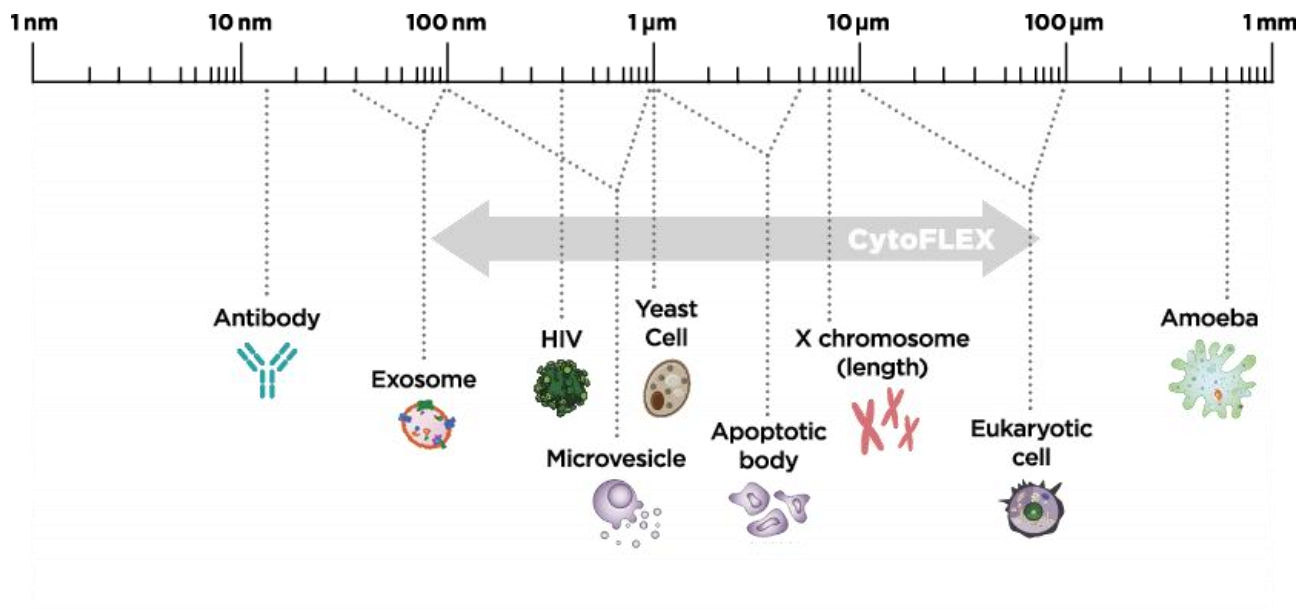
1.1.4 传统流式细胞术的特点

- 单细胞水平，多参数同时测量
- 检测速度快：高达上万个events每秒
- 可以定量分析
- 大数据提供统计学差异
- 可以对混合细胞进行分离纯化
- **局限性**：只能分析悬浮样本

1.1 流式细胞术简介

1.1.5 传统流式细胞仪能够分析和分选的样本

- 样本类型：能够处理成悬浮细胞/颗粒的样本
 - 外周血、骨髓、细胞穿刺液、实体组织、培养细胞、微生物、藻类、染色体、外泌体等
- 颗粒大小：100nm-100 μm



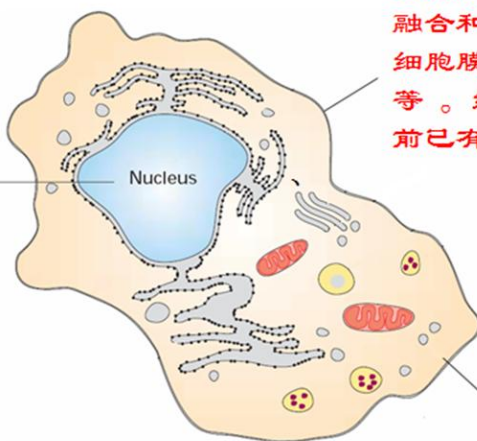
1.1 流式细胞术简介

1.1.6 传统流式细胞仪能够测量的参数

- 固有参数：细胞大小、颗粒度
- 荧光标记：细胞内几乎所有能够被荧光染料标记的成分或某种变化都可以用流式细胞仪进行检测

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



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

无需染色：大小，颗粒度，自发荧光，色素，绝对计数等

1.2. 流式细胞术中的光信号： 散射光和荧光

1.2.1 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)

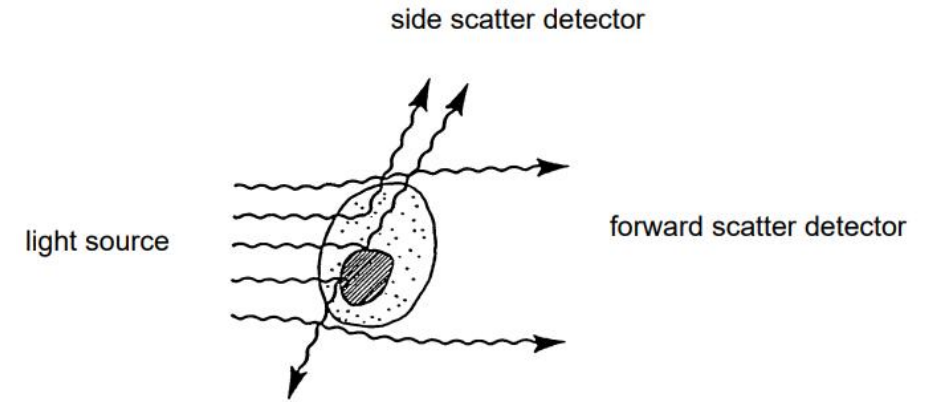
- 光强取决于参与散射的颗粒数

- 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



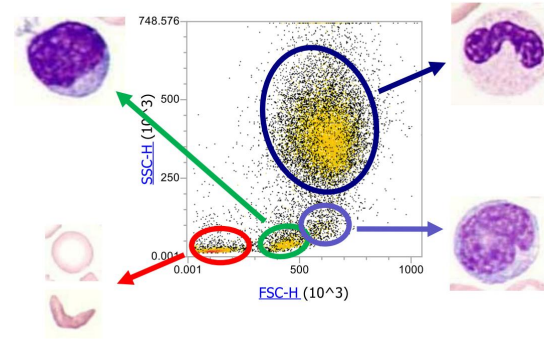
**Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide
From Becton Dickinson**

1.2. 流式细胞术中的光信号： 散射光和荧光

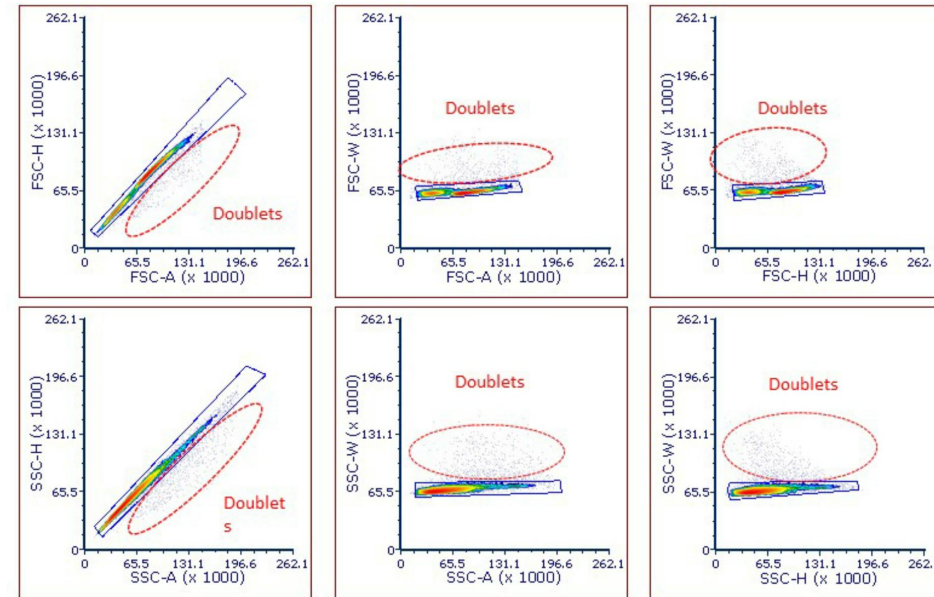
1.2.1 散射光信号

(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

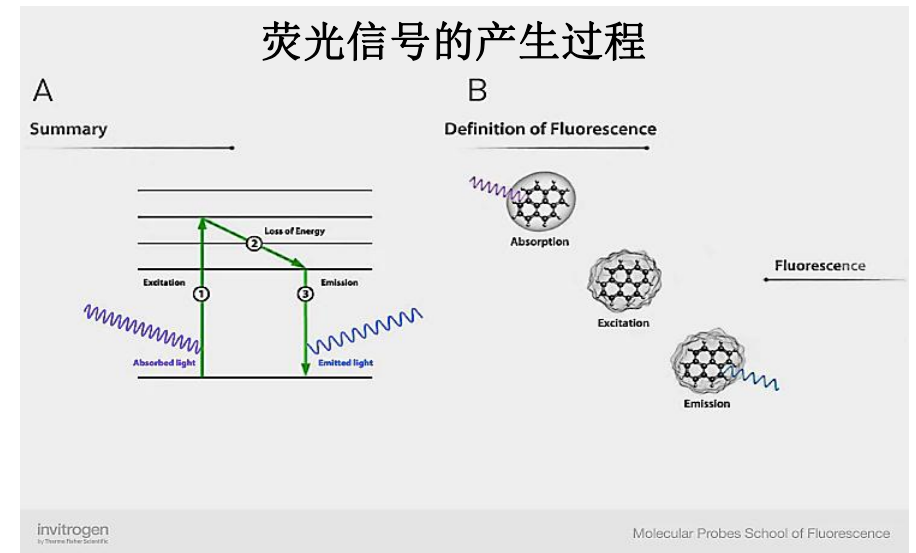
1.2. 流式细胞术中的光信号： 散射光和荧光

1.2.2 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>

二、分析型流式细胞仪的结构

2.1.流式细胞仪结构总览

2.1.1 液路系统：流动室+鞘液+废液+上样器+压力控制系统

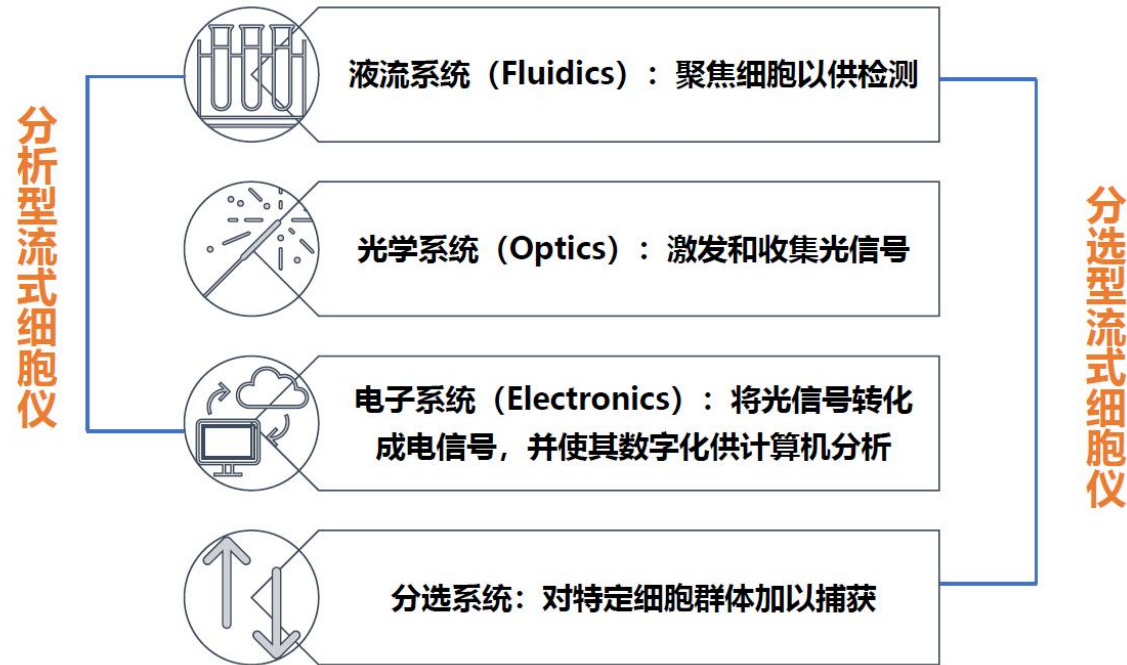
- 液路系统将样品（细胞/颗粒悬液）排列成单列细胞/颗粒流，并使细胞/颗粒稳定高速的通过流式细胞仪的检测点

2.1.2 光学系统：激光 + 透镜 + 二向色镜+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，产生**前向角散射（FSC）**和**侧向散射（SSC）**；和**荧光**。所有这些光被透镜收集，二向色镜和滤光片分离并导向相应的检测器，在检测器内转化为光电流。

2.1.3 电子系统：信号放大器+模数转化器

- 对收集的信号进行放大，通过模数转化器转化为数字信号，以备保存和后续分析或下一步操作（分选流式）。



2.2.液路系统

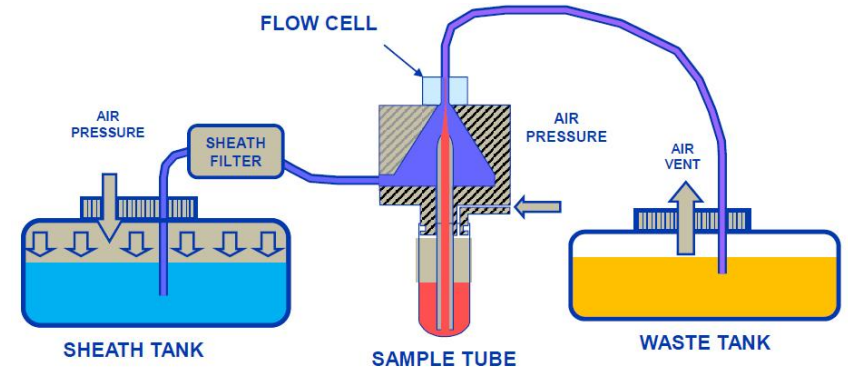
2.2.1 组成：**流动室**+鞘液桶+废液桶+上样器

2.2.2 原理：鞘液+流体动力学聚焦

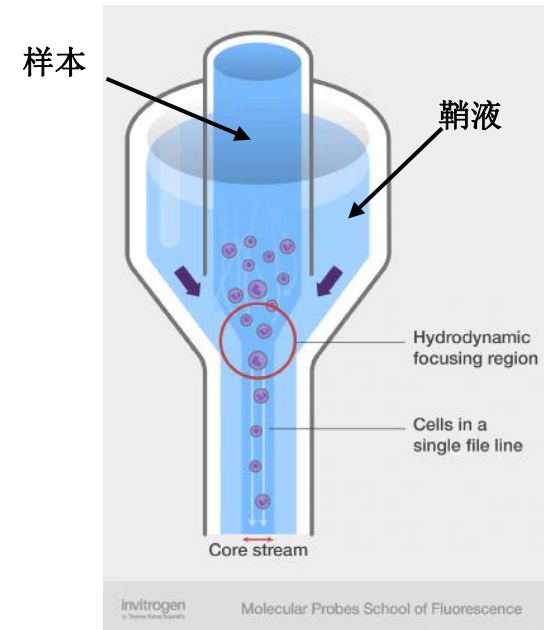
(1) 鞘液和样本在流动室内形成稳定的同轴层流，稳定层流保证各层之间彼此平行移动，物质基本不混合。

(2) 在鞘液压力和流动室逐渐收窄的双重作用下，样本液流横截面收缩，形成直径在 $20\ \mu\text{m}$ 左右的中心液流，束缚细胞排成单列。

2.2.3 作用：颗粒以相同的速度和相同的轨迹移动到检测点



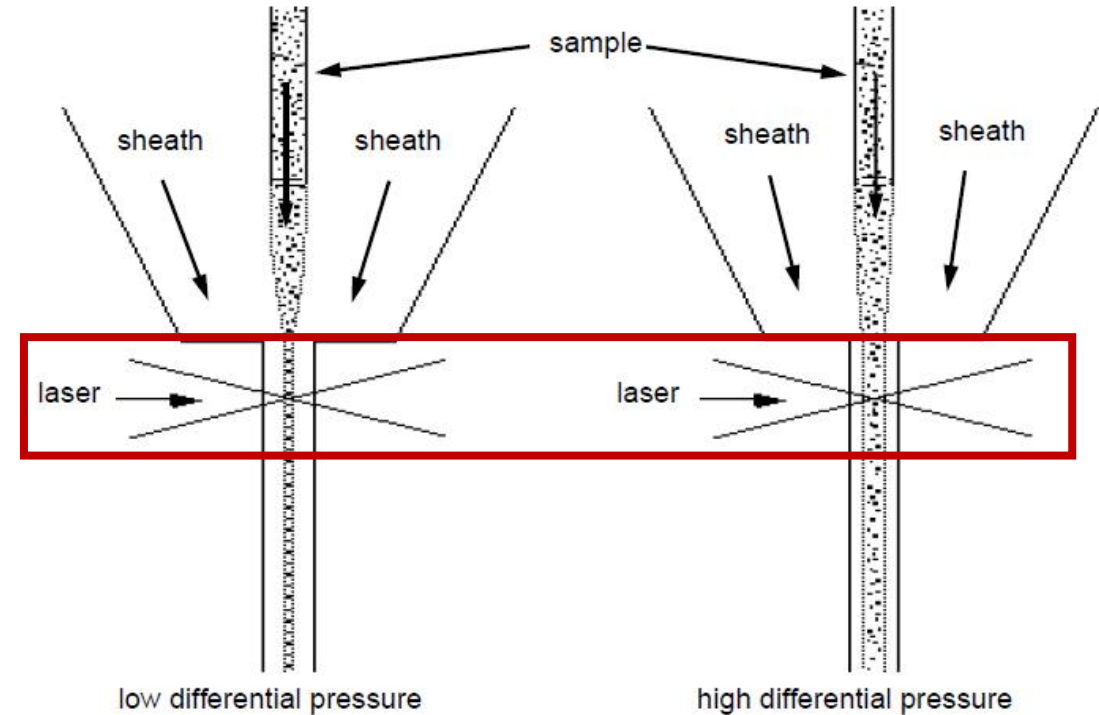
液路系统组成，来源：BD 培训材料



2.2.液路系统

2.2.4 上样速度对结果的影响

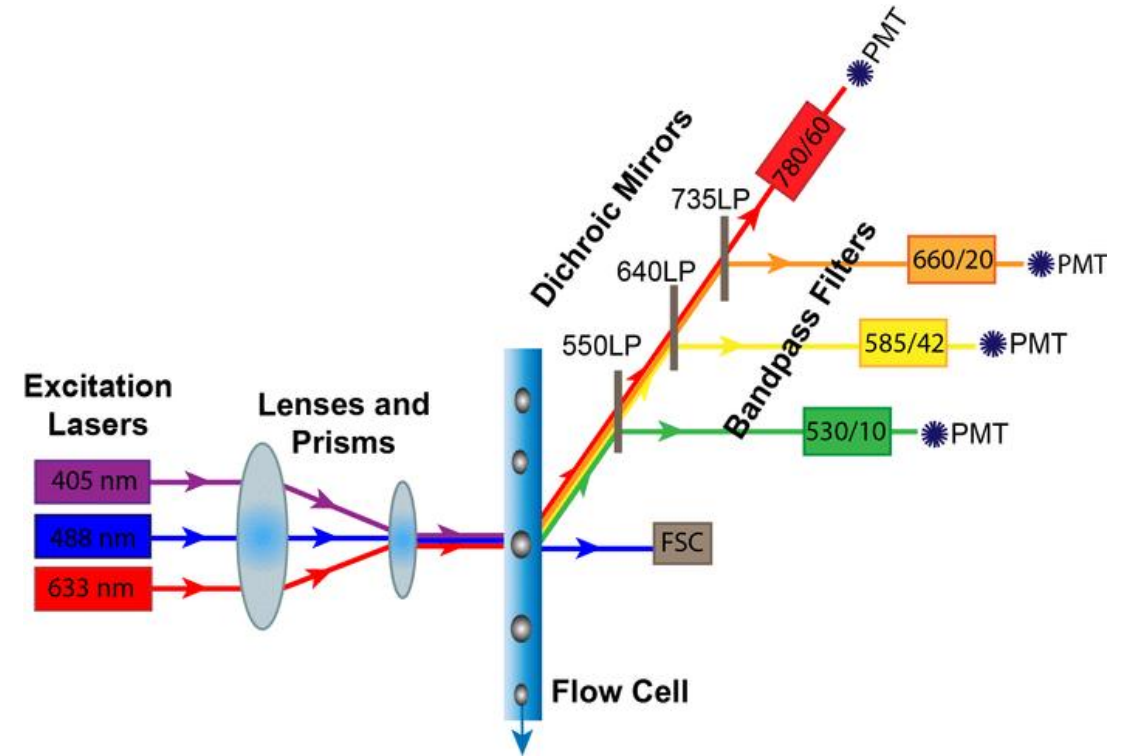
- 上样速度越高，样本中心液流（sample core）越粗，激光聚焦越差，分辨率越低
 - 定性测量一般对流速要求不高，例如免疫分型
 - 定量测量严格要求低速，例如细胞周期检测



2.3.光路系统

2.3.1 组成：激光 + 透镜 + 二向色镜+滤光片 + 检测器

2.3.2 作用：光子的产生、分离、收集



流式中典型的光路系统

2.3.光路系统

2.3.3 激发光源：激光器

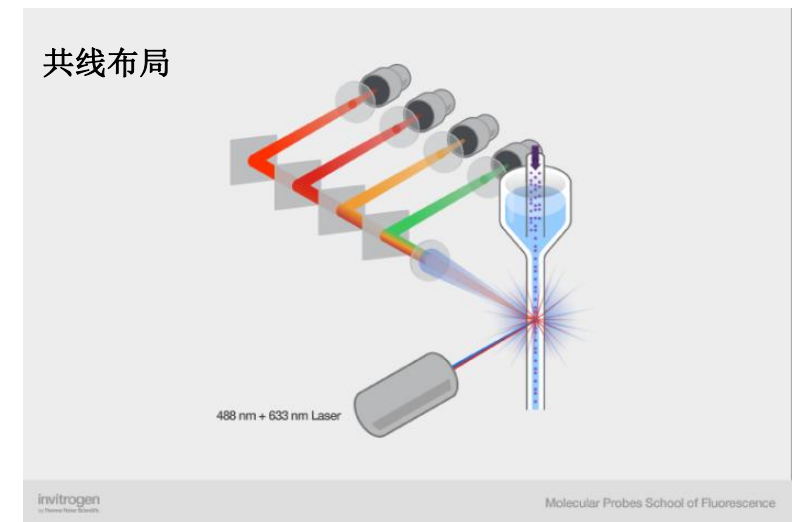
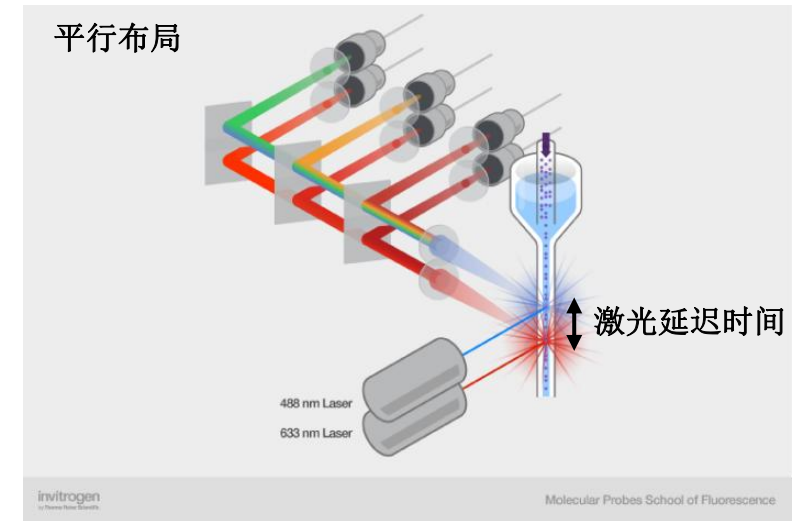
(1) 常见激光器：355nm（紫外）、405nm（紫色）、488nm（蓝色）、561nm（黄绿色）、633nm（红色）

(2) 激光器布局：

➤ 平行与共线布局

➤ 平行是主流排布

- 细胞一次只会被一个激光光源激发，允许激发波长不同但发射波长类似的荧光基团同时使用
- 通过激光延迟（laser delay）时间将同一细胞的数据整合



2.3.光路系统

2.3.4 光信号收集、分离系统

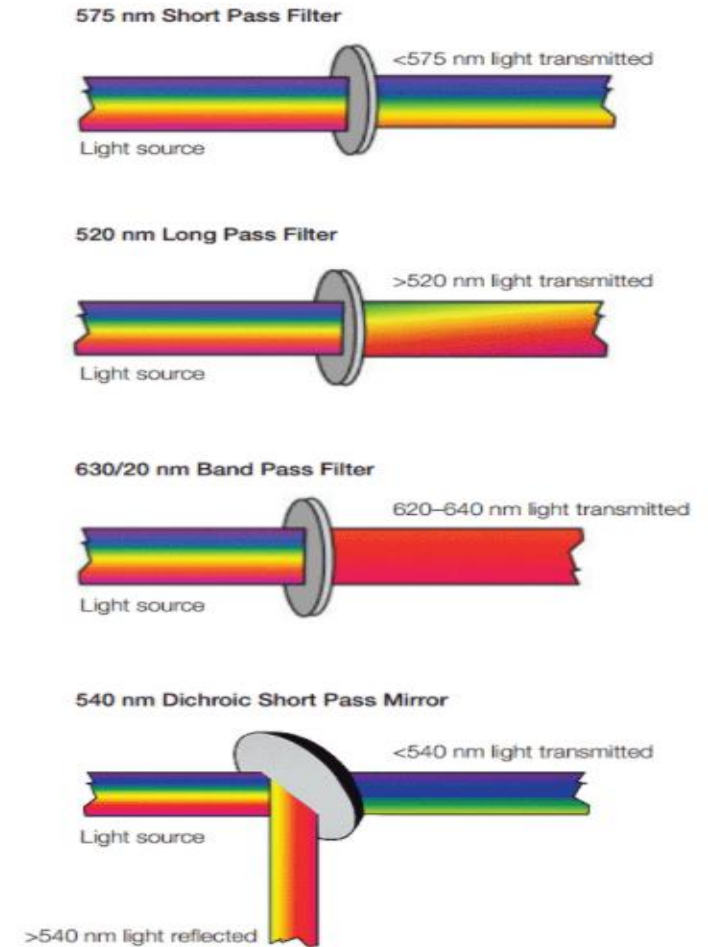
(1) 二向色镜

- 长通 (long pass) LP + 波长
- 短通 (short pass) SP + 波长

(2) 滤光片

- 长通 (long pass) LP + 波长
- 短通 (short pass) SP + 波长
- 带通 (band pass) BP + 波长/带宽
 - BP 630/20: 即允许 630 ± 10 nm的光通过

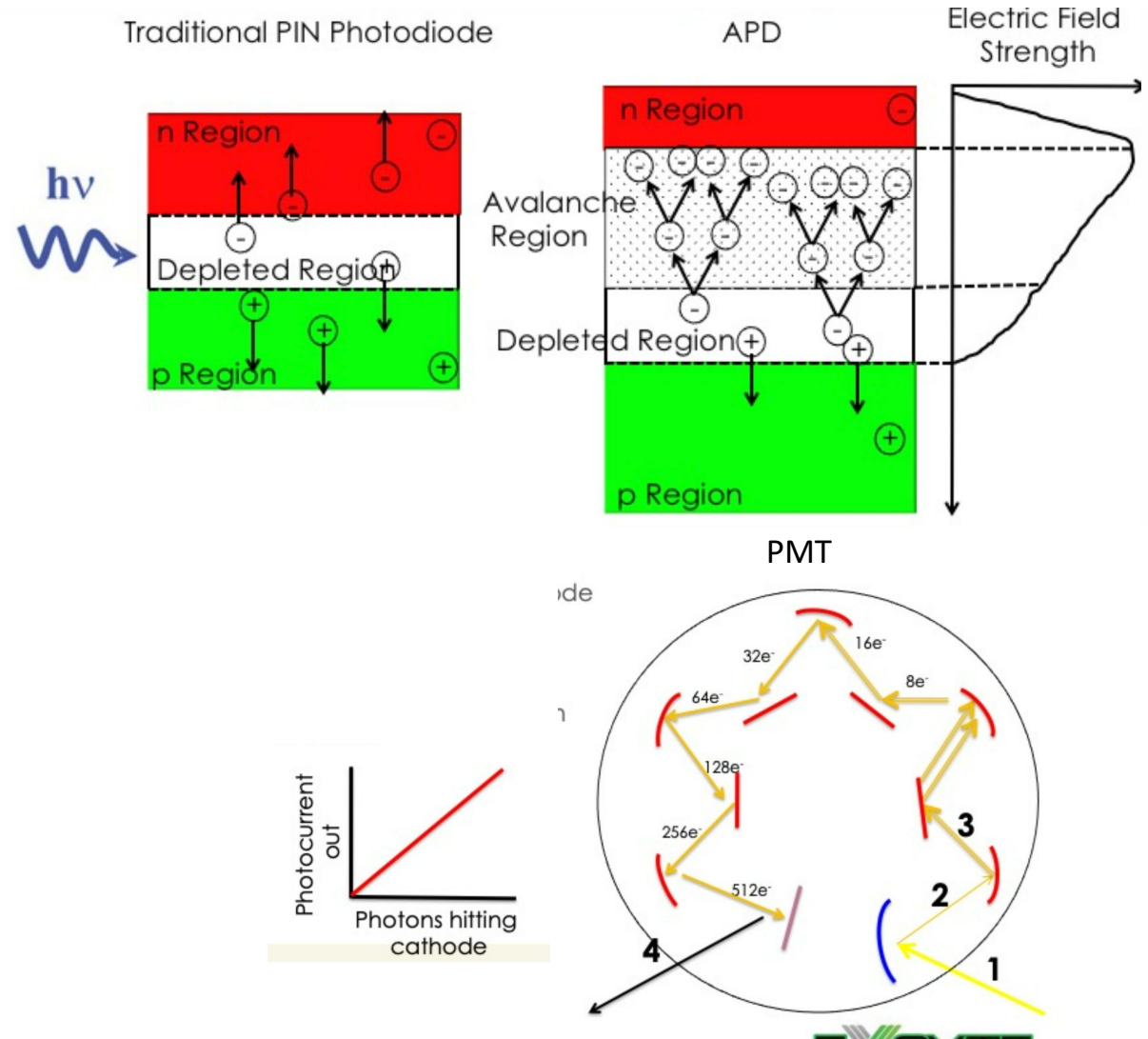
二向色镜偏转非允许通过的光，而滤光片则吸收非允许通过的光。



2.3.光路系统

2.3.5 光信号检测器

- (1) 原理：光电效应 光子 \rightarrow 光电子
- (2) 前向散射信号：光信号较强，不需放大
 - 光电二极管 (photodiode)
- (3) 侧向散射和荧光信号：较弱，需要放大
 - 光电倍增管 (PMT)
 - 雪崩光电二极管 (APD)
- (4) 检测器有线性工作范围。只有在这个范围内，输入的光信号才和输出的电信号成正比关系。



三种检测器的工作原理

2.3.光路系统

2.3.6 通道

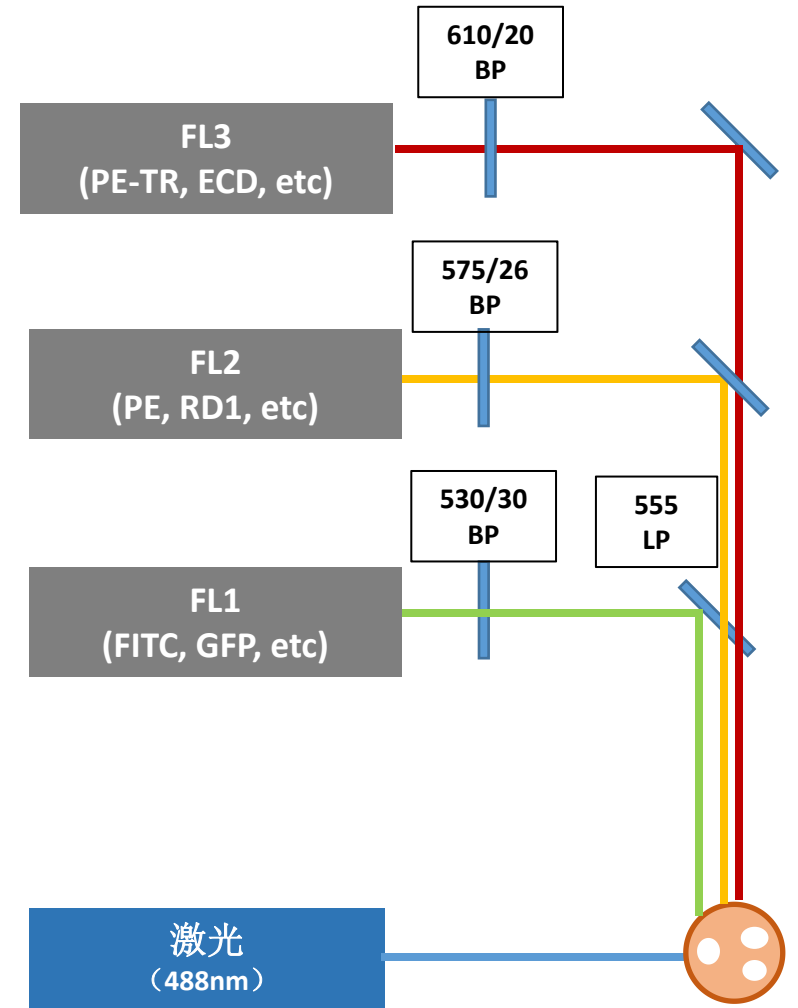
(1) 一个检测器和它对应的激发光源和光路，被称为一个通道

(2) 前向散射通道、侧向散射通道

(3) 荧光通道

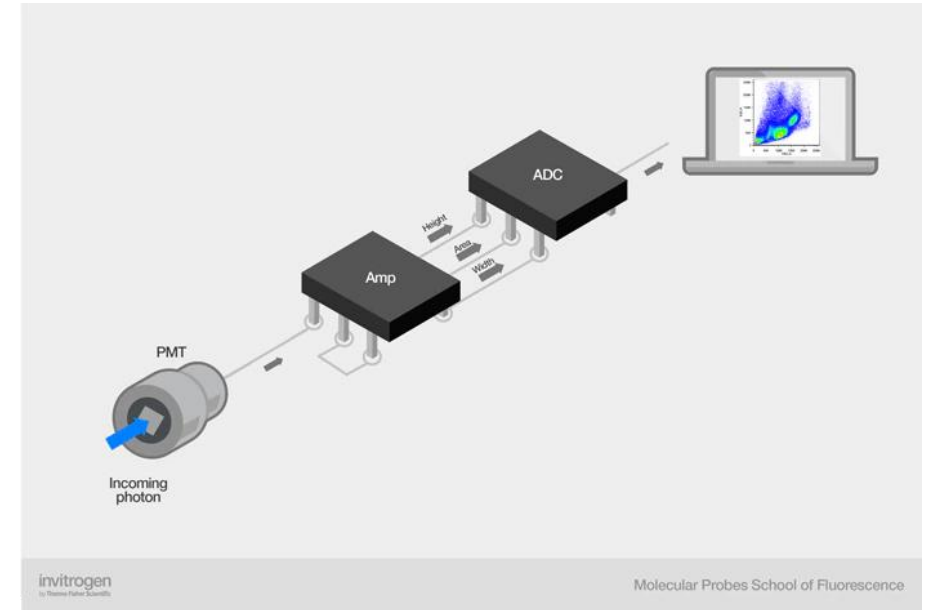
- 以最常用的荧光素简称：例如FITC 通道
- 判断一个荧光素该用哪一个通道收集数据时，最可靠的方法仍然是根据通道上的激发光源和检测器前的带宽滤光片进行判断

(4) 有多少个荧光通道就能同时检测多少个参数



2.4. 电子系统

2.4.1 作用：对检测器的信号进一步放大，通过模数转换器（ADC）转化为数字信号

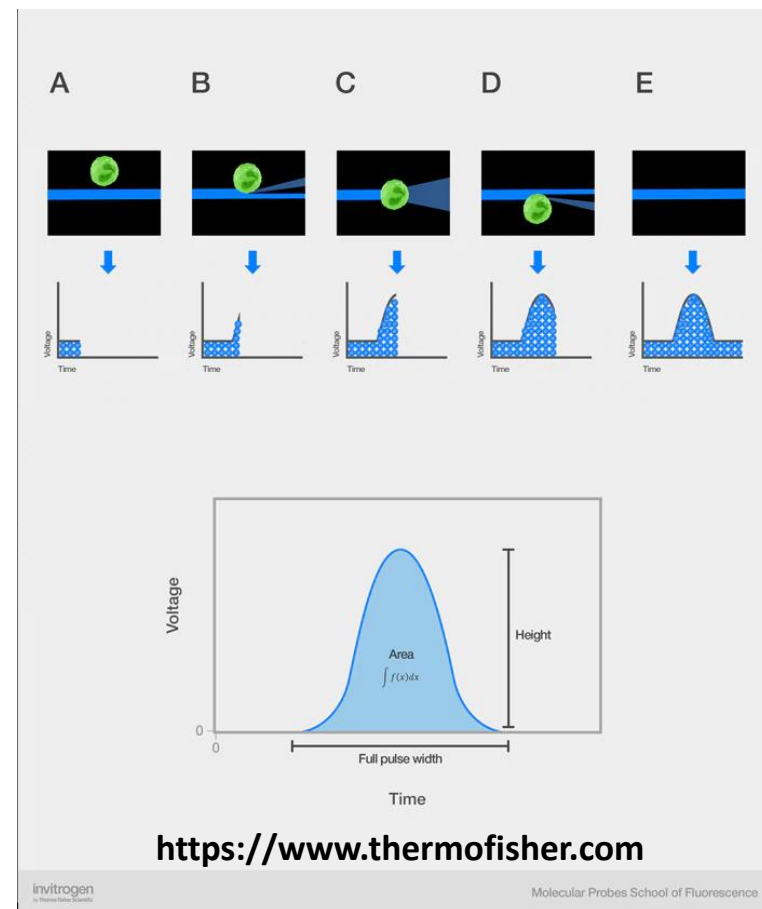


<https://www.thermofisher.com>

2.4. 电子系统

2.4.2 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

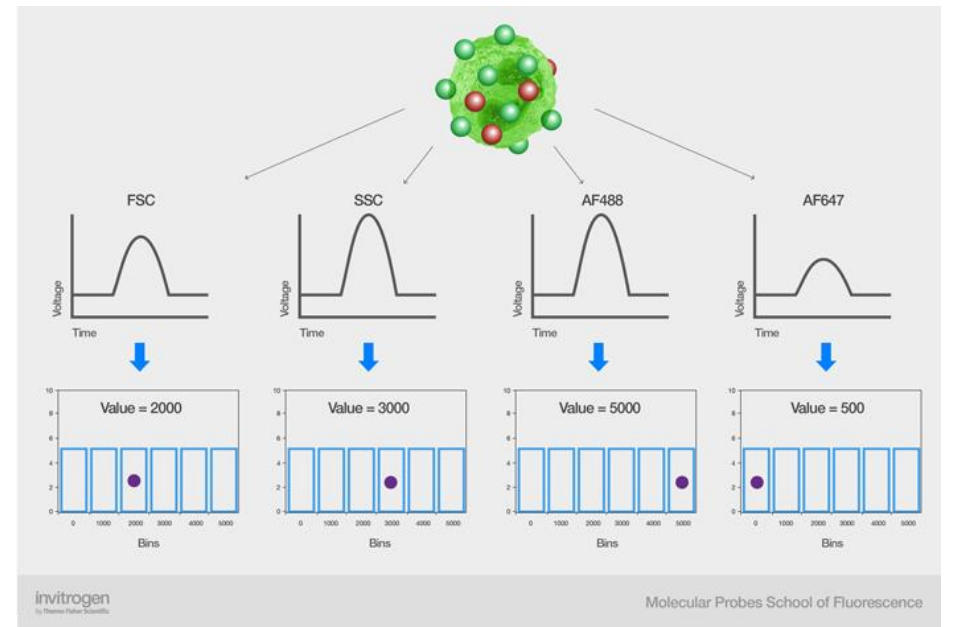


2.4. 电子系统

2.4.3 电压脉冲通过模数转换器（ADC）转化为数字信号-分箱

(1) 具体数值取决于ADC的位数

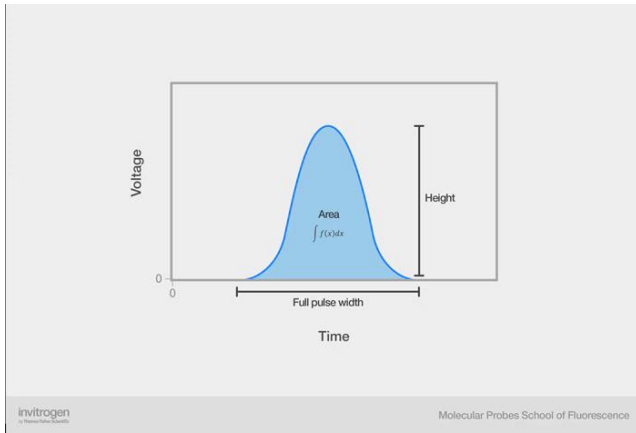
- 以24位ADC为例，所能转化的数值范围0-16,777,215 (2^{24})
- 假如经过放大的输出电脉冲信号0-10V，那么数值1对应596nV
- 如果测量值 $< 596\text{nV}$ ，赋值0
- 如果测量值 在596-1192nV之间，赋值1
- 以此类推



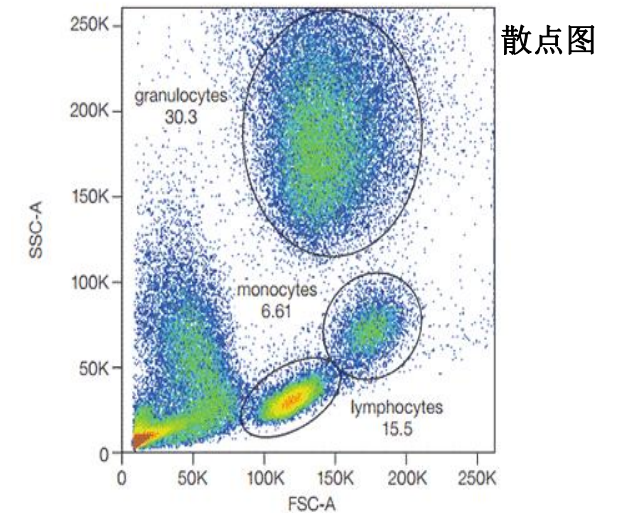
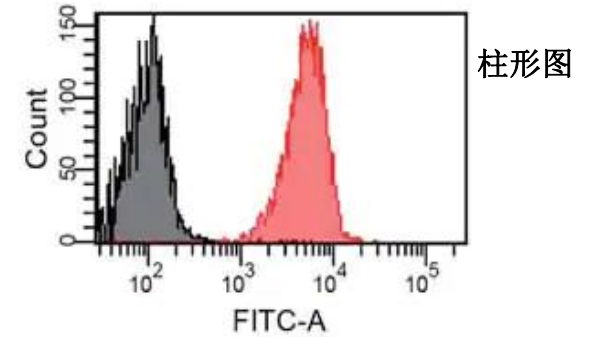
<https://www.thermofisher.com>

2.4. 电子系统

2.4.3 流式数据的生成:



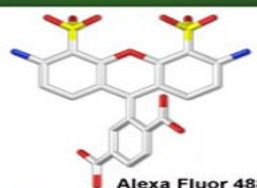
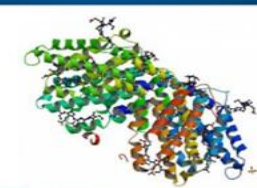
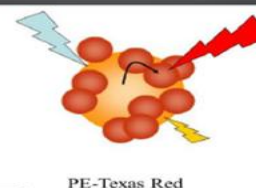
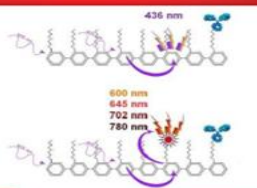
Cell#	FSC-A	SSC-A	FITC-A
1	300	280	100
2	250	300	250
3	320	200	1000
4	400	350	4000
5	300	320	1000
6	290	330	8000
7	330	350	8000
↓	↓	↓	↓



三、荧光素、荧光特性和荧光补偿

3.1. 荧光特性

3.1.3 荧光染料的种类和特点

有机小分子染料	荧光蛋白	复合染料	大分子染料
 <p>Alexa Fluor 488</p>		 <p>PE-Texas Red</p>	 <p>436 nm 600 nm 640 nm 702 nm 780 nm</p>
多色	明亮	斯托克位移大	明亮
<ul style="list-style-type: none"> • Alexa Fluor®系列 • eFluor®系列 • Fluorescein (FITC) • Calcein AM • PI, Dyecycle • CFSE • Cellevent, etc 	<ul style="list-style-type: none"> • 绿色荧光蛋白 (GFP) • 藻红蛋白 (PE) • 别藻蓝蛋白 (APC) • 多甲藻黄素-叶绿素蛋白 (PerCP) 	<ul style="list-style-type: none"> • PE-Cyanine/Alexa Fluor/eFluor • APC-Cyanine/Alexa Fluor/eFluor • PerCP-Cyanine/Alexa Fluor/eFluor 	<ul style="list-style-type: none"> • Super Bright 系列 • Brilliant Violet

来源: Thermofisher 培训材料

优点	<ol style="list-style-type: none"> 1. 种类多, 颜色范围广 2. 细胞功能检测 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 明亮 2. 颜色范围广 	斯托克斯位移大	<ol style="list-style-type: none"> 1. 明亮 2. 斯托克斯位移大
缺点	斯托克斯位移小, 通道选择受限	通道选择受限	<ol style="list-style-type: none"> 1. 稳定性相对差 2. 批次间有差异 3. 供体通道需要补偿 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 稳定性相对差 2. 供体通道需要补偿 3. 需要特定的staining buffer

3.1. 荧光特性

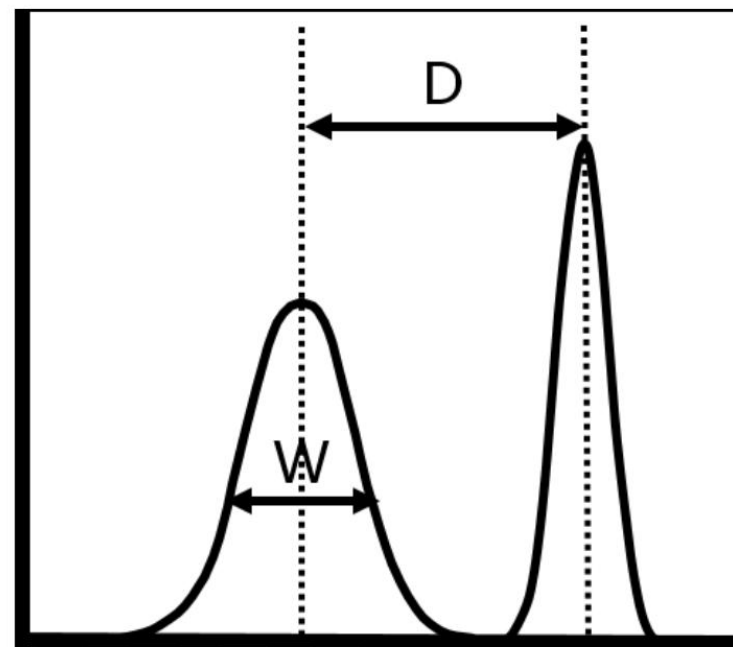
3.1.4 荧光染料的亮度

(1) 荧光强度

- 固有荧光强度 = 摩尔吸光系数 \times 荧光量子产率

(2) 染色指数

- 受到荧光强度、抗体和仪器配置的影响
- 在实际实验设计中需要考虑的参数



$$\text{染色指数} = \frac{D}{W}$$

Stain Index = $\frac{D}{W}$

3.1. 荧光特性

荧光染料相对亮度

荧光素	激发波长	最大发射波长	相对亮度	荧光素	激发波长	最大发射波长	相对亮度
Super Bright 436	405	436	3 to 4	R-PE	561	578	5
eFluor® 450	405	450	2	PE-eFluor® 610	561	607	3 to 4
eFluor® 506	405	506	1	PE-Cyanine 5	561	667	4
Super Bright 600	405	600	4 to 5	PE-Cyanine 5.5	561	695	3 to 4
Super Bright 645	405	645	4 to 5	PE-Cyanine 7	561	785	3
Super Bright 702	405	702	4	APC	637	660	4
Super Bright 780	405	780	4	eFluor® 660	637	660	4
FITC	488	518	3	Alexa Fluor® 647	637	668	4
Alexa Fluor® 488	488	519	3	Alexa Fluor® 700	637	723	2
R-PE	488	578	5	APC-eFluor® 780	637	780	2
PE-eFluor® 610	488	607	3 to 4				
PE-Cyanine 5	488	667	4				
PE-Cyanine 5.5	488	695	3 to 4				
PerCP-Cyanine 5.5	488	695	3				
PerCP-eFluor® 710	488	710	4				
PE-Cyanine 7	488	785	3				

荧光染料的亮度与抗原表达的强弱的匹配原则：抗原表达越弱，配对的荧光染料应该越亮

3.2. 荧光补偿

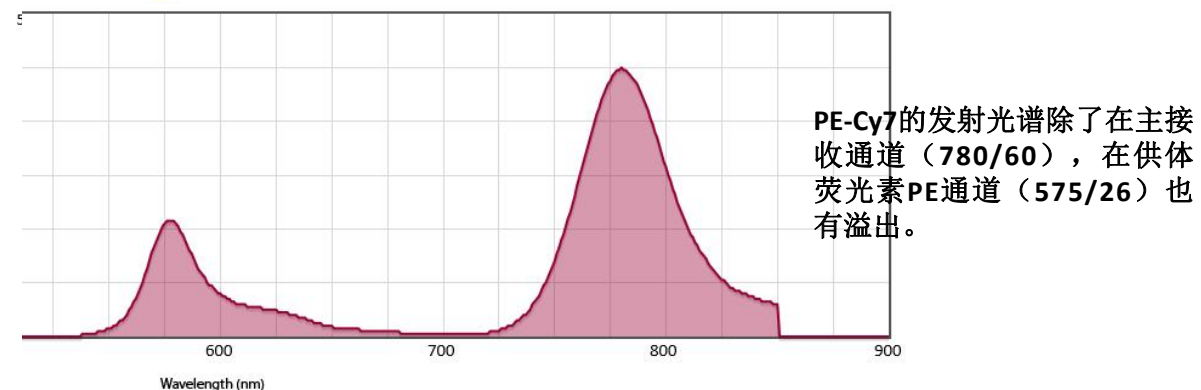
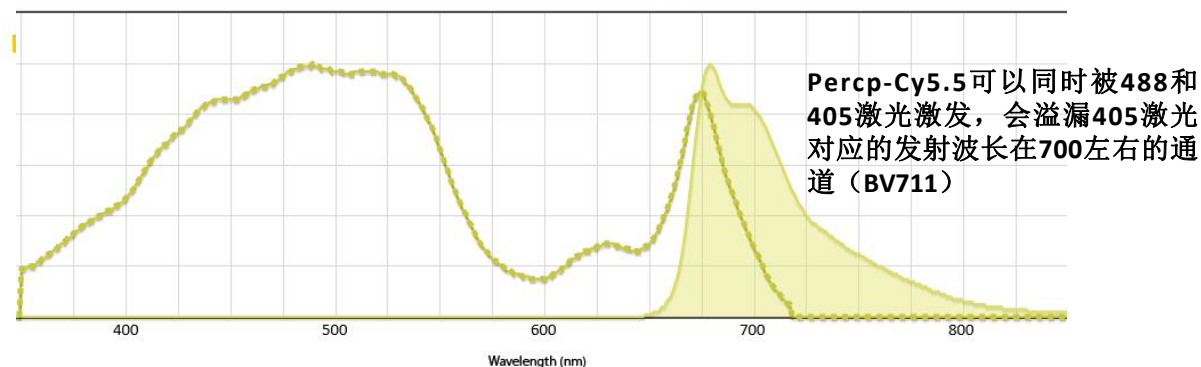
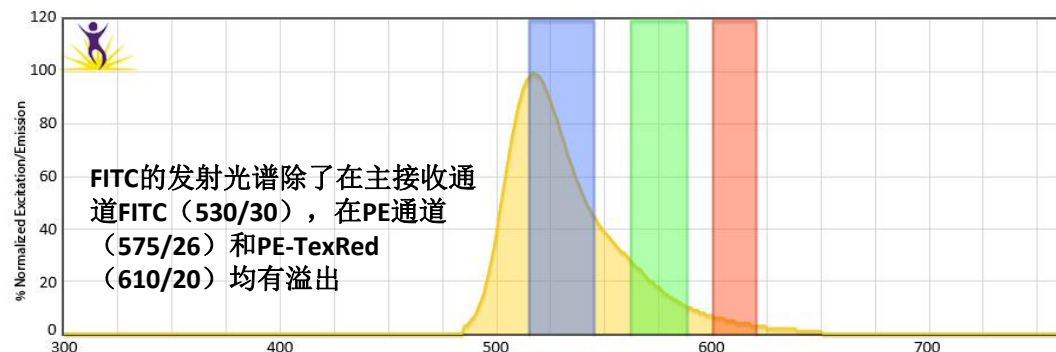
3.2.1 为什么会有荧光补偿？

——荧光染料的发射光信号被不止一个通道检测到，从而在被溢出通道产生假阳性信号。

(1) 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）

(2) 次要原因：

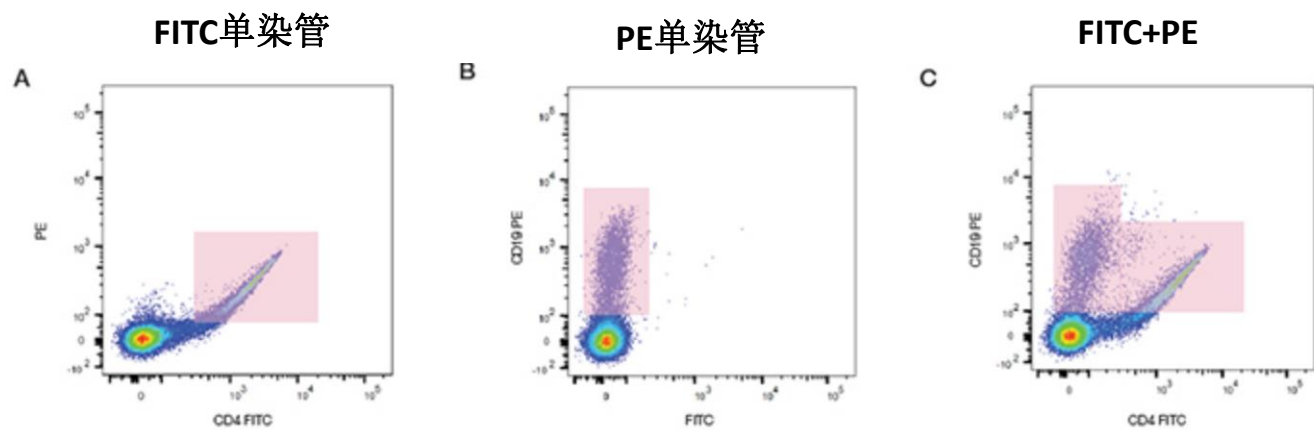
- 荧光素可以被多于一个激光激发，比如Percp-Cy5.5可以同时被488 和405激发，会溢出到BV711通道
- 复合荧光素在供体通道有溢出



3.2. 荧光补偿

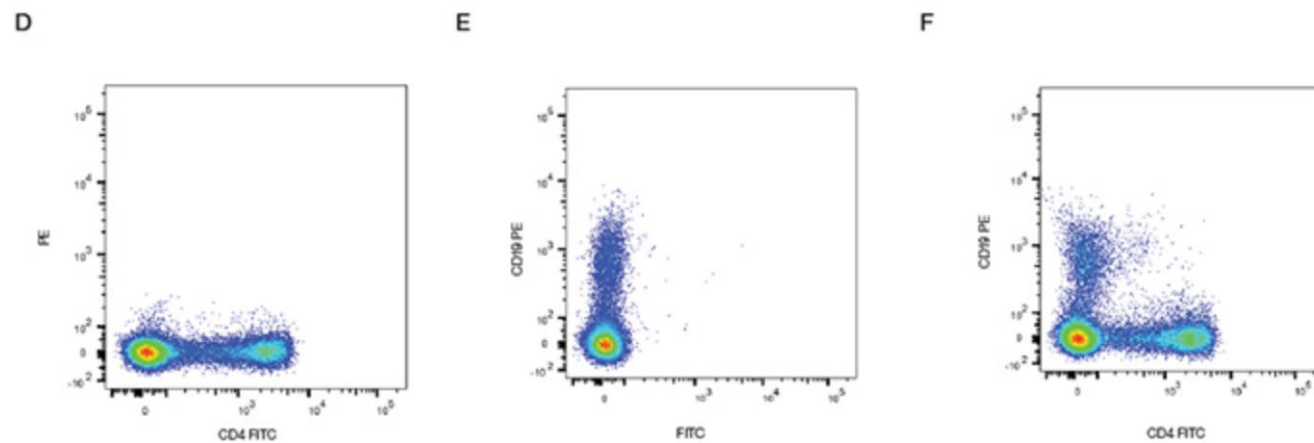
3.2.2 补偿前后的数据看起来什么样？

补偿前



补偿后

横平竖直



3.2. 荧光补偿

3.2.3 如何做荧光补偿

(1) 必须使用单色补偿管

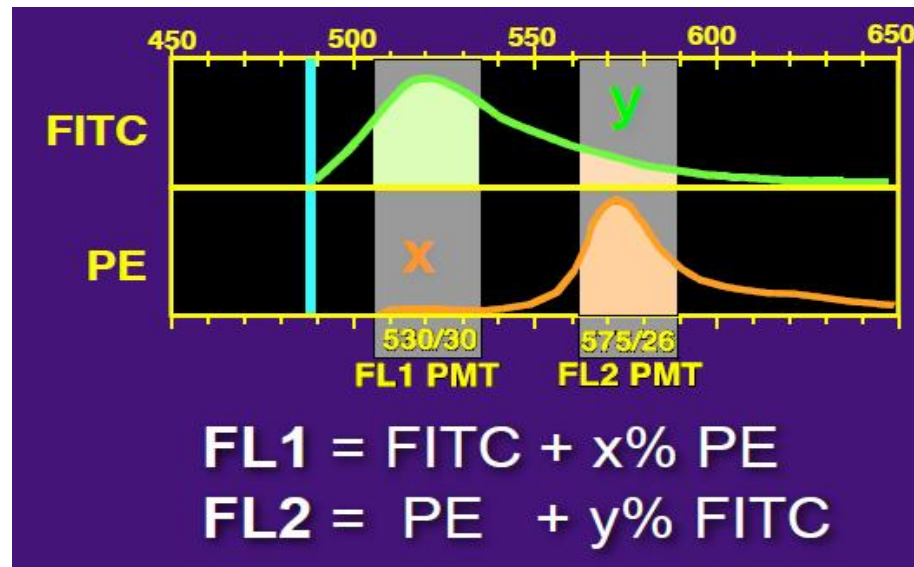
- 荧光素匹配：一定要使用相同的荧光素
 - 复合类荧光素需要批次一致
- 阴性群的自发荧光要与阳性群一致
- 必须有明显的阳性细胞群，阳性群的荧光强度应不低于样本
- 补偿样本必须和样本经过同样的处理，例如固定
- 稀有细胞、抗原表达很弱的细胞可以使用补偿微球代替

(2) 单色补偿管数据采集的电压参数必须与样本一致

(3) 手动补偿：横平竖直原则

(4) 自动补偿：软件自动计算（推荐）

以FITC, PE样本为例



FITC单染管： $FL1 = FITC + x\% * PE (0)$

$FL2 = PE (0) + y\% * FITC$

PE单染管： $FL1 = FITC (0) + x\% * PE$

$FL2 = PE + y\% * FITC (0)$

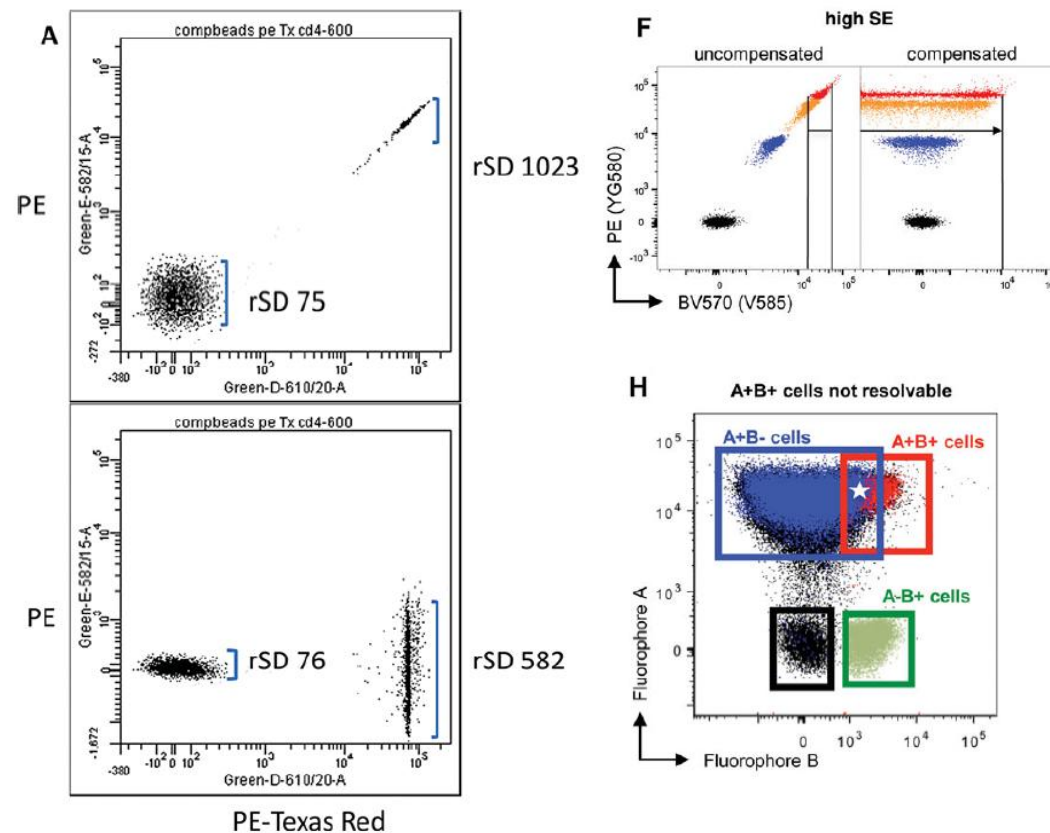
3.2. 荧光补偿

3.2.4 荧光补偿的后遗症：spreading error

(1) Spreading error是一种**测量误差**，表现为在**被溢出通道**的弥散，是由荧光溢出造成的，不是由补偿造成的

(2) Spreading error 降低了双阳性细胞在被溢出通道的分辨率。一般需要对照辅助圈门。

- 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



3.3.如何选择荧光染料

3.3.1 根据仪器配置的激光器和荧光通道选择荧光染料

- 一个荧光通道只能选择一个荧光染料
- 均匀选择不同激光对应的荧光通道
 - 举例来说，3激光流式：3-6色，每个激光器1-2个，不要集中在一个激光器对应的通道上

3.3.2 根据抗原表达强弱匹配抗体与荧光染料

- 将荧光染料按照亮度排序
- 将抗原表达按由弱到强的顺序排序
- 亮的荧光素配弱的抗原表达
- 共表达的抗原，强表达对弱表达 spreading error要尽量少

3.3.3 善于利用文献和已经优化的配色方案（OMIP）

四、实验流程和操作

4.1.流式细胞术实验流程一览



流式细胞术实验流程

4.1 样本类型：外周血、骨髓、细胞穿刺液、实体组织、培养细胞、微生物、藻类等

4.2 准备单细胞悬液（实验中最重要的步骤）：

- 悬浮细胞样本（最简单）：离心重悬
- 贴壁细胞系样本（简单）：消化后离心重悬
- 免疫器官样本制备：需要研磨，收集了单细胞悬液后，裂解红细胞，离心去除红细胞碎片后，PBS 重悬
- 实体脏器样本制备（最麻烦）：脏器剪碎后加入胶原酶、DNA 酶等消化后，再进行研磨
 - 参考：Worthington Tissue Dissociation Guide
- 根据需去除死细胞和碎片

Tissue Tables (references, grouped by tissue type and species)

Adipose/Fat	Adrenal	Bone	Brain
Cartilage	Colon	Endothelial	Epithelial
Eye	Heart	Intestine	Kidney
Liver	Lung	Lymph nodes	Mammary
Miscellaneous	Muscle	Neural	Pancreas
Parotid	Pituitary	Prostate	Reproductive
Scales	Skin	Spleen	Stem
Thymus	Thyroid/Parathyroid	Tonsil	Tumor

- Connective tissue
- Dissociating Enzymes
 - Collagenase
 - Trypsin
 - Elastase
 - Hyaluronidase
 - Papain
 - Chymotrypsin
 - Deoxyribonuclease I
 - Neutral Protease (Dispase)
 - Trypsin Inhibitor
 - Animal Origin Free (AOF) Enzymes
 - Celase® GMP
- III. Cell Isolation Techniques
 - Methods & Materials
 - Working With Enzymes
 - Basic Primary Cell Isolation
 - Equilibration with 95%O₂:5%CO₂
 - Trituration
 - Enzymatic Cell Harvesting
 - Cell Adhesion and Harvesting
 - Trypsin for Cell Harvesting
 - Cell Release Procedure
 - Optimization Techniques
 - General Guidelines
 - Optimization Strategy
 - Cell Quantitation
 - Measure of Viability
- IV. Use-Tested Cell Isolation Systems
- V. Tissue Culture Glossary
- VI. Stem Cell Glossary
- VII. How To Cite Worthington Literature

流式细胞术实验流程

4.3 荧光染色

4.3.1 表面染色：表面抗原分析

- (1) $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 细胞，洗涤重悬100 μL 染色缓冲液中
- (2) 封闭（可选）：用Fc封闭或者抗体来源血清加入细胞悬液中4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10分钟以减少非特异性结合
- (3) 染色：加入适当抗体，4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育10-30分钟
- (4) 洗涤重悬细胞于染色缓冲液中
- (5) 死活染色（可选）：上机前加入非透膜核酸染料，如PI, DAPI, 7-AAD等。若细胞需要用1%多聚甲醛固定（包括固定破膜），则在(2)步前使用可固定的胺反应性死活染料（amine-reactive live/dead dye）
- (6) 上机检测

流式细胞术实验流程

4.3 荧光染色

4.3.2 胞内染色:

常见: 胞内因子, 例如IL-4等; 核内抗原, 例如FOXP3; 胞内抗原

- (1) 死活染色 (可选): 使用可固定的胺反应性死活染料
- (2) 表面抗原染色, 洗涤
- (3) 固定: 4%多聚甲醛, 室温避光孵育15分钟
- (4) 透膜: 洗涤后, 用0.1%皂素室温孵育15分钟。或者用其他透膜剂孵育合适的时间
- (5) 胞内染色: 在含有透膜剂的染色缓冲液中, 加入适量抗体, 4 °C避光孵育30-60分钟
- (6) 洗涤重悬细胞于染色缓冲液中
- (7) 上机检测

流式细胞术实验流程

4.4 上机检测

4.4.1 确保准备了对照管

- ① 空白对照管：用于初步确定电压，检查自发荧光水平
- ② 单阳管：多色实验中，用于计算补偿
- ③ 同型对照管（选对物种、亚型）：评估抗体的非特异性结合（Fc受体或胞内蛋白结合），不建议用于区分阴阳群
- ④ FMO管（荧光素减去一）：区分阴阳性群
- ⑤ 阳性对照管和阴性对照管

实验必须！

流式细胞术实验流程

4.4 上机检测

4.4.2 上机流程

(1) 选择通道：

- 选择靠近荧光染料最大激发波长的激光作为激发光源
- 选择靠近荧光染料最大发射波长滤光片作为接受通道

(2) 电压：（以BD仪器为例）

- 基本原则：①分出目标细胞群；②位于线性检测范围
- 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 ）
- 优化电压：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

(3) 阈值：

- 只有大于阈值的信号才能被记录下来
- 目的：去除碎片及背景信号
- 除非碎片太多或者检测<500nm的颗粒，否则一般使用默认值

(4) 补偿：可以在收取数据调节，也可以在分析数据时调节

流式细胞术实验流程

4.5 数据分析

➤ 流式数据是FCS文件

➤ 数据分析软件

- 第三方软件: flowjo, cytobank, FCS Express等
- 仪器相关的: FACSDiva(BD), CytExpert (Beckman)

➤ 图形类型

➤ 单参数直方图 (histogram)

➤ 双参数二维图

- 散点图
- 伪彩图
- 等高线图
- 密度图

➤ 高维聚类降维生信分析

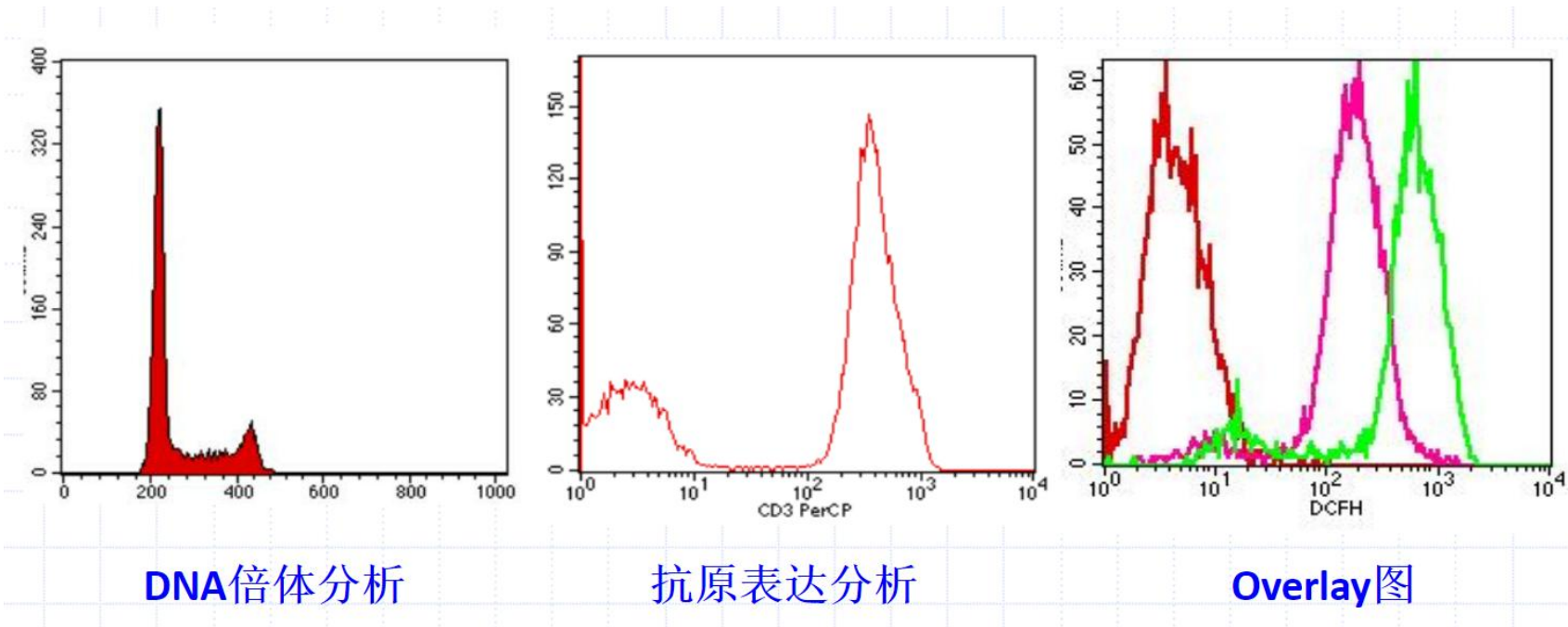
Parameter	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Name	FSC-H	FSC-W	SSC-A	SSC-H	SSC-W	488 A 695/40	561 D 610/20	561 A 780/60	405 D 525/50
String									
Range	262144	262144	262144	262144	262144	262144	262144	262144	262144
Bits	32	32	32	32	32	32	32	32	32
1	136813.00	72175.84	100686.88	88489.00	74569.90	9000.32	15158.64	3904.32	15887.52
2	136392.00	72013.31	98798.56	86540.00	74819.30	8873.76	15250.76	3290.84	16505.28
3	136761.00	72370.88	99523.20	86557.00	75353.27	8064.00	14991.06	3386.88	16967.61
4	136288.00	72599.80	102604.32	90900.00	73974.45	8835.68	13644.54	2762.62	16658.73
5	136493.00	72679.64	102473.28	90521.00	74189.29	8384.32	14253.12	3108.56	15756.84
6	137809.00	71919.16	102944.80	91413.00	73803.40	8487.36	14612.78	3410.40	17198.28
7	136451.00	72557.54	97821.92	85559.00	74929.08	8755.04	14392.28	3188.92	15426.18
8	131217.00	73191.84	87923.36	77317.00	74526.24	7935.20	13974.80	3613.26	14421.33
9	137763.00	72796.29	98178.08	86391.00	74477.66	8622.88	14378.56	2479.40	15633.09
10	138296.00	71846.40	101661.28	90380.00	73716.24	8266.72	15017.52	3336.90	17202.24
11	138825.00	72279.32	108109.12	94829.00	74713.85	9089.92	14271.74	3181.08	16338.96
12	137084.00	71431.94	97625.92	86136.00	74278.02	9569.28	15296.82	3063.48	17455.68
13	136099.00	72974.48	94170.72	81575.00	75655.19	8542.24	16242.52	3597.58	17812.08
14	138561.00	72564.37	100914.24	87989.00	75162.98	8611.68	15122.38	3232.04	17161.65
15	120599.00	73751.43	128493.12	112851.00	74619.85	13147.68	22317.54	4793.18	23744.16
16	132646.00	73071.72	91556.64	79586.00	75393.36	7881.44	14176.68	3687.74	14792.58

一个典型的FCS文件格式
来源: 网络

流式细胞术实验流程

4.5 数据分析

4.5.1 直方图：横轴为荧光或者散射光强度，纵轴为细胞数



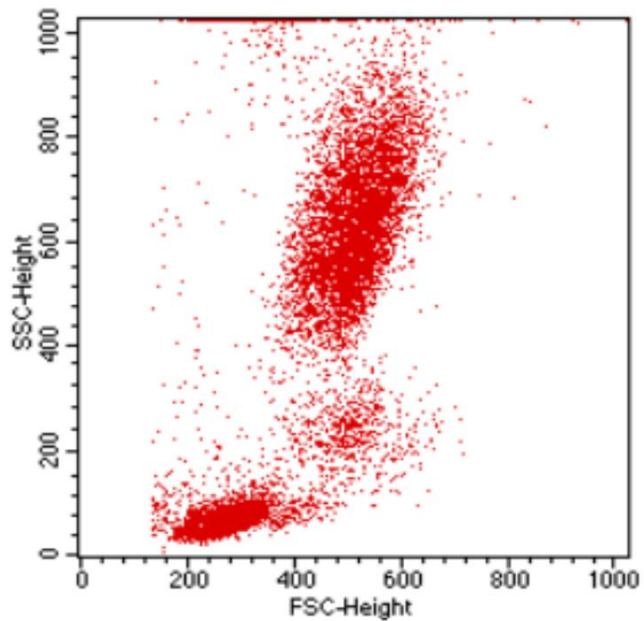
来源：网络

流式细胞术实验流程

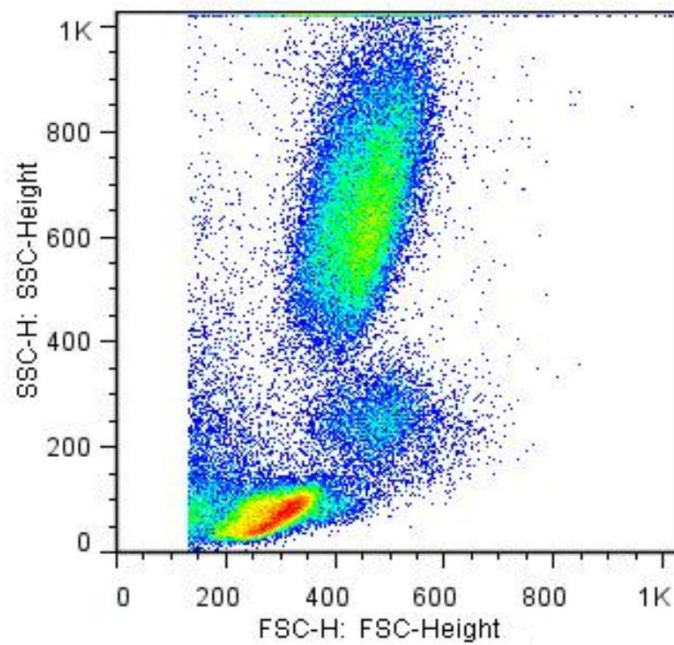
4.5 数据分析

4.5.2 双参数图：横轴和纵轴各代表一个参数

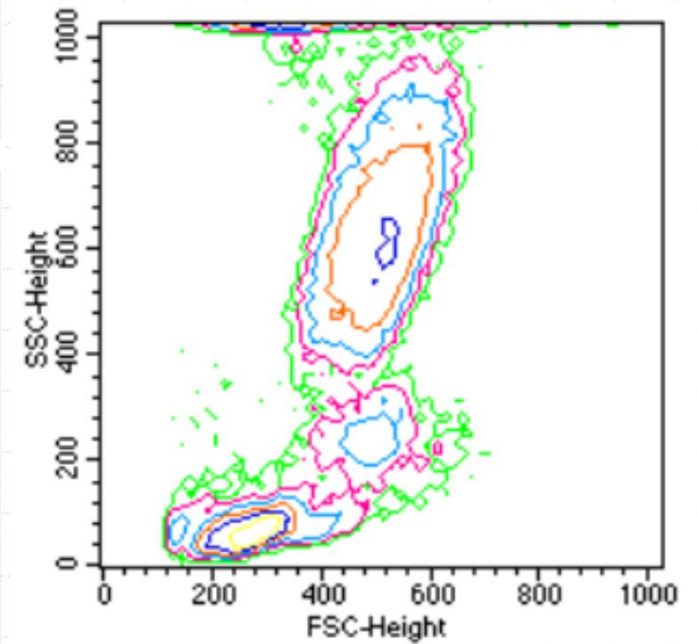
散点图



伪彩图



等高线图



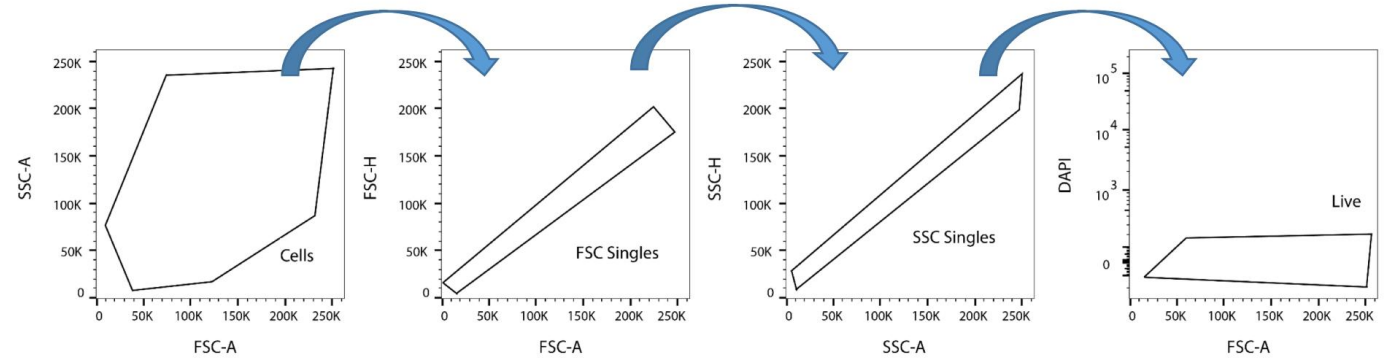
流式细胞术实验流程

4.5 数据分析

4.5.3 圈门 (gating)

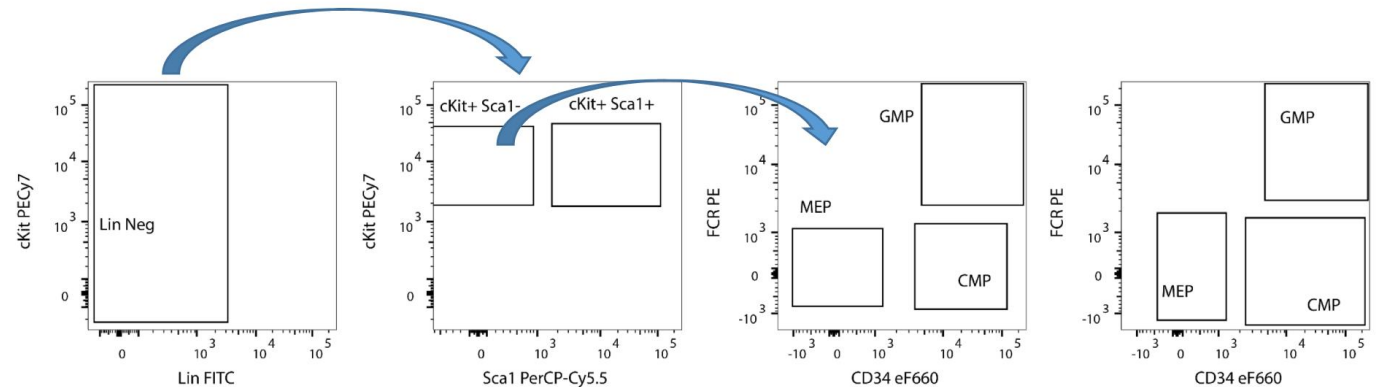
基本圈门逻辑:

- (1) 圈主细胞群, 去除碎片
- (2) 去除粘连
- (3) 圈活细胞
- (4) 根据抗原圈细胞的相互关系



4.5.4 统计参数

- 百分比
- 荧光强度
 - 推荐使用中位数 (median) 而非平均值 (mean)
- 数学模拟
 - 细胞周期
- 绝对计数

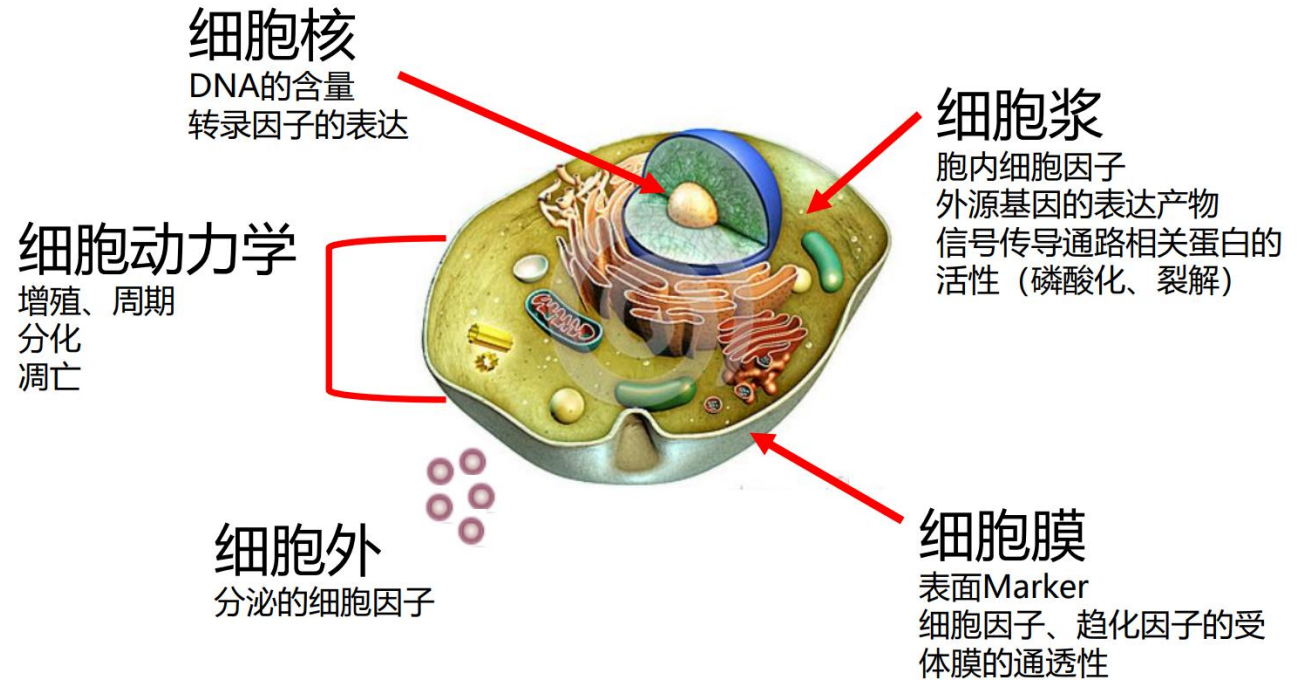


五、流式细胞术的应用

流式细胞术的应用

流式平台常见的应用:

- 免疫分型
- 细胞功能检测
 - 凋亡
 - 周期
- 可溶性蛋白（CBA）



5.1 免疫分型

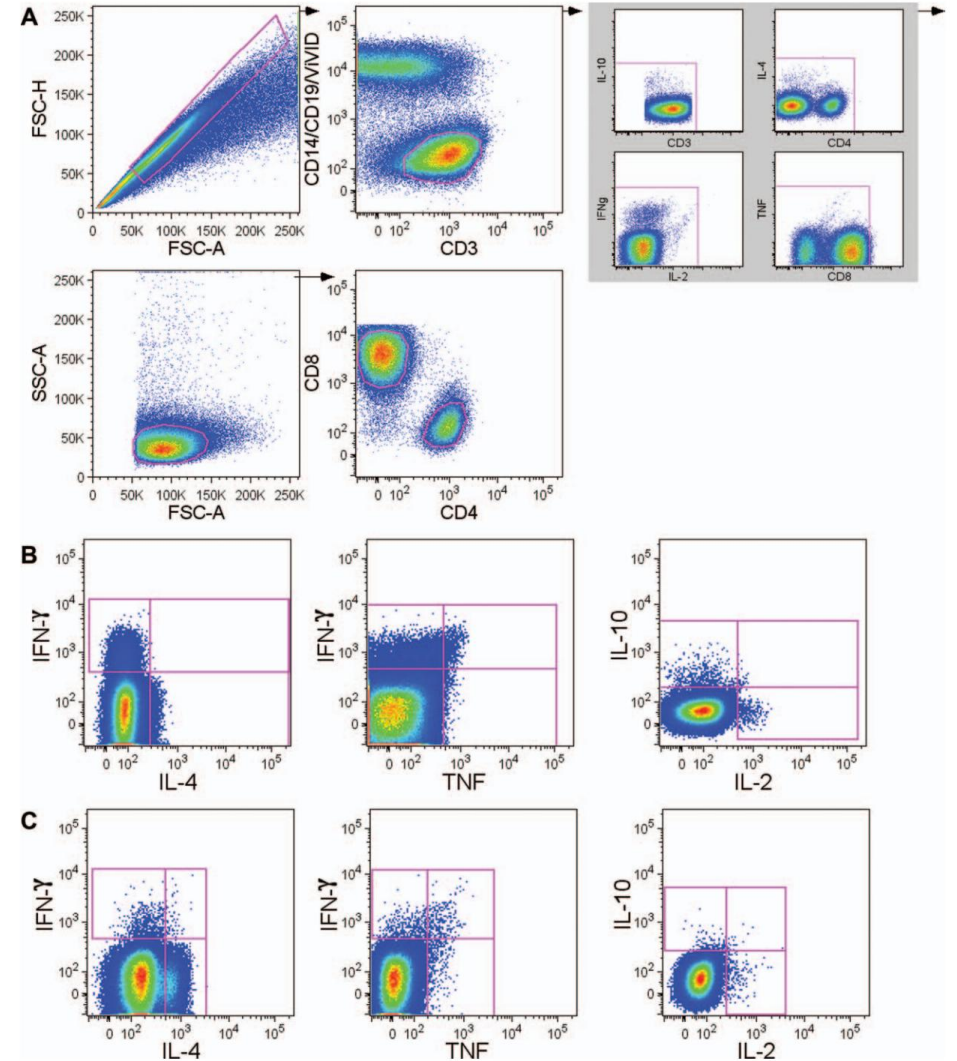
OMIP008: 人类T细胞Th1和Th2细胞因子的测定

SPECIFICITY	CLONE	FLUOROCHROME	PURPOSE
IL-2	MQ1-17H12	PerCP-Cy5.5	Function
IL-4	8D4-8	Ax488	
IL-10	JES3-9D7	PE	
IFN- γ	B27	APC	
TNF- α	MAB11	PE-Cy7	
CD3	UCHT1	Ax700	Lineage
CD4	RPA-T4	APC-Cy7	
CD8	3B5	QD605	
CD14	M5E2	PacBlu	Dump
CD19	HIB19	eFluor450	
Dead cells	-	ViViD	

胞内细胞因子染色

表面抗原染色

细胞死活



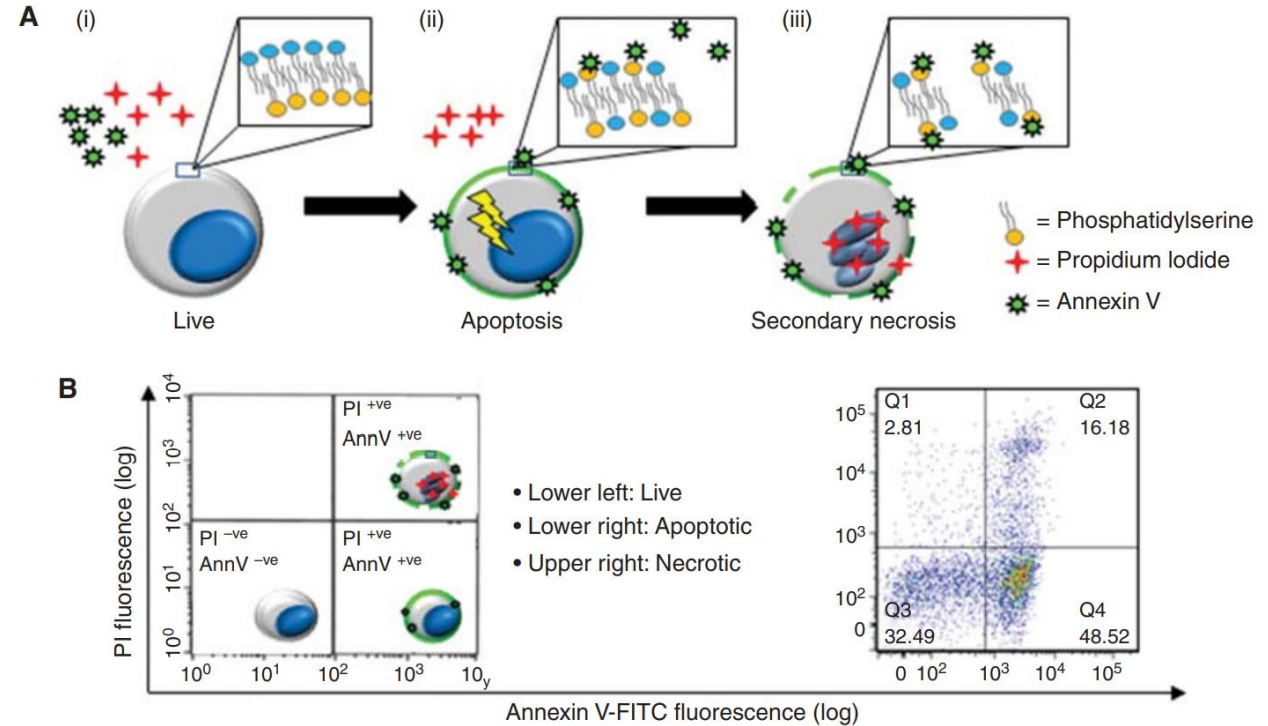
Zuleger CL, Albertini MR. OMIP-008: measurement of Th1 and Th2 cytokine polyfunctionality of human T cells. *Cytometry A*. 2012 Jun;81(6):450-2. doi: 10.1002/cyto.a.22035

5.2 细胞凋亡

Annexin V与PI双染来判断早凋与晚凋的细胞

原理：在正常的活细胞中，磷脂酰丝氨酸（phosphatidylserine, PS）位于细胞膜的内侧，但在早期的凋亡的细胞中，PS从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面，暴露在细胞外环境中。Annexin-V（膜联蛋白-V）能与PS高亲和力结合，可通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的细胞膜结合。

碘化丙啶（Propidium Iodide, PI）是一种核酸染料，它不能透过正常细胞或早期凋亡细胞的完整的细胞膜，但可以透过凋亡晚期和坏死细胞的细胞膜而使细胞核染红。因此，将Annexin V与PI联合使用时，PI则被排除在活细胞（Annexin V-/PI-）和早期凋亡细胞（Annexin V+/PI-）之外，而晚期凋亡细胞和坏死细胞同时被FITC和PI结合染色呈现双阳性。

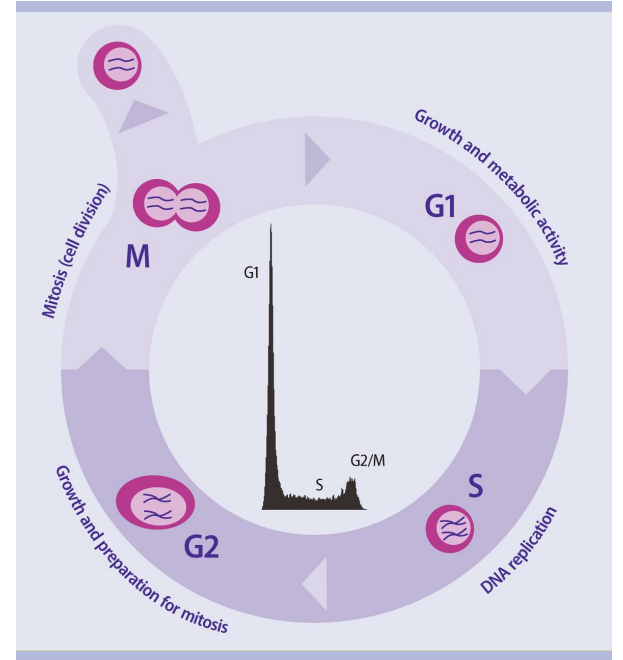


5.3 细胞周期

原理：

细胞周期分为四个连续的阶段，从静止期（G0期）到增殖期（G1期、S期、G2期和M期），再回到G0期。细胞周期各时相的DNA含量不同，正常细胞的G1/ G0期具有二倍体细胞的DNA含量(2N)，而G2/ M期具有四倍体细胞的DNA含量(4N)，而S期的DNA含量介于二倍体和四倍体之间。

检测细胞周期常用的方法是检测DNA含量，选择能与DNA结合的荧光染料（PI，7-AAD，DAPI，Hoechst 33342，33258，DRAQ5™和DRAQ7™等），再根据细胞各个时期DNA含量不同从而荧光强度不同的方法，分析各个阶段的细胞比例。

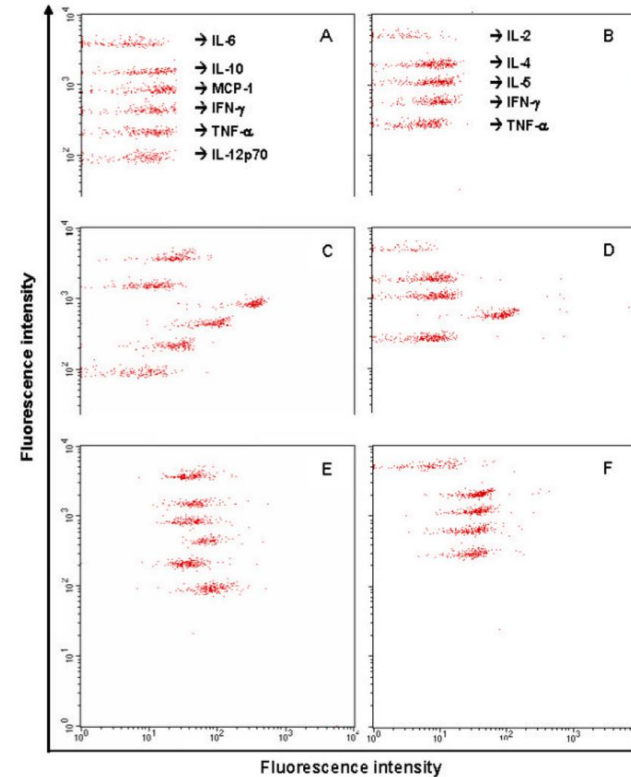
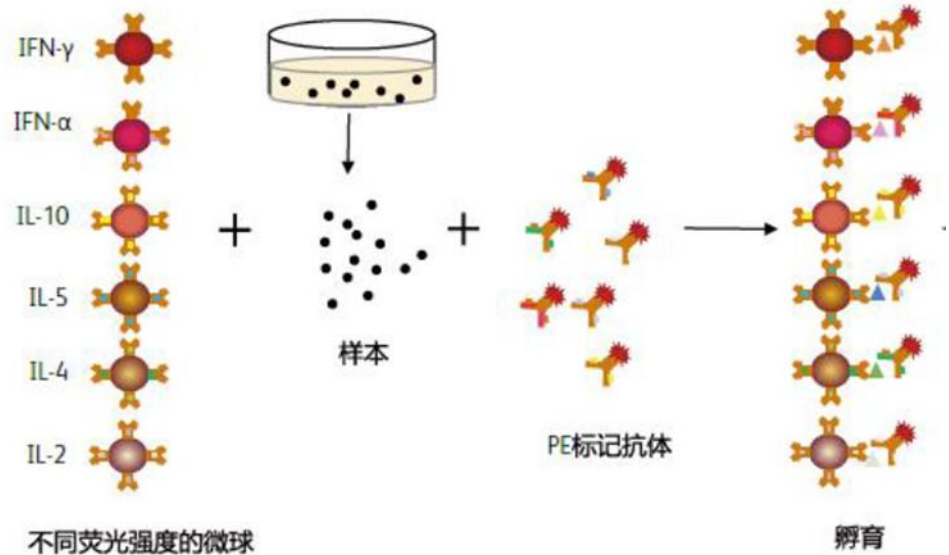


<https://www.miltenyibiotec.com/CN-en/applications/flow-cytometry-applications/cell-cycle-analysis.html>

5.4可溶性蛋白检测（Cytometric Bead Array, CBA）

细胞因子微球检测技术原理：

同样大小自带不同荧光（APC）强度的混合微球，表面包被有捕获抗体，可以捕获待测蛋白。与待测样本共同孵育后，加入带有另一荧光标记（PE）的检测抗体，形成“三明治”夹心复合物进行检测。CBA可以同时测量多种可溶性蛋白检测，是ELISA的替代检测方法。



Hemdan NY. The role of interleukin-12 in the heavy metal-elicited immunomodulation: relevance of various evaluation methods. *J Occup Med Toxicol.* 2008 Nov 6;3:25. doi: 10.1186/1745-6673-3-25.

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	

上机培训时间（关注中心网站首页通知并报名）