



# 流式细胞分选

——原理及实验准备

中国科学技术大学 生命科学实验中心

杨真 2023.10.20





## 目录：

一、流式分选的特点和应用

二、流式分选原理

- 分选的是包裹细胞的液滴而非细胞

三、影响分选效果的因素

四、实验准备

五、BD FACS Aria III 仪器结构与参数设置





# 一、流式分选的特点和应用





# 1. 流式细胞分选技术简介

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

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：高达数十万个events每秒
- 可以定量分析，大数据提供统计学差异





## 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。





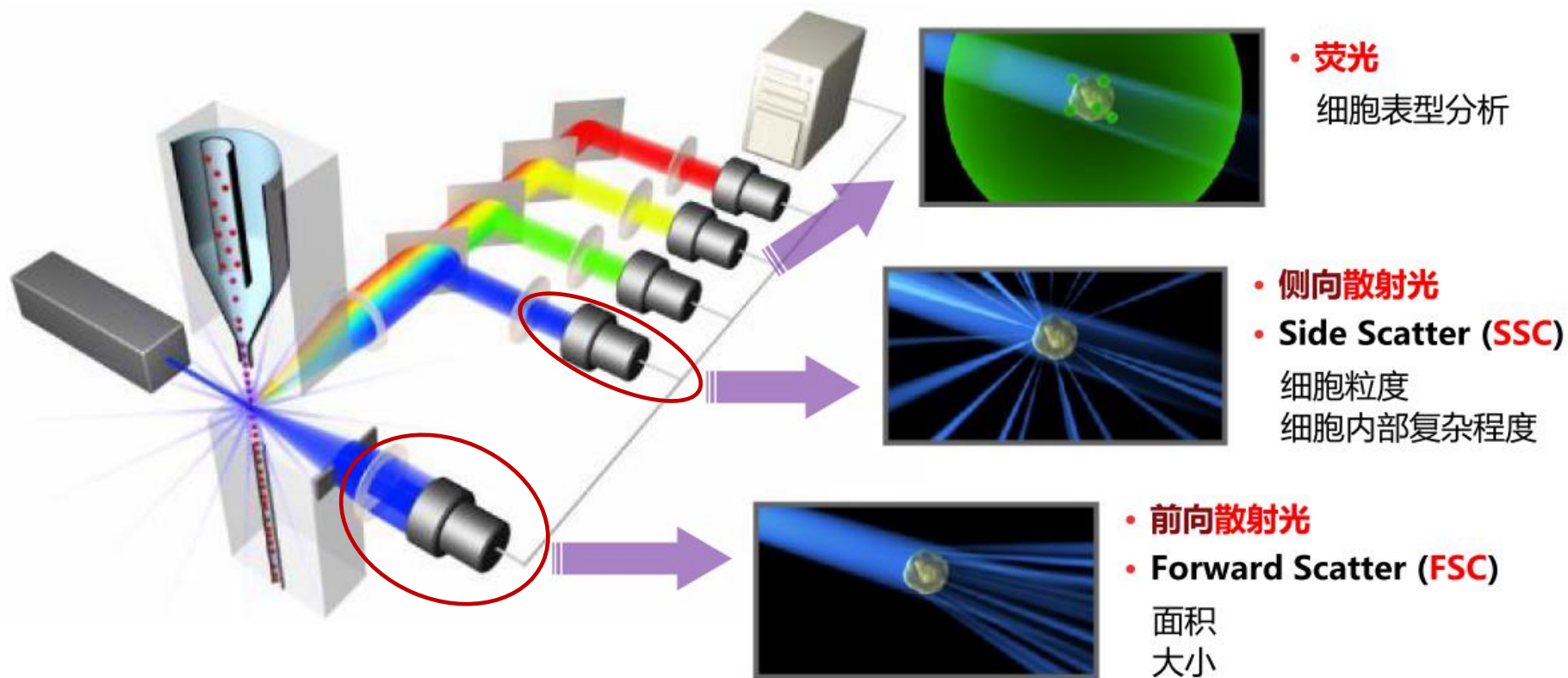
## 二、流式细胞分选的基本原理





# 1. 流式细胞仪的检测信号

流式细胞术对细胞的检测基于激光和免疫荧光技术，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。

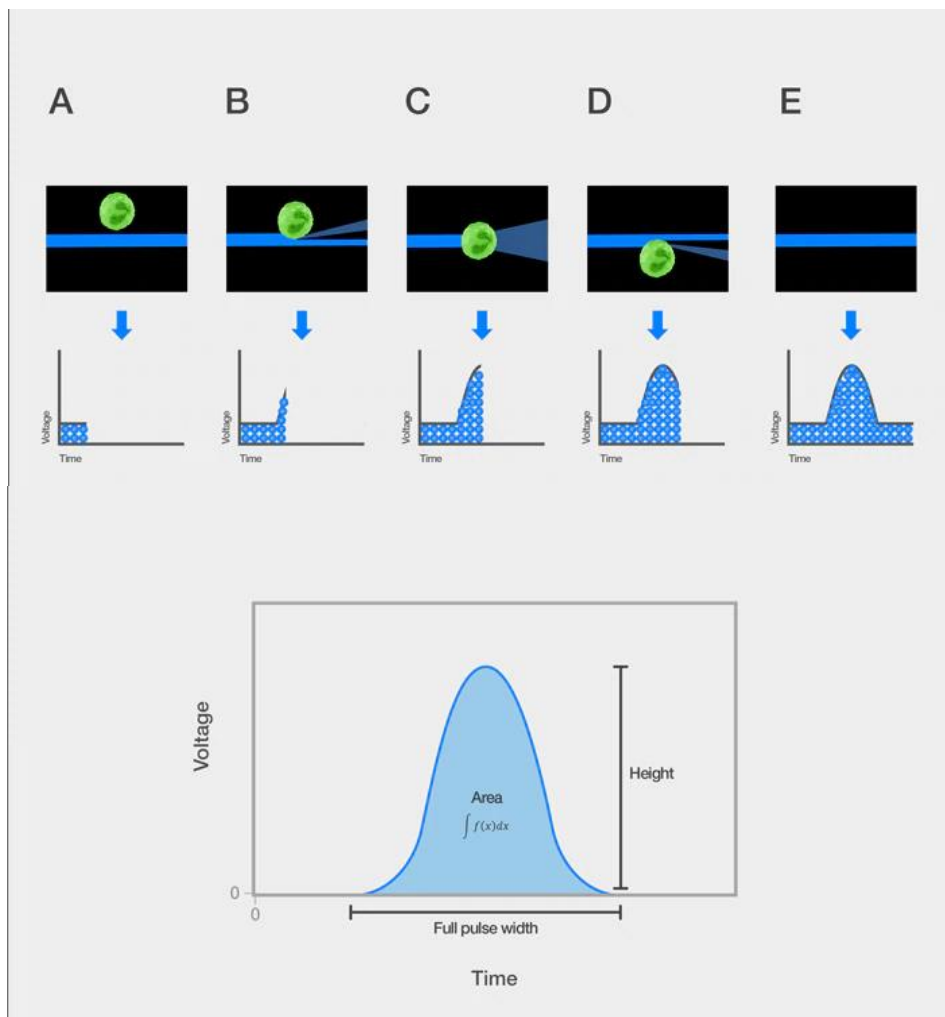


**NOTE:** 前侧向散射光信号 (FSC与SSC) 通常是由488nm激光器产生的。  
检测器PMT (光电倍增管) 工作电压越大, 输出的信号也越大。因此流式数据没有绝对意义





# 流式信号：脉冲信号



描述脉冲信号的三个参数：

(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

# 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

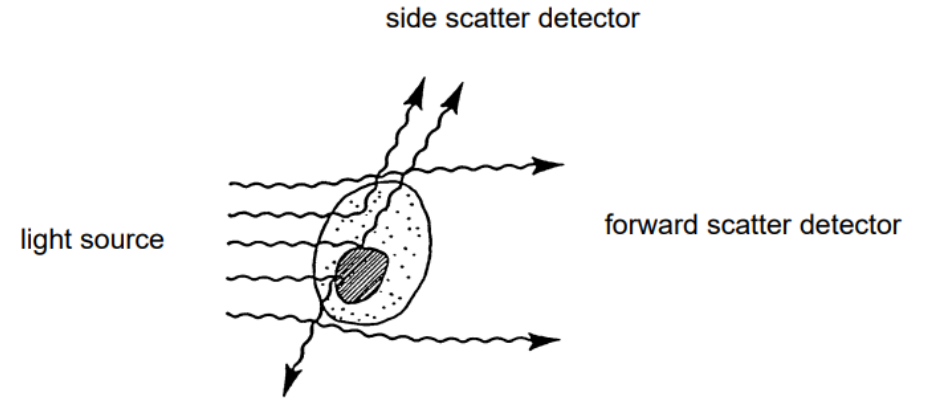
- Mie散射 (米氏散射)
- 细胞越大，前向散射光越强

(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

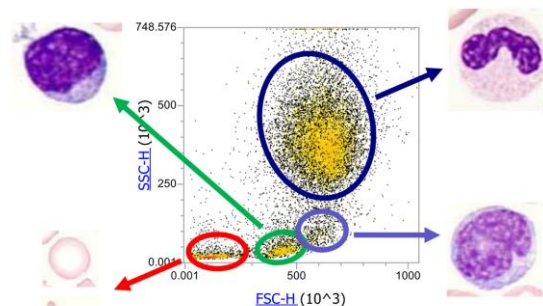
- FSC-SSC散点图：利用细胞大小和颗粒度初步区分细胞群
- FSC-SSC散点图：去除细胞碎片
- 去除粘连细胞：

FSC (A) -FSC (H)    SSC (A) -SSC (H)  
 FSC (H) -FSC (W)    SSC (H) -SSC (W)  
 FSC (A) -FSC (W)    SSC (A) -SSC (W)

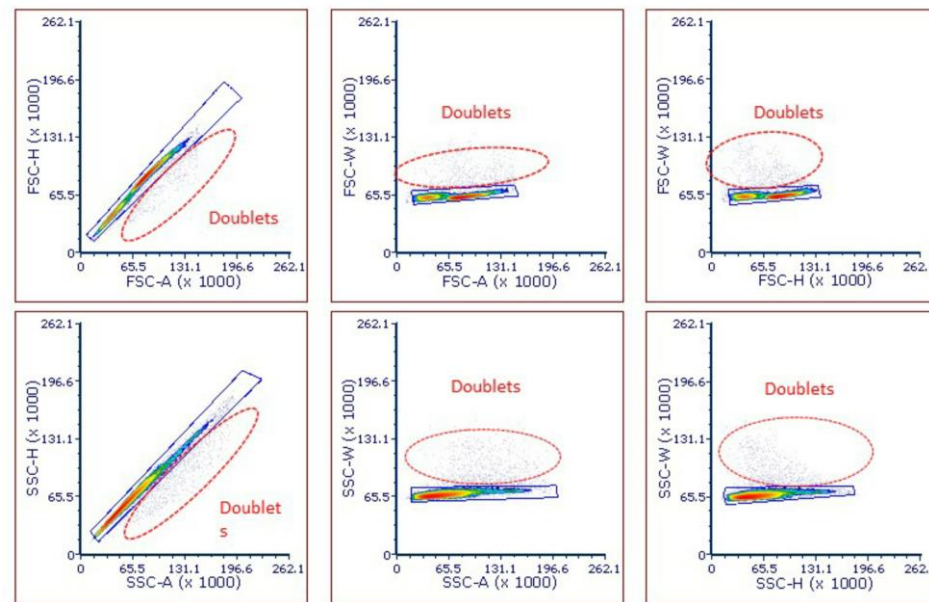
任一组合区分粘连细胞

正常运行的情况下，“粘连体”细胞是降低分选纯度的主要原因。

粘连体不能彻底排除



裂红后的血液样本



去除粘连细胞



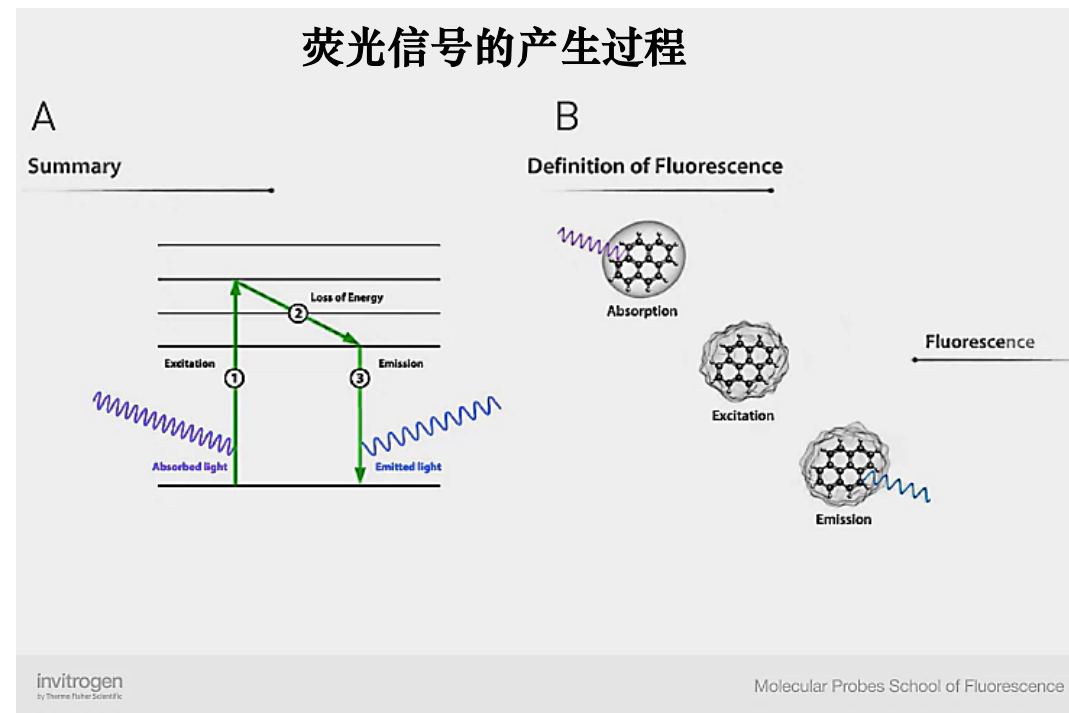
# 流式细胞术中的光信号：散射光和荧光

## ■ 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，激发态分子通过内转换过程把部分能量转移给周围电子，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，最常见的自发荧光分子是NADPH和核黄素等
- 自带荧光：水生生物，质粒转染的细胞等
- 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



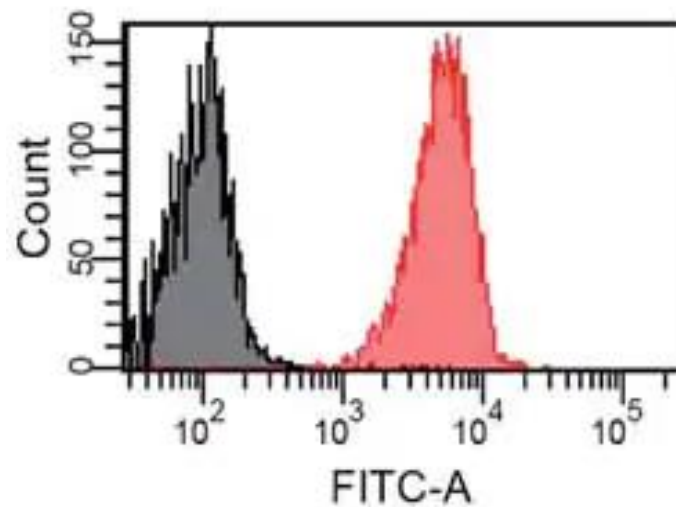
<https://www.thermofisher.com>



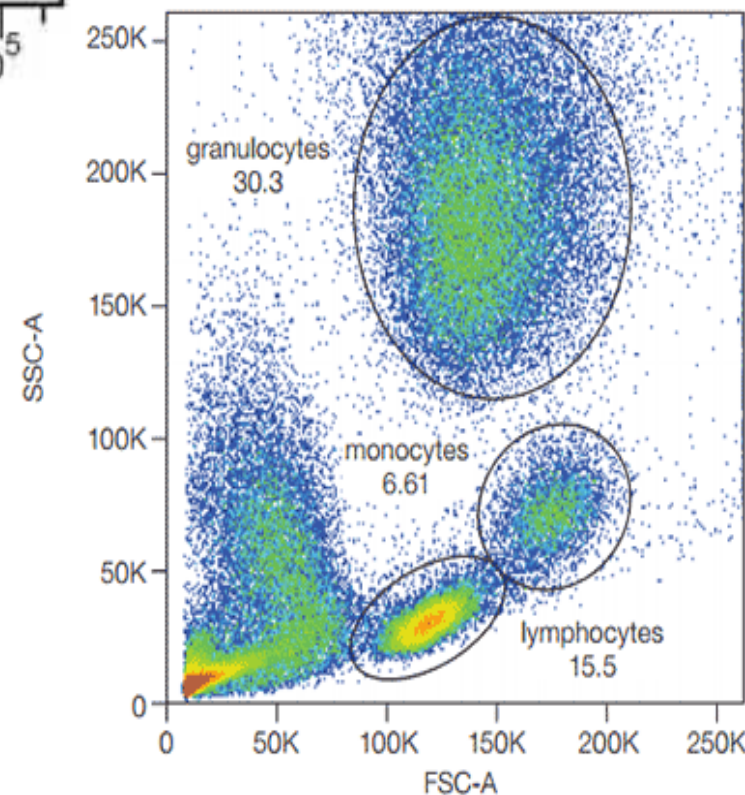


# 流式细胞术数据展示

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
↓	↓	↓	↓




柱形图



散点图





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



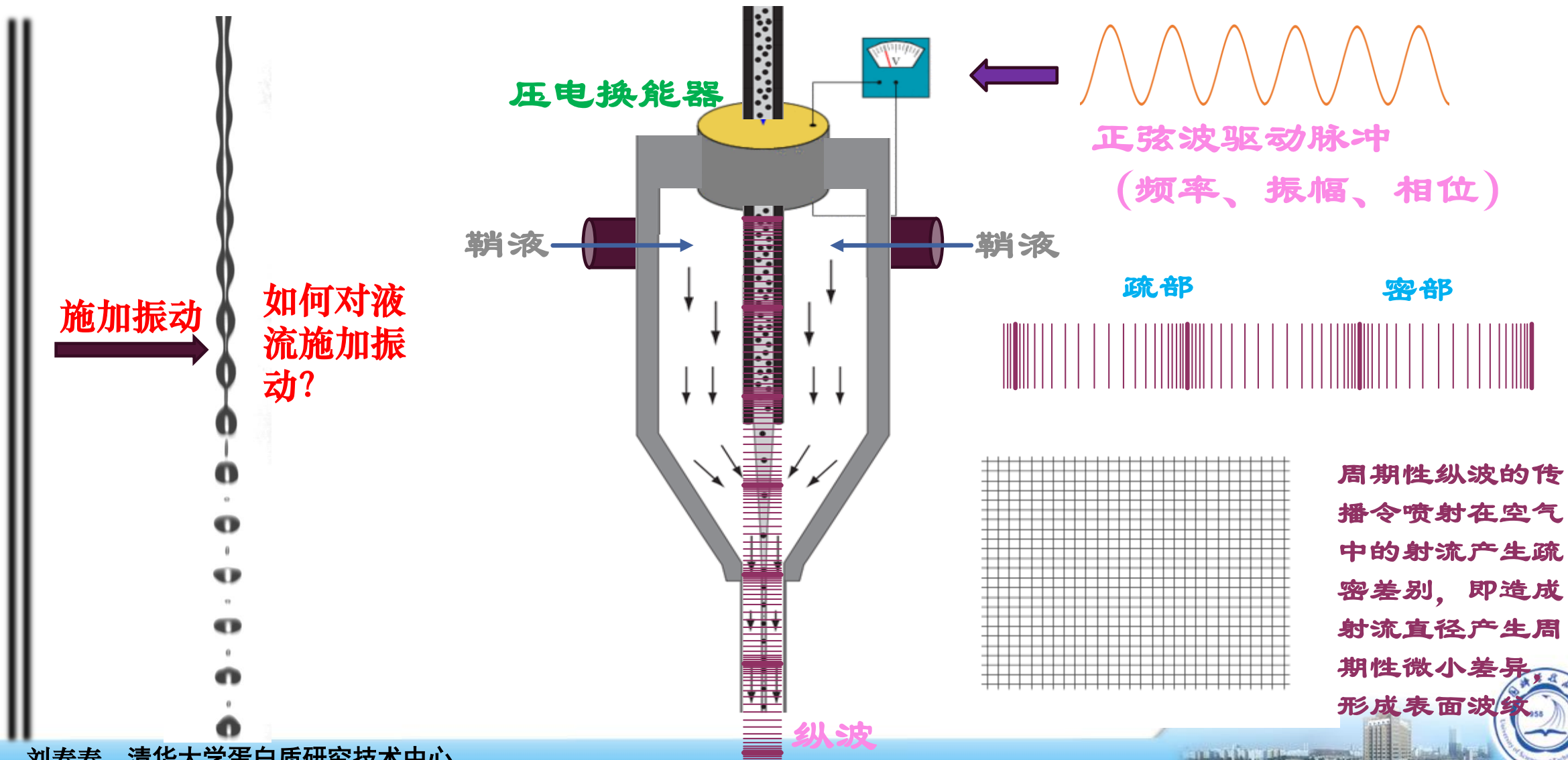


## 2、流式细胞分选原理

- 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



# 连续射流究竟是如何断裂成液滴的？





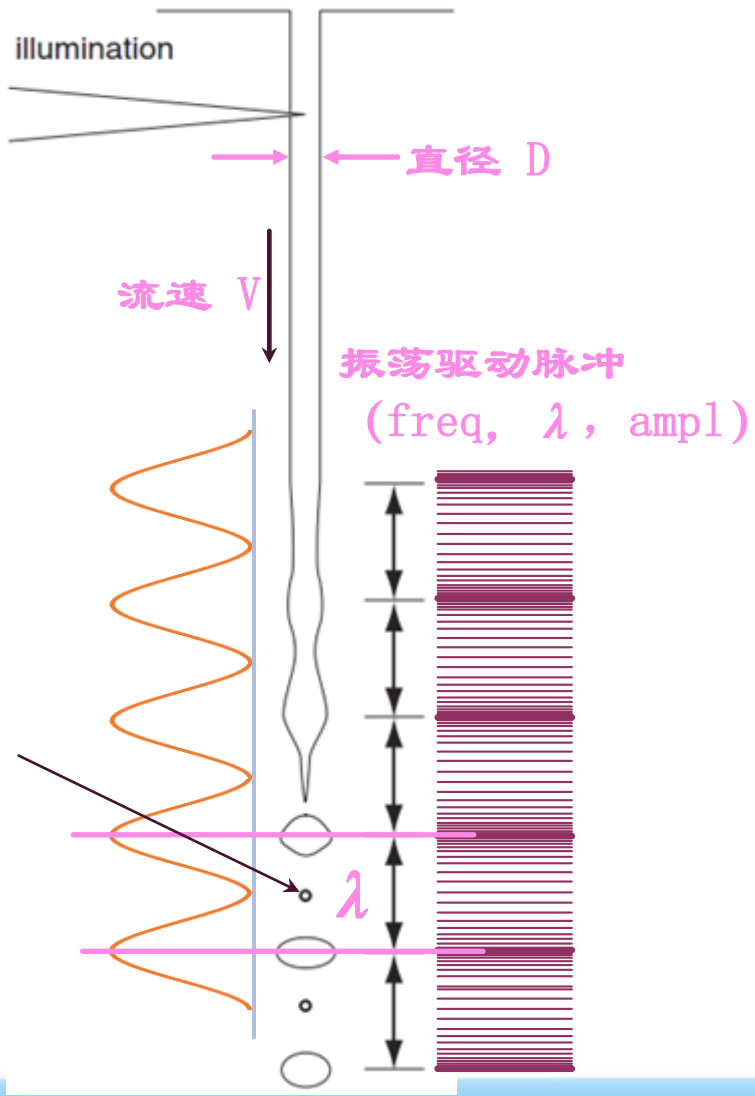


液流在空气中时，会有表面张力，它恒定倾向于收缩成球形，因此对表面波纹窄部形成持续牵拉，令密部逐渐缩成球形，从而在液流表面产生越来越显著的表面波纹，最终导致液流断裂成液滴。

表面波纹

可知，位于液滴断裂处的细胞可能影响液滴断裂和加电（大细胞用大喷嘴）；样本悬液过于黏稠将影响液滴断裂和细胞的液滴包被；

卫星液滴



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荡脉冲唯一决定液滴间隔，其振幅是控制射流断裂位置的重要因素。

液滴数/秒 = 振动频率  $f$  (KHz)

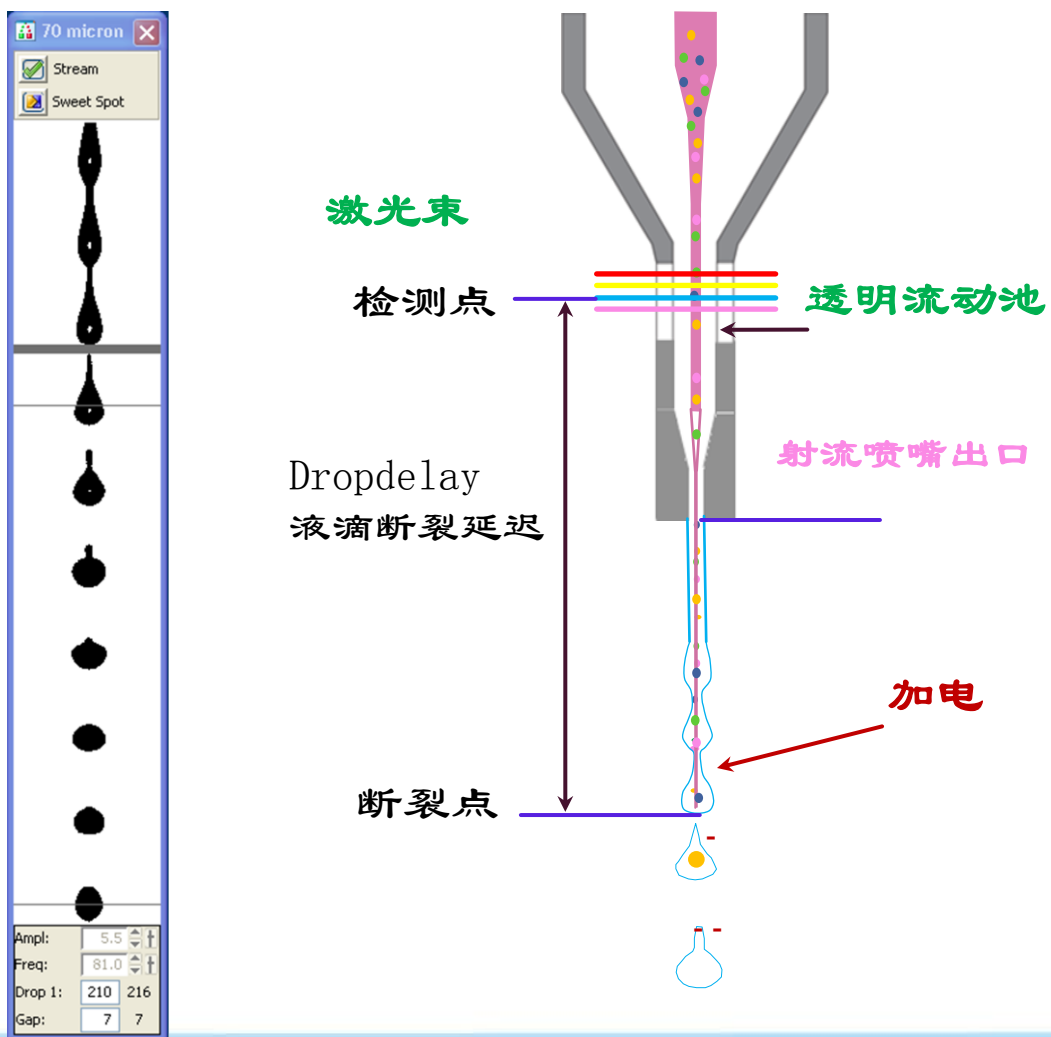
每个周期的时间  $T = 1/f$  (秒)

液滴间距离 = 波长  $\lambda = V/f$

形成最佳断点的条件：  
 $\lambda = 4.5D$



# 流式细胞分选原理-目标液滴加电

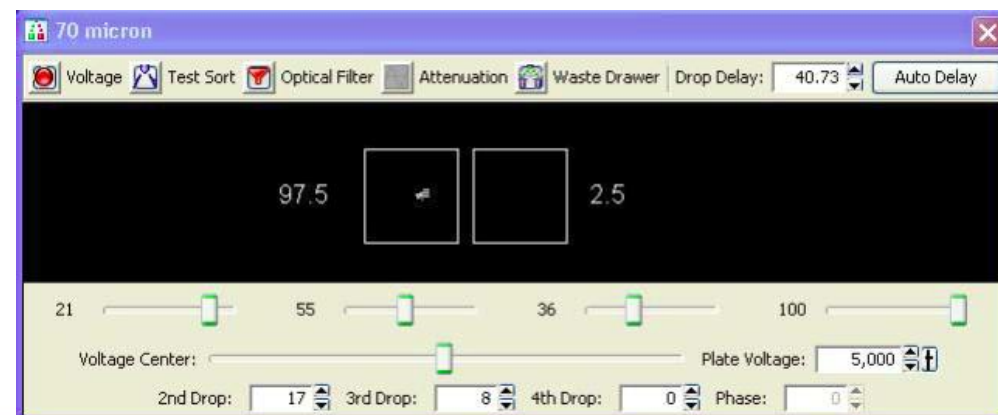


当液流从喷嘴射出后，经过高频振荡（ $f$ ， $\lambda$ 已知），形成稳定的液滴，即液流的断点维持在一个固定的位置。此时，检测点和液流断点之间的距离（ $d$ ）维持不变，Drop Delay值即可恒定。表示成震动周期数的液滴延迟：

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

**Dropdelay 是流式分选中最重要的参数**

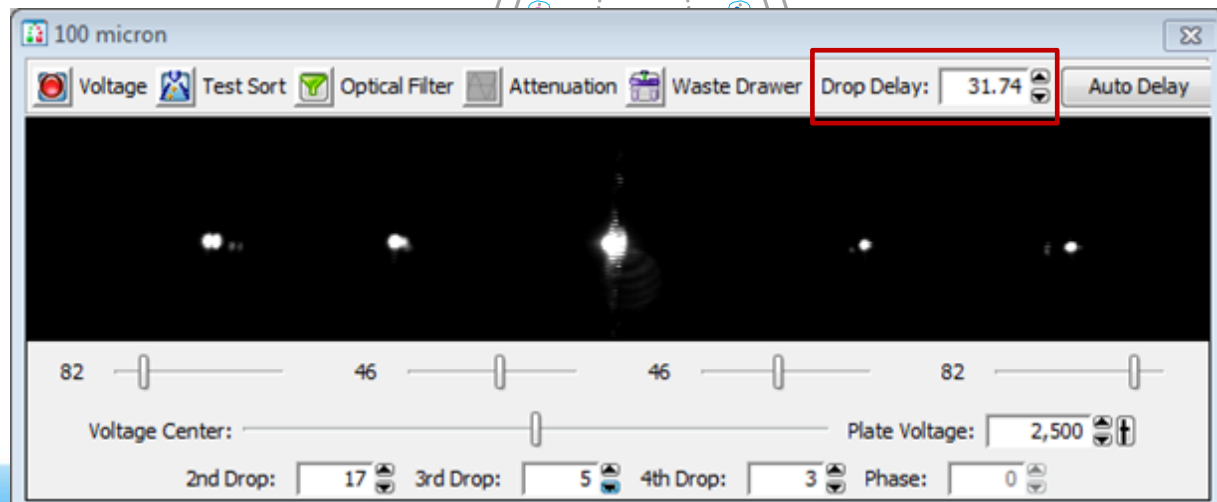
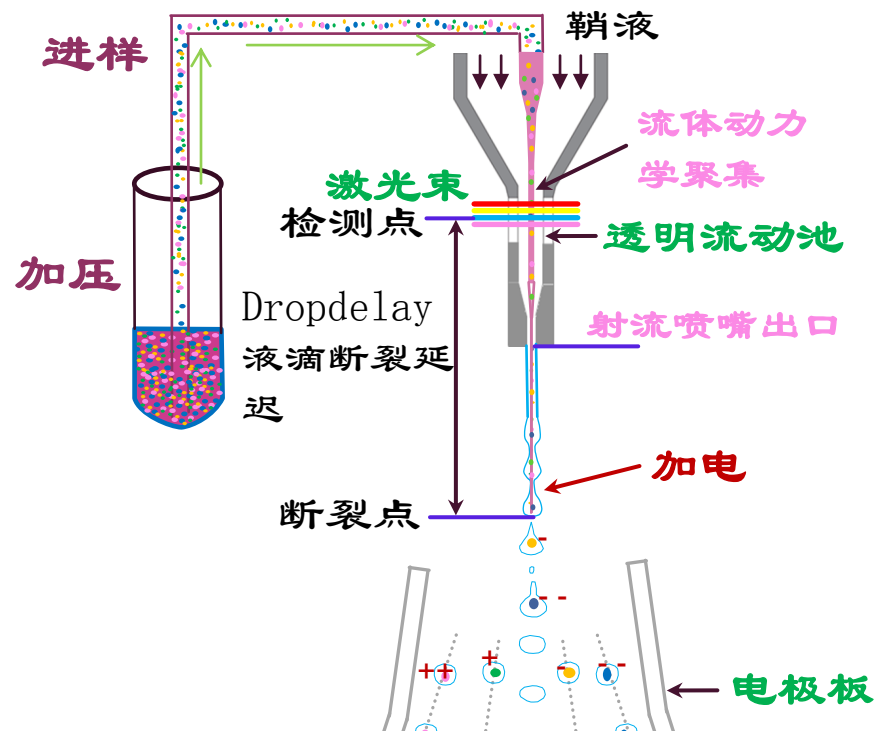
BD AccuDrop微球“试”出最佳延迟时间





## 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





### 三、影响分选结果的因素





# 1、衡量分选结果的指标

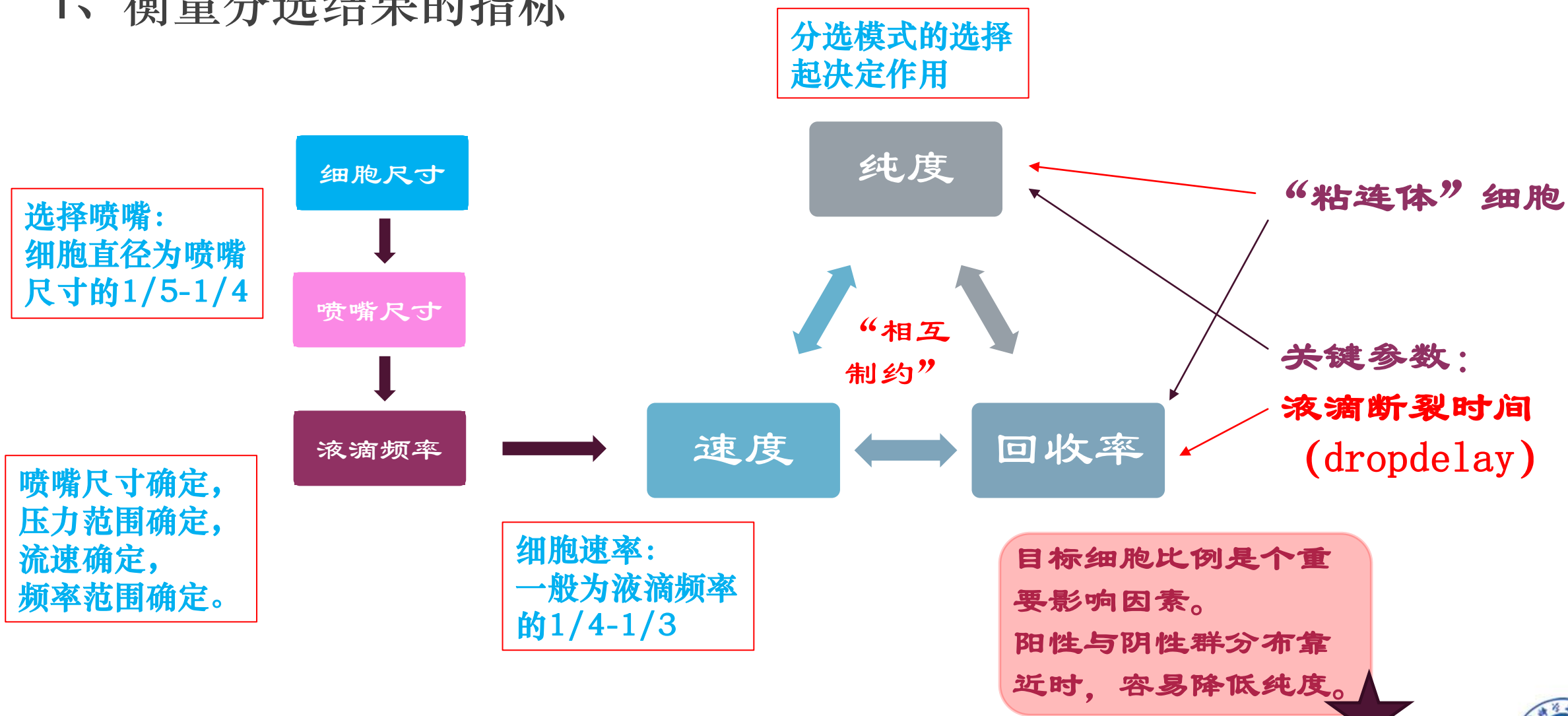
- **纯度**：目标细胞占分选后细胞的比例
- **效率 (efficiency)**：分选的目标细胞占检测的目标细胞的比例
  - **得率 (recovery rate)**：收集的目标细胞占检测的目标细胞的比例
- **分选速度**
- **细胞活率**：分选的目标细胞中活下来的细胞比例

**稳定的液流是一切分选的前提！**





# 1、衡量分选结果的指标





## 2、分选模式的选择

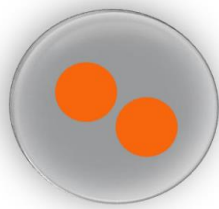
- BD FACS Aria 中，纯度从低到高依次为 yield（富集），purity（常用），4-way purity（三管以上的分选使用），single cell（孔板分选）

纯度要求越高，目标细胞被丢弃的比例越高。分选得率越低



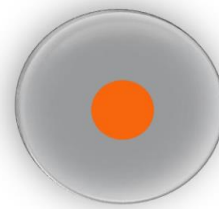
富集模式

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



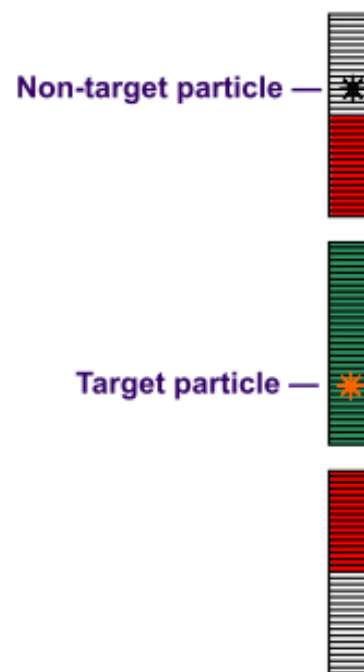
单细胞模式

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





## Purity Precision Mode



**Trailing**

Yield = 32

Purity = 32

Phase = 0

Single cell =

**Interrogated**

**Leading**

Is the target particle in  
this example sorted?







## 不同的分选模式因何而设?

考察目标液滴，  
考虑前后液滴要不要

考察前后液滴，  
考虑目标液滴要不要

考察目标液滴，  
确保细胞处在液滴中央

	Precision Mode					
	Purity	4-Way Purity	Yield	Single Cell	Initial	Fine Tune
Yield Mask	32	0	32	0	32	0
Purity Mask	32	32	0	32	0	0
Phase Mask	0	0	0	16	0	0
Single Cell				X		

2滴      1滴                      1滴

4-way purity: 只有不含有污染颗粒的液滴才可以被分选。Yield Mask 设定为 0，以确保临近液滴的残留电荷不会降低侧液流的质量。该模式建议用于需要精确偏转的 4 路分选中。





### 3、分选速度——喷嘴大小的选择

Nozzle Diameter ( $\mu\text{m}$ )	Velocity (m/s)	Pressure (PSI)	Droplet Rate (kHz)
50	46.0	162.6	204.4
70	32.8	84.9	104.3
100	23.0	43.6	51.1
125	18.4	29.3	32.7
150	15.3	21.6	22.7
200	11.5	13.9	12.8
250	9.2	10.3	8.2
300	7.6	8.4	5.7
400	5.7	6.4	3.1

Table 6-1. Safe speed limits for sorting based on Reynolds number calculations (thanks to Ruud Hulspas).

(Shapiro, Howard M. Practical flow cytometry. 4<sup>th</sup> edition. John Wiley&Sons. 2003)

喷嘴越小，可以采用更高的鞘液压力和更高的驱动频率，有利于得到更高的分选速度和得率，但对细胞损伤更大。根据实验限制和诉求，选择喷嘴以优化活性或速度、效率

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

上样速度 (events per second) 通常控制在液滴频率的1/3-1/4。





## 4、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





# I、样本准备

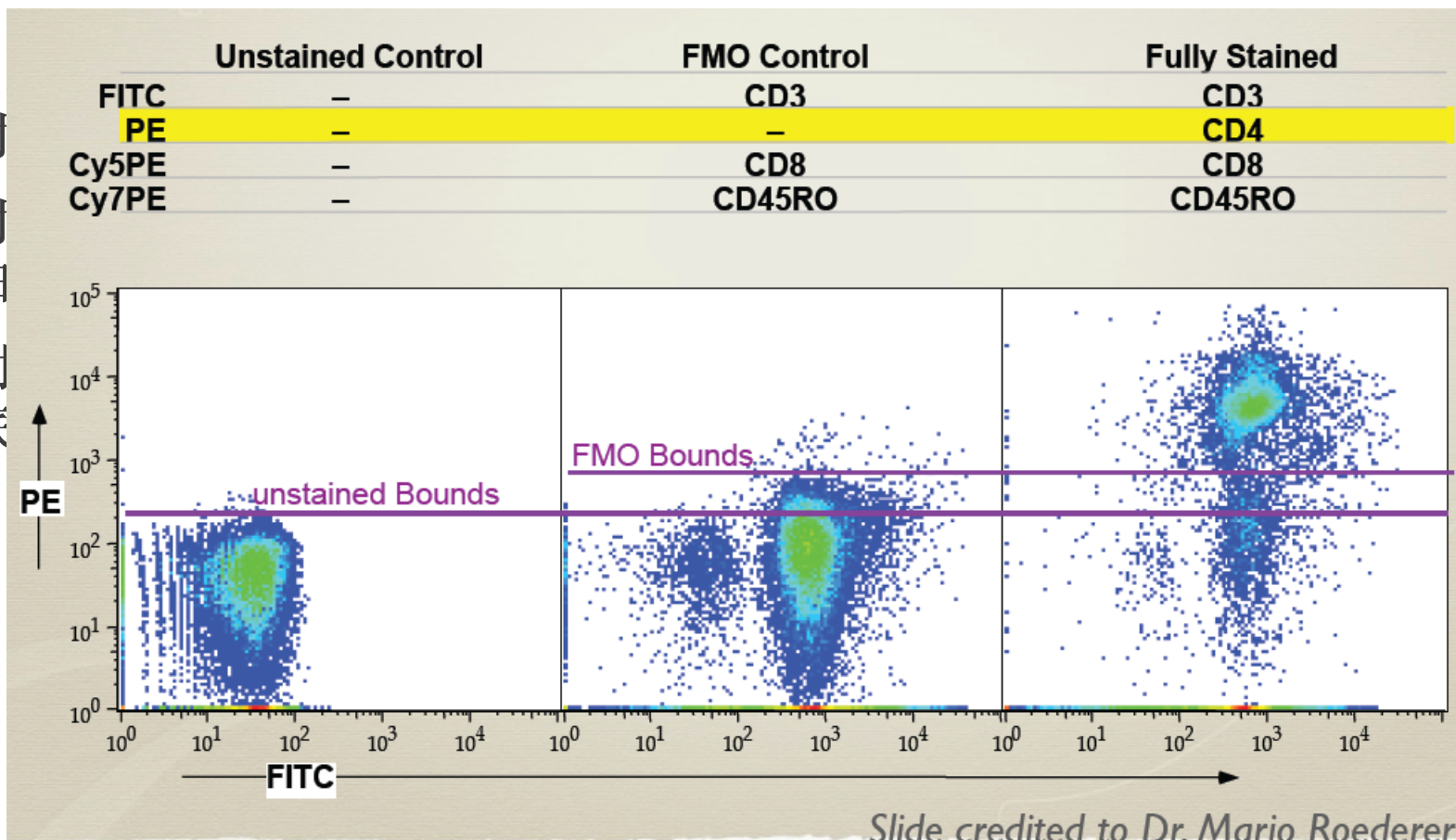
- 荧光配色，各种对照的准备，荧光补偿计算，圈门与流式分析一致。具体可参见流式细胞原理培训资料
- 待分选样本需制成单细胞悬液：
  - $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  cells/ml，上样前200目过滤（比较粘的样品，自带纱网，上样前现场再过滤一遍）
    - ✓ 建议高细胞浓度，低上样速度
  - 推荐重悬液：DPBS/HBSS + HEPES (10-25mM) + 2%BSA/FBS
  - 重悬液中可适当添加EDTA (1-5mM) 和/或DNAase (20-200ug/mL) 以防止聚集成团
  - 使用核酸死活染料 (PI, 7-AAD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、对照管——确定阳性细胞群

- 空白对照
- 同型对照球蛋白
- FMO对照光本底



球蛋白及亚型的免疫  
未加抗体的通道的荧





### 3、单染管要求——调补偿

所有荧光染料各自做一个单标，所使用的单标至少和实验所用的抗体信号一样强或更强

- 一定要有**明显的阳性群**
  - 最好有**明显的阴性群**
  - 阳性峰细胞**数量足够**
- 抗原表达很弱；抗原表达缺失；细胞数有限；可以用相同荧光标记的其他强表达抗体或微球替换

**建议：用单染管调电压。确定好电压后，再调补偿。**  
**注意：补偿调好后，荧光通道电压不可改变**





## 4、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。但是离心回收时可能会损失比较多的细胞
  - 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。







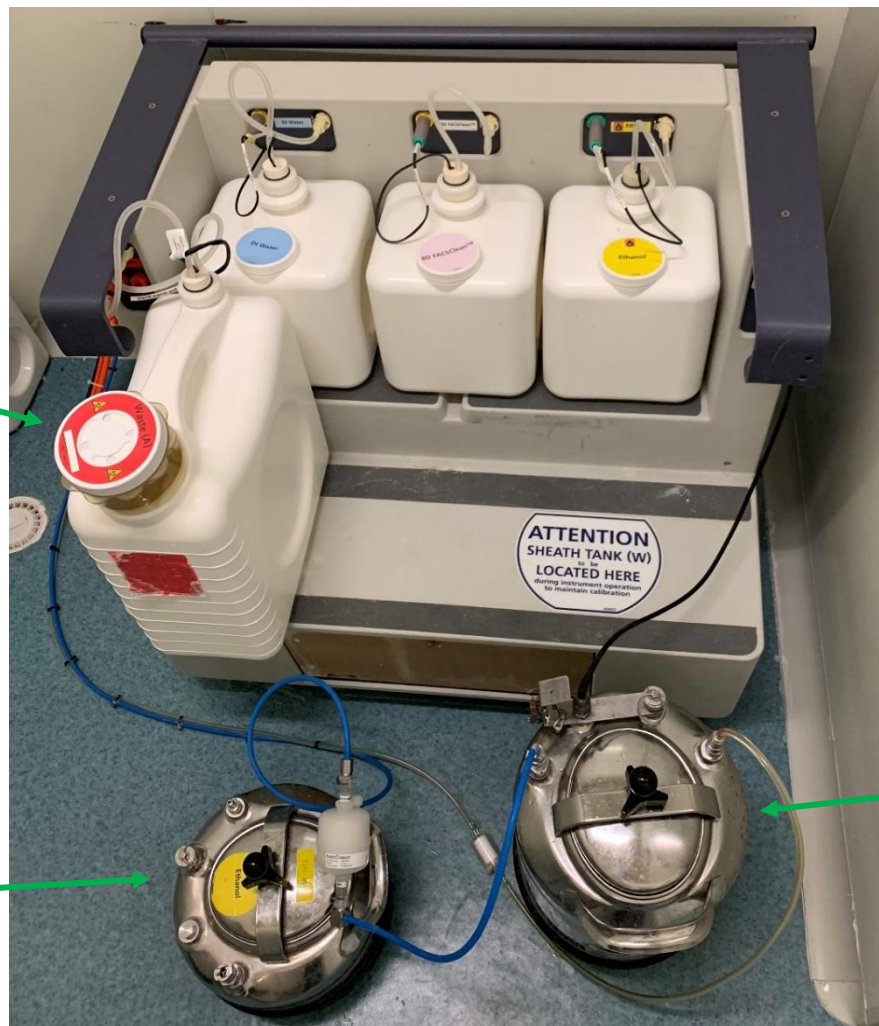
## 五、BD FACSAria III 仪器结构和参数设置



# 1、仪器结构-液流车

清空废液桶后加入  
150~200mL 84消毒液

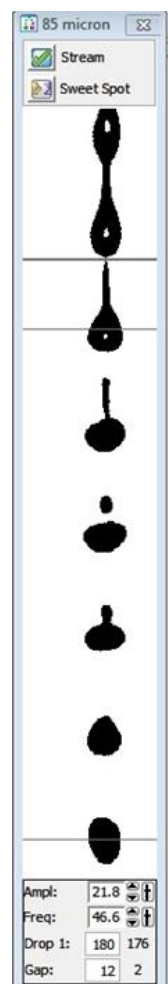
酒精桶，内装75%  
乙醇溶液，用于执行  
shutdown程序，  
为液流管路灭菌



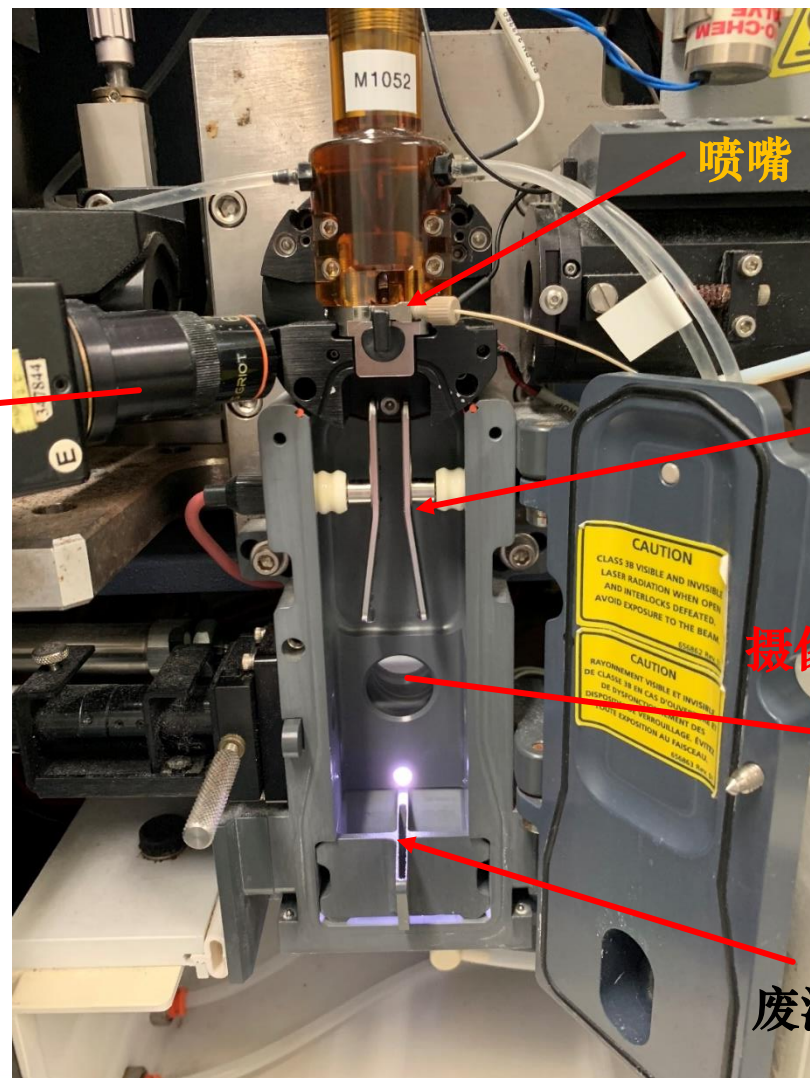
鞘液桶，内装灭菌过滤  
的IX PBS。需要注意，  
鞘液装入鞘液桶时必须  
凉至室温。



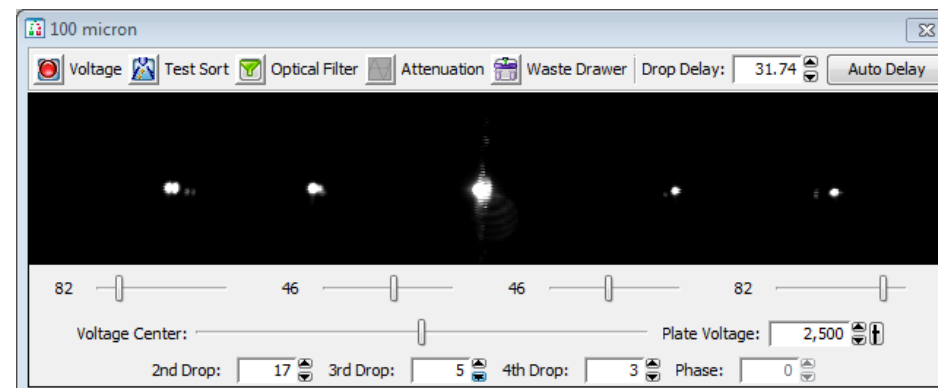
# 1、仪器结构-分选模块



断点窗口



电极板



侧液流窗口



## 2、软件界面

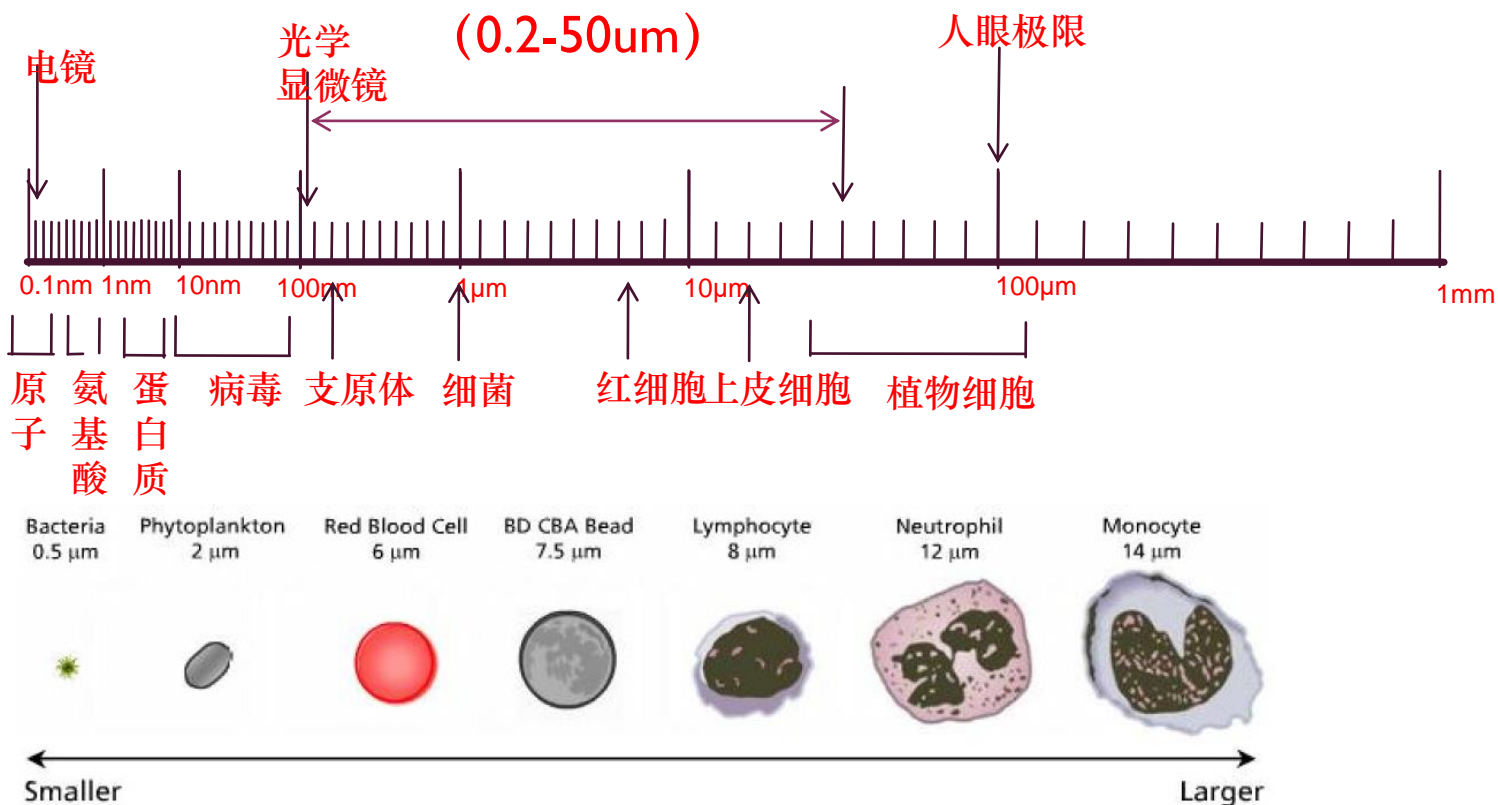
The screenshot displays the BD FACSDiva software interface, which is divided into several functional areas:

- Browser, 实验管理 (Browser, Experiment Management):** A tree view on the left side of the interface for navigating through folders and experiments.
- Cytometer, 参数设置 (Cytometer, Parameter Settings):** A central window showing a table of parameters for the cytometer, including Voltage, Log, A, H, and W.
- Worksheet, 实验结果展示 (Worksheet, Experiment Results Display):** A window on the right showing a flow cytometry plot with 'Count' on the y-axis and 'FSC-A' on the x-axis.
- Acquisition dashboard, 实验操作控制面板 (Acquisition Dashboard, Experiment Operation Control Panel):** A window at the bottom center providing real-time acquisition data and control buttons.
- Sort Layout, 分选设置 (Sort Layout, Sorting Settings):** A window at the bottom right for configuring sorting parameters like Device, Precision, and Target Events.
- 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 window at the bottom left for adjusting flow parameters.
- 断点窗口 (Breakpoint Window):** A vertical window on the far right showing a series of droplet images and associated numerical data.



### 3、选择喷嘴大小

- 根据细胞尺寸和实验要求选择分选喷嘴的尺寸：细胞大小一般不超过喷嘴尺寸规格的1/4~1/5。（相对过大的细胞即使不堵塞喷嘴，也容易造成液流断点不稳定、使得侧向液流束散开）



红细胞、淋巴细胞 (T)、单核、粒细胞、酵母可以使用70µm 分选喷嘴；

脾脏/骨髓细胞、293T等可以使用85µm 分选喷嘴；

DC、NK、Hela、H1299等及易粘附细胞可使用100µm分选喷嘴；

脆弱细胞/严格要求高活性的实验，如神经干、MSC等，可以使用120µm或以上分选喷嘴；分选后马上进行功能检测，也应使用大喷嘴低鞘液压力。

(1µm以下微小颗粒检测，使用100µm或以上喷嘴更有助于提高检测效果。)





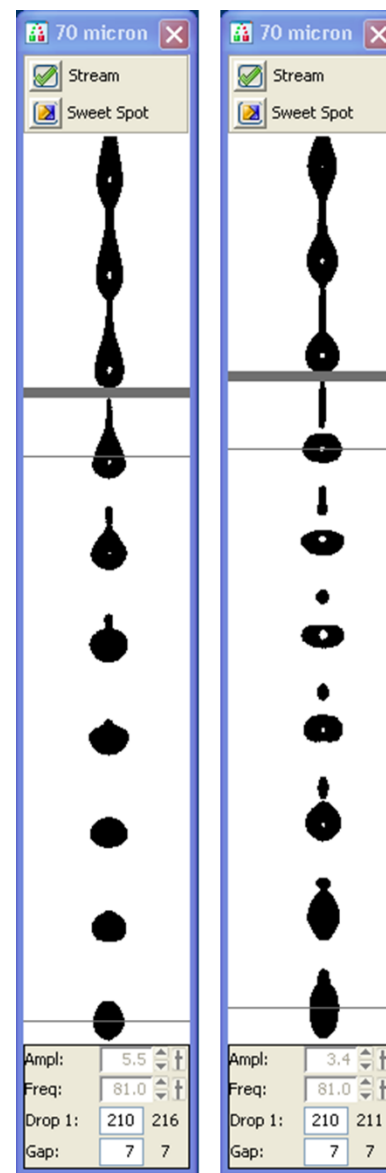
## 4、仪器设置

选择合适的喷嘴并设置对应的鞘液压力  
“Cytometer Configuration”

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。

上样速度 (events per second) 通常控制在液滴频率的1/3-1/4。



关注断裂液滴的形态是否正常！卫星滴是否在视野内融合（喷嘴本身的制造、安装、洁净度、鞘液压力控制等。液滴形状也可能受频率、振幅影响！）



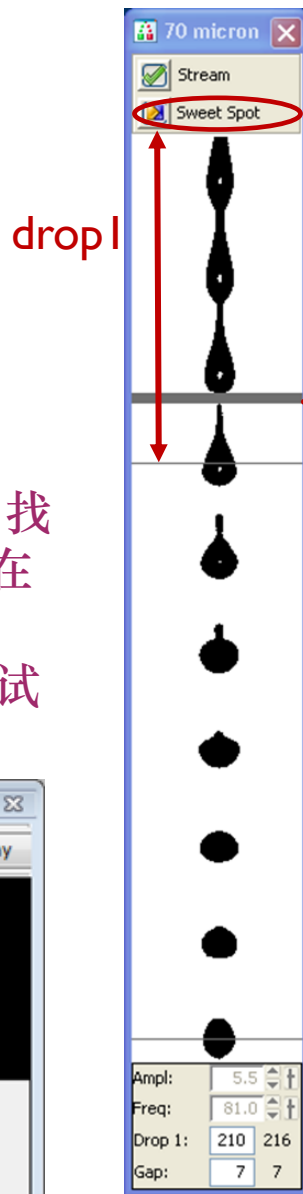
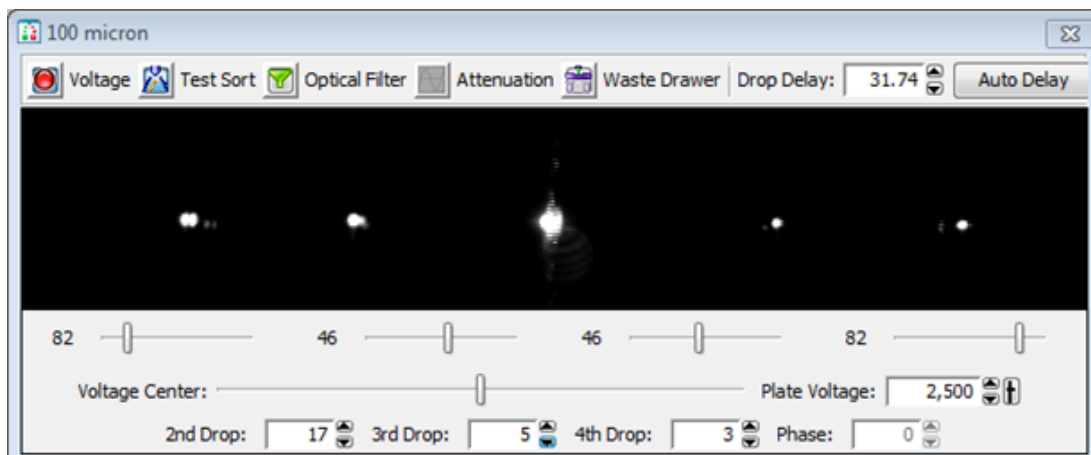
## 5、液流调节（稳定的液流是分选的前提）

推荐值

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

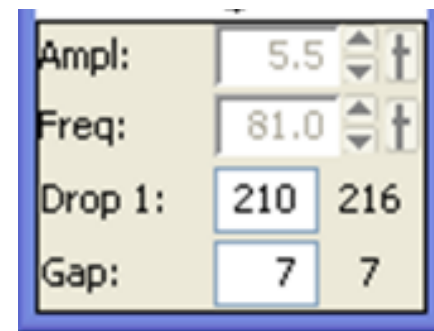
- （新机器）Ampl保持不变，Freq从推荐值开始向上或向下调节，找到drop l的最小值，该频率就是优化频率，然后调节Ampl让细线在屏幕的三分之一处（150~200），gap值在10左右。
- Freq不动，调节Ampl让drop l与gap值与目标值相互吻合。分液测试结束，将drop l的实际值填入目标值中，然后锁定液流。

侧液流窗口



锁定液流：仪器会微调Ampl，甚至Freq让drop l以及gap保持吻合

断点窗口



(+/-) 10%  
(+/-) 1~2



## 6、分选设置

The screenshot shows a software window titled "Global Sheet1: Sort Layout\_004". It contains several control elements:

- Device:** 2 Tube
- Precision:** Purity (with a dropdown menu open showing options: Purity, Yield, Single Cell, Initial, Fine Tune, 4-Way Purity)
- Target Events:** Continuous
- Save Sort Reports:** Ask User
- Save Conflicts:**
- Index Sorting:**
- Left/Right:** Labels for the two sorting channels.
- Sort Rate:**
- Confl. Cnt:**
- Confl. Rate:** NA
- Efficiency:** NA
- Buttons:** Sort (green), Pause (grey), Home (blue), and View Counters (grey).

**Purity:** 纯度（常用，保证纯度）

**Yield:** 富集（牺牲纯度，保证得到的细胞个数）

**Single cell:** 常用于孔板分选，分选要求比purity更高，因此会牺牲更多的细胞

**4-way purity:** 用于精准四路分选，保证分选的侧液流集中。较纯度模式，牺牲得率





# 分选设置

Global Sheet1: Sort Layout\_001

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

	Left	Right
		P3 : 34779
Sort Rate:	NA	13 evt/s
Confl. Cnt:	NA	13876 evt
Confl. Rate:	NA	5 evt/s
Efficiency:	NA	71%

Sort    Resume    View Counters

- 目标细胞占比小，目标细胞周边杂信号多(比如细胞碎片等)，被丢弃的细胞就多，分选效率低
- 上样速度快，目标细胞周围遇到杂信号的几率变大，分选效率也会变低。



## 7、参数设置——通道与电压

Cytometer - FACSAriaII (1)

Status Parameters Threshold Laser Compensation Ratio

Parameter	Voltage	Log	A	H	W
FSC	250	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
SSC	300	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
FITC	500	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PE	500	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PerCP-Cy5-5	500	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

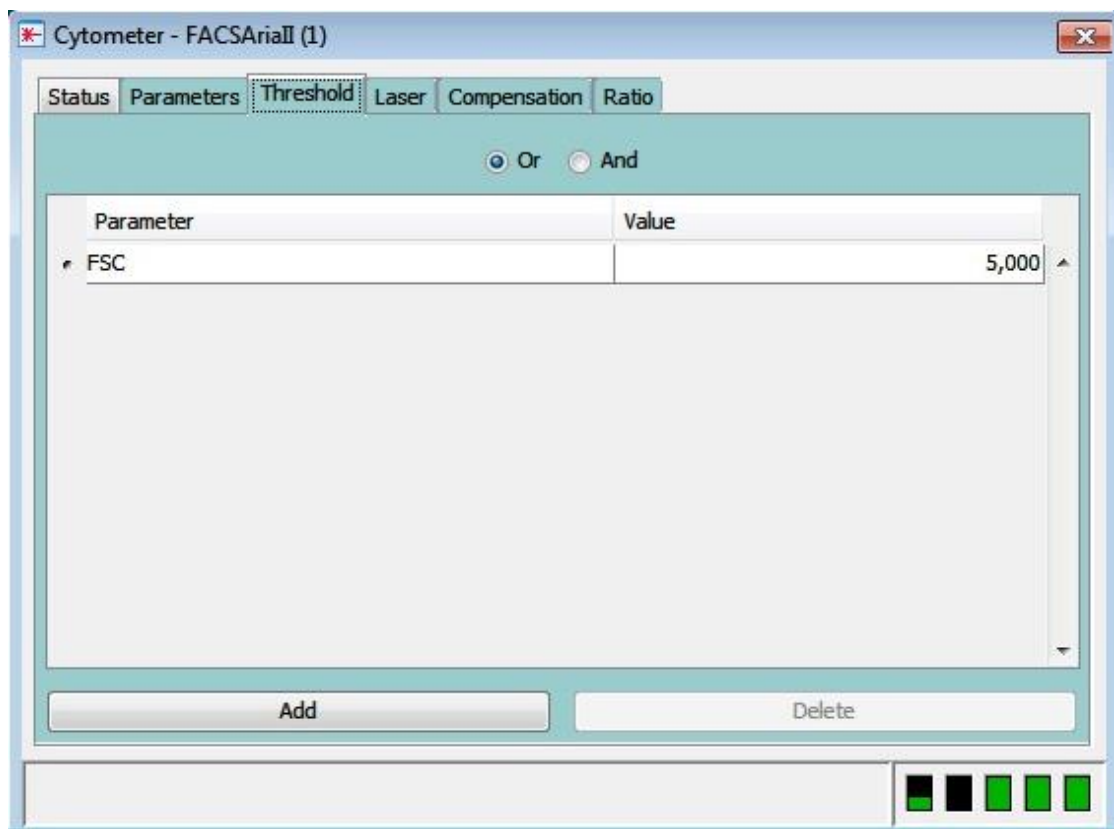
Add Delete

■ ■ ■ ■ ■

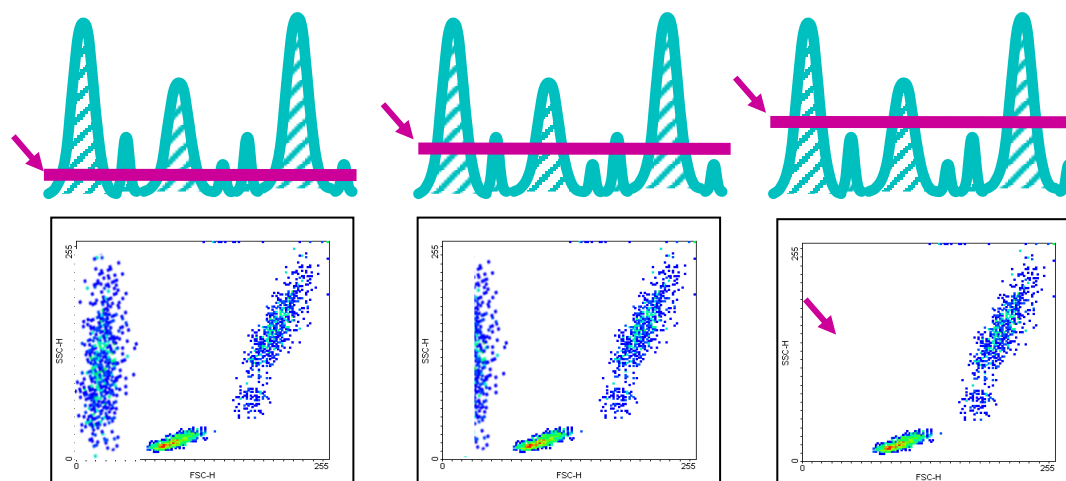




# 参数设置——阈值



阈值高低可能会影响纯度、效率



设置阈值去除小颗粒，提高细胞比例，有助于提高分选效率；但并不代表小颗粒被物理的去除了，仪器“看不见”，它就会进入分选样本中。



# 参数设置——补偿

Cytometer - FACSariaII (1)

Status Parameters Threshold Laser Compensation Ratio

Enable Compensation

Fluorochrome	- % Fluorochrome	Spectral Overlap
• PE	FITC	0.00
• PerCP-Cy5-5	FITC	0.00
• FITC	PE	0.00
• PerCP-Cy5-5	PE	0.00
• FITC	PerCP-Cy5-5	0.00
• PE	PerCP-Cy5-5	0.00

■ ■ ■ ■ ■





## 注意事项

- **关于无菌分选：**新装机的五激光分选流式无菌状态相对会好一些。三激光的仪器，我们通常会在每周二上午做一次无菌清洗。做无菌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。





## 安全守则

- 实验室严禁饮食。一旦发现，停用仪器两周。
- 使用平台仪器必须如实填写样本来源及其他要求的信息。目前实验室不具备检测人类感染性样本的条件。如有意隐瞒，邮件通知PI，终身禁用流式平台所有仪器。PI需对本课题组研究内容的生物安全性负责。
- 操作仪器时需要佩戴手套。
- 使用仪器过程中一旦出现不正常的声音、气味、火光等，须立即停止实验报告管理员。

