分子与细胞分析技术研发部

提供蛋白分离纯化，定量等生物大分子服务；提供流式细胞仪的培训、流式细胞分析和分选等服务

- 全自动蛋白纯化仪
- 生物分子互作仪
- 流式分析细胞仪
- 流式分选细胞仪

负责人：张兰　19979719245

管理员：曾泰　17770705853

1、BD FACS Canto II流式分析仪

仪器基本信息及功能应用：

1、型号：BD FACS Canto II

2、房间号：第五实验楼206

3、管理人员：曾泰

4、功能应用：可以测量细胞大小、内部颗粒的性状，还可以检测细胞表面和细胞浆抗原、细胞因子、细胞内DNA、RNA含量等，从细胞表面尺度到细胞内部基因组尺度都具有重要作用。并且可对群体细胞在单细胞水平进行分析，在短时间内检测分析大量细胞，并收集、储存和处理数据，对同一个细胞进行多参数多角度定性定量分析。

2、 BD Accuri C6 plus流式分析仪

仪器基本信息及功能应用：

1、型号： BD Accuri C6 plus

2、房间号：第五实验楼206

3、管理人员：曾泰

4、功能应用：广泛用于生物学基础研究与临床应用，在免疫学、遗传学、血液学、肿瘤学、植物学等领域内发挥着重要的作用。流式细胞仪作为生命科学研究和诊断的高端开发型实验仪器，为微观认识细胞和细胞生命活动、了解疾病发生机理和进行药物开发、研究纳米材料与细胞的相互作用等提供了理想的检测和分析手段。

3、BD FACS AriaIII流式分选仪

仪器基本信息及功能应用：

1、型号：BD FACS AriaIII

2、房间号：第五实验楼206

3、管理人员：曾泰

4、功能应用：广泛应用于单细胞或其他生物粒子的定量分析和分选，不但可以定性、定量分析细胞膜、细胞质和细胞核中的各种细胞成分，而且可以研究细胞的各种功能状态，借助其分选系统，可将具有特定形状或功能的细胞从混合细胞群体中分离出来，再进行分析或培养。

其他主要仪器

AKTA Pure

荧光定量PCR

超高灵敏化学发光成像系统

生物分析相互作用分析仪

流式技术平台-BD FACS Canto II流式分析仪

BD FACS Canto II流式分析仪

1.1 BD FACS Canto II流式分析仪的原理

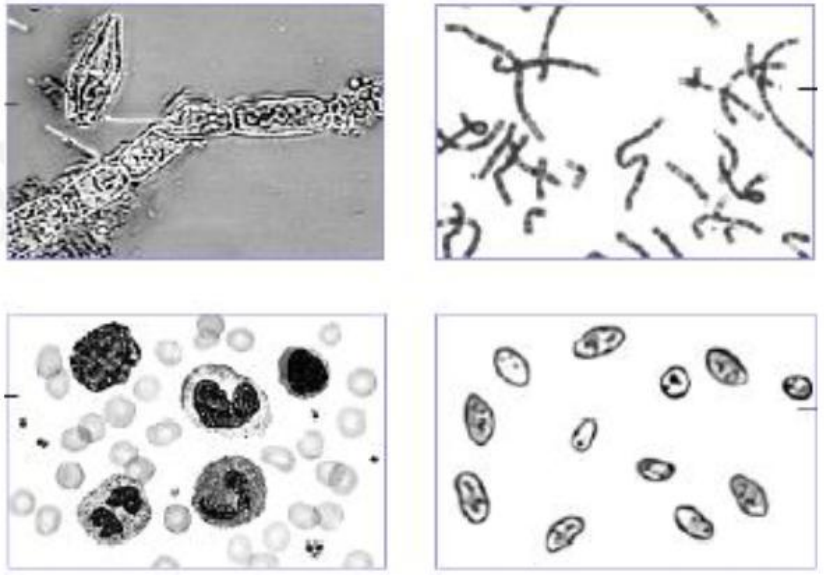
1.2 BD FACS Canto II流式分析仪的操作及注意事项

1.3 BD FACS Canto II流式分析仪的应用及例子分析

BD FACS Canto II流式分析仪的原理

流式细胞术的基本概念

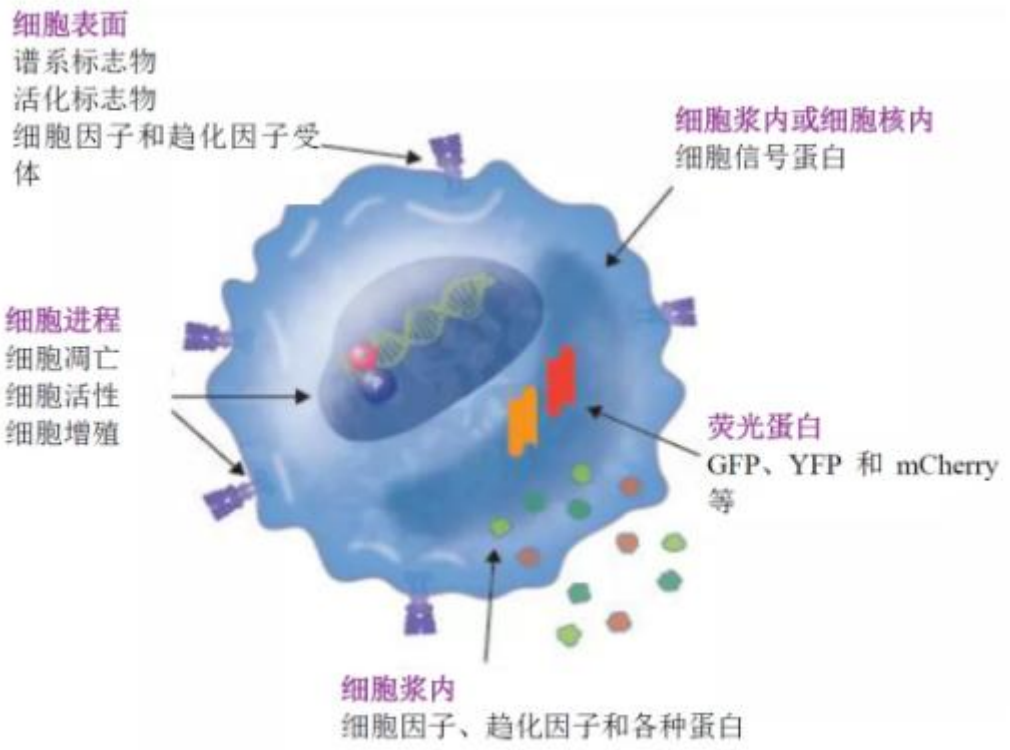
流式细胞术（Flow Cytometry，简称FCM）就是利用流式细胞仪对处于快速直线流动状态中的单列细胞或生物颗粒进行逐个、多参数、快速的定性、定量分析或分选的技术。



流式检测的样本

- **可检测的样本种类多样：**
  - ✓ 各种细胞（如外周血，骨髓，细针穿刺，灌洗液，实体组织，悬浮或贴壁培养的细胞），微生物，人工合成微球等
  - ✓ 血清、血浆、培养上清、细胞裂解液
- **样本制备：**
  - ✓ 单细胞悬液（天然，机械研磨/消化）
  - ✓ 5×10^5～1×10^7cells/ml，约0.5～1ml，300目筛网过滤

流式细胞仪可以告诉我们哪些信息？

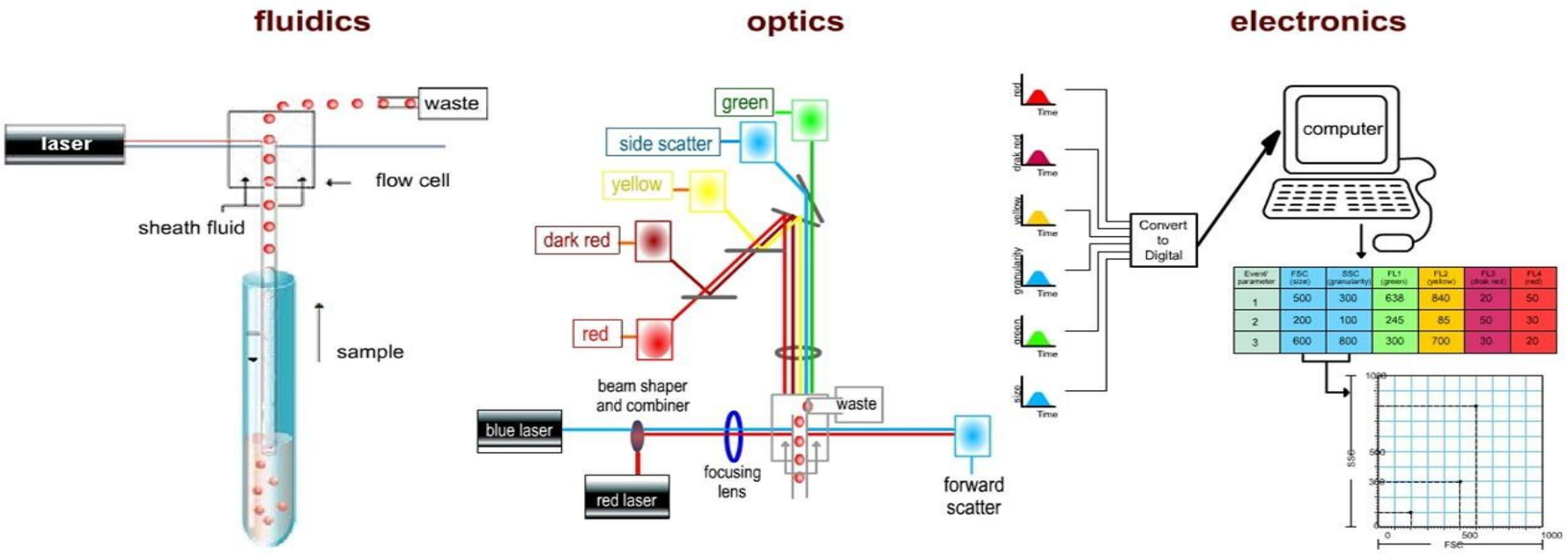


- 微粒大小
- 微粒结构
- 表面抗原
- 胞内抗原
- 核内抗原
- 核酸
- 分泌蛋白
- ……

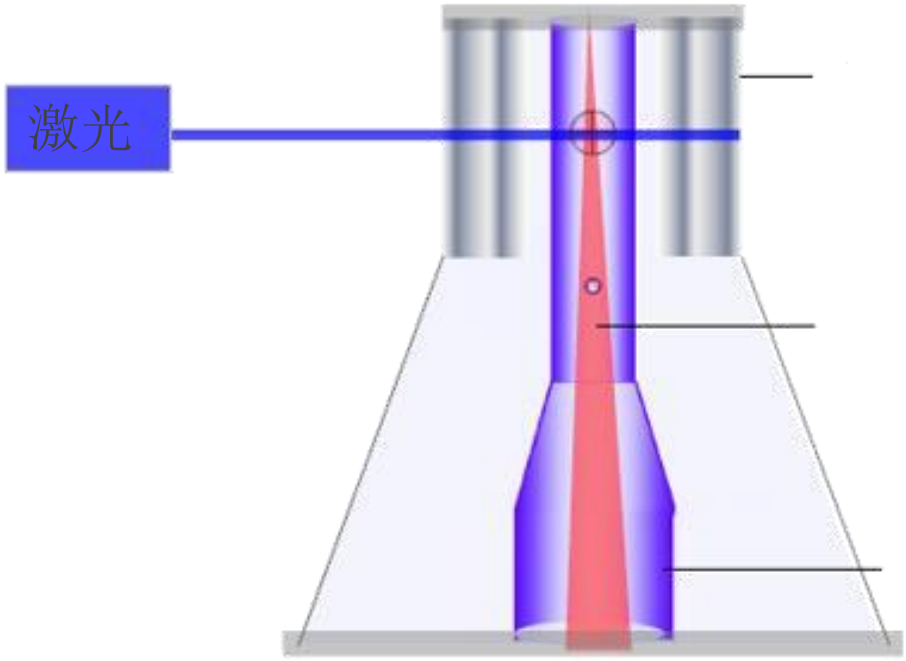
流式细胞仪组成和工作原理

流式细胞仪组成和工作原理

- 液流系统
- 光学系统
- 电子系统



液流系统-FLOW CELL(流动室)



流动室（核心元件）
避免进气泡
定期维护清洁

样本流

鞘液流

鞘液0.22um过滤

废液

流动室

流体聚焦

鞘液+样品流

光学系统

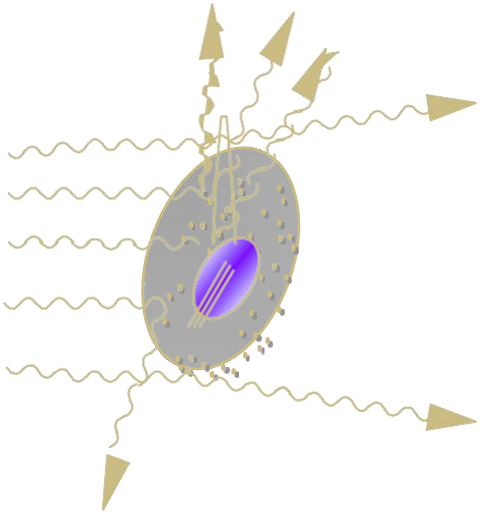
流式细胞仪检测光信号

- **散射光信号**
- **荧光信号**

光学系统-散射光信号

侧向角散射光探测器

SSC（颗粒度）



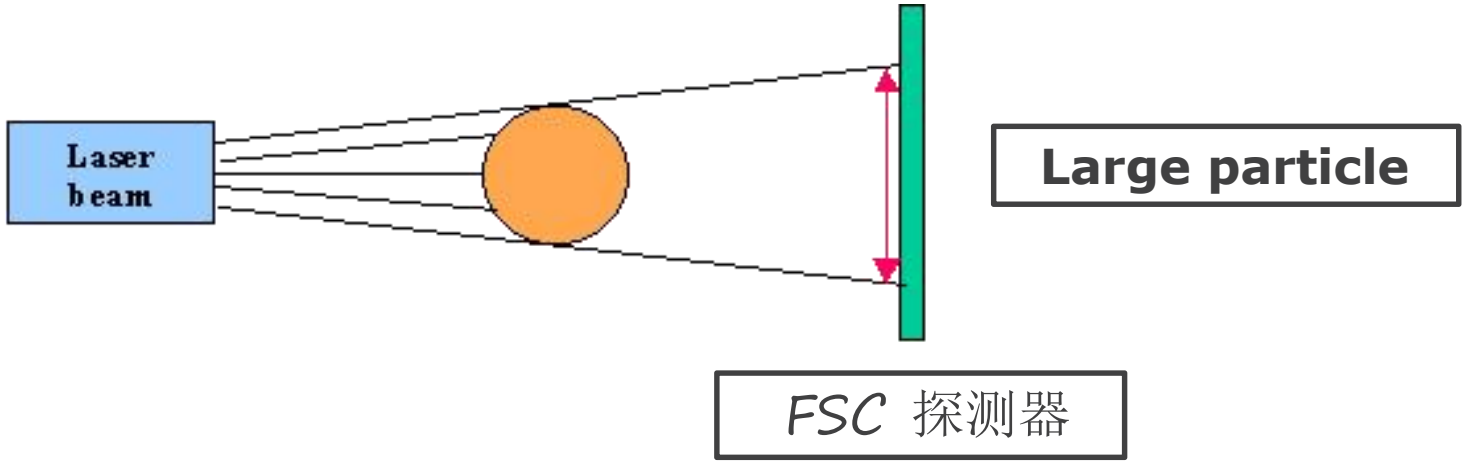
激光光源

Incident Light Source

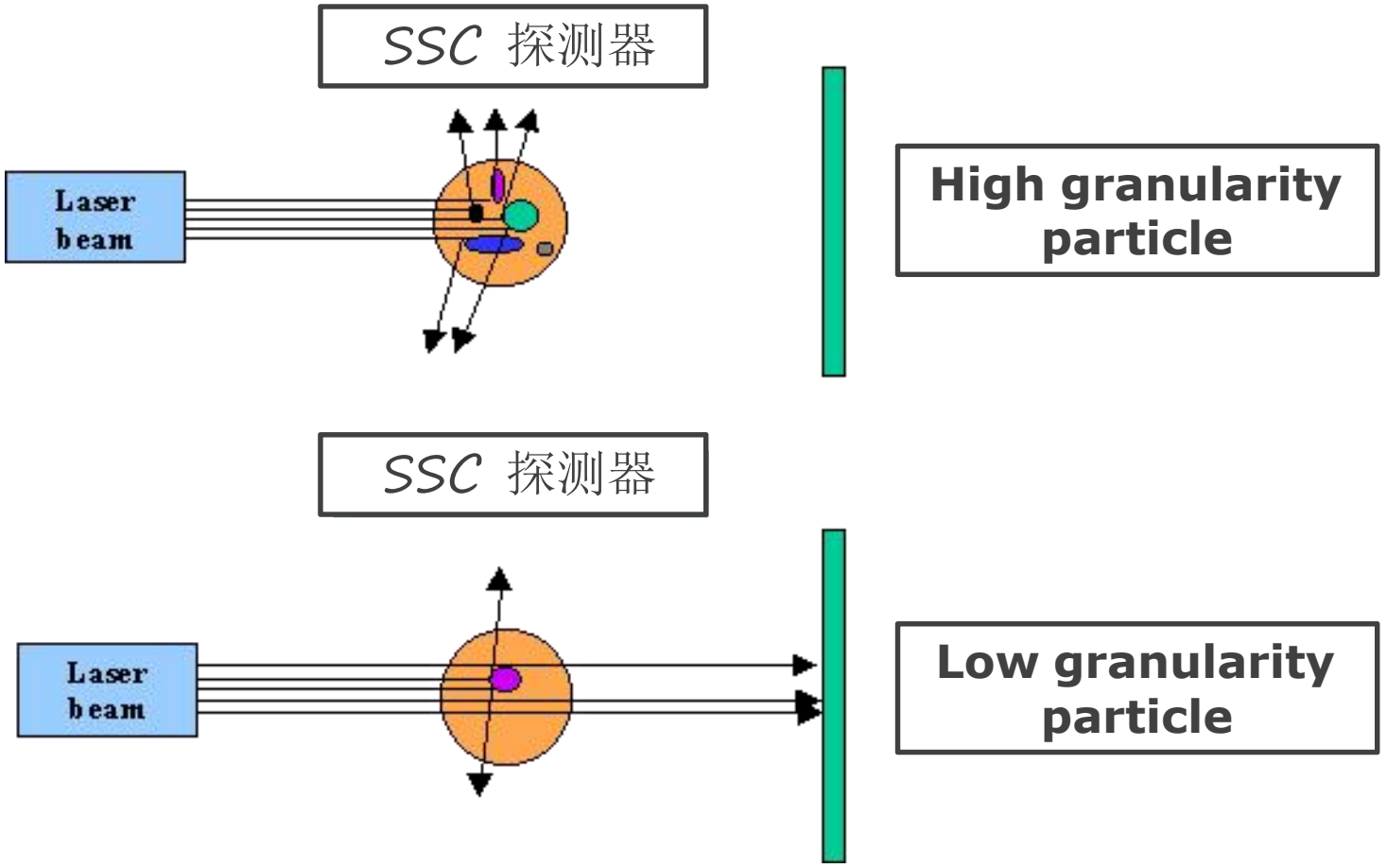
前向角散射光探测器

FSC（相反大小）

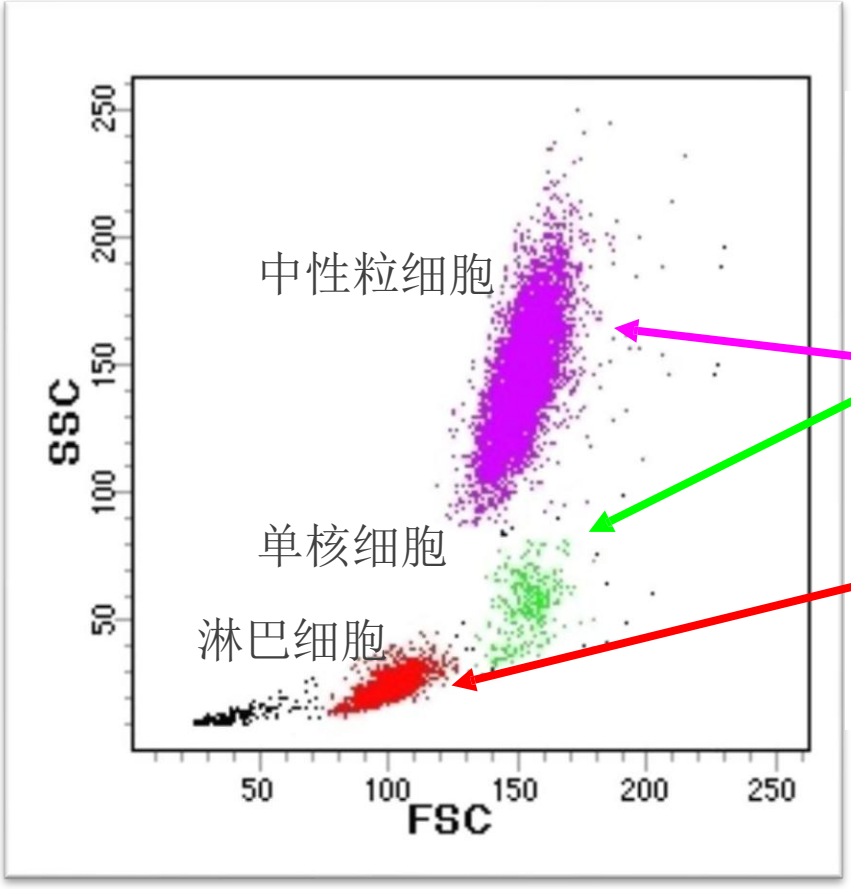
前向角散射光信号

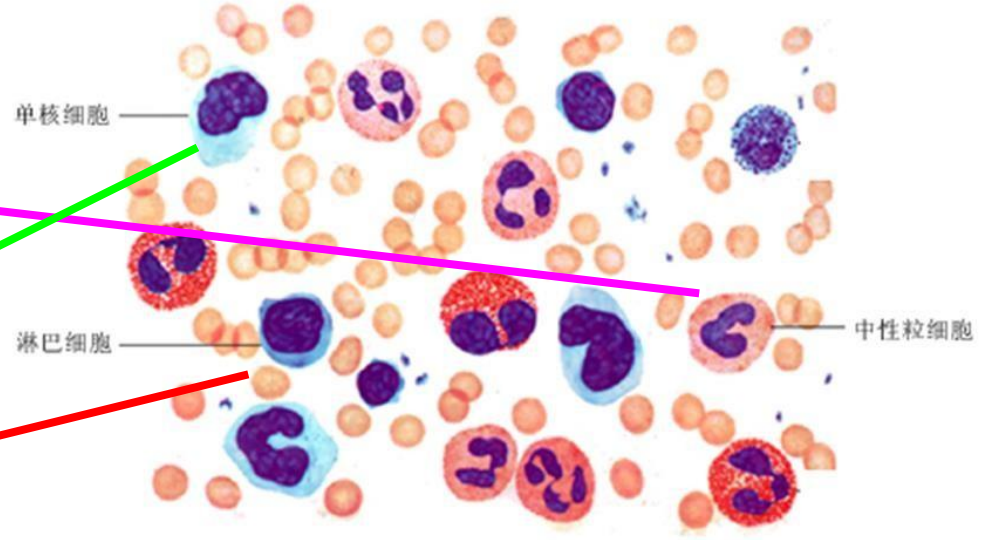

Laser beam
Large particle
FSC 探测器
Laser beam
Small particle

侧向角散射光信号


SSC 探测器
Laser beam
High granularity particle
SSC 探测器
Laser beam
Low granularity particle

外周全血细胞散射光双参数点图（红细胞溶解后）

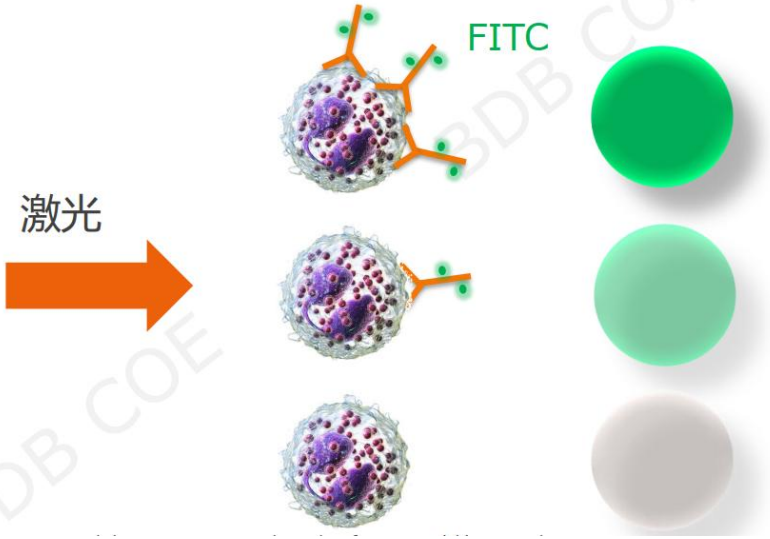




光学系统-荧光信号

荧光信号的产生

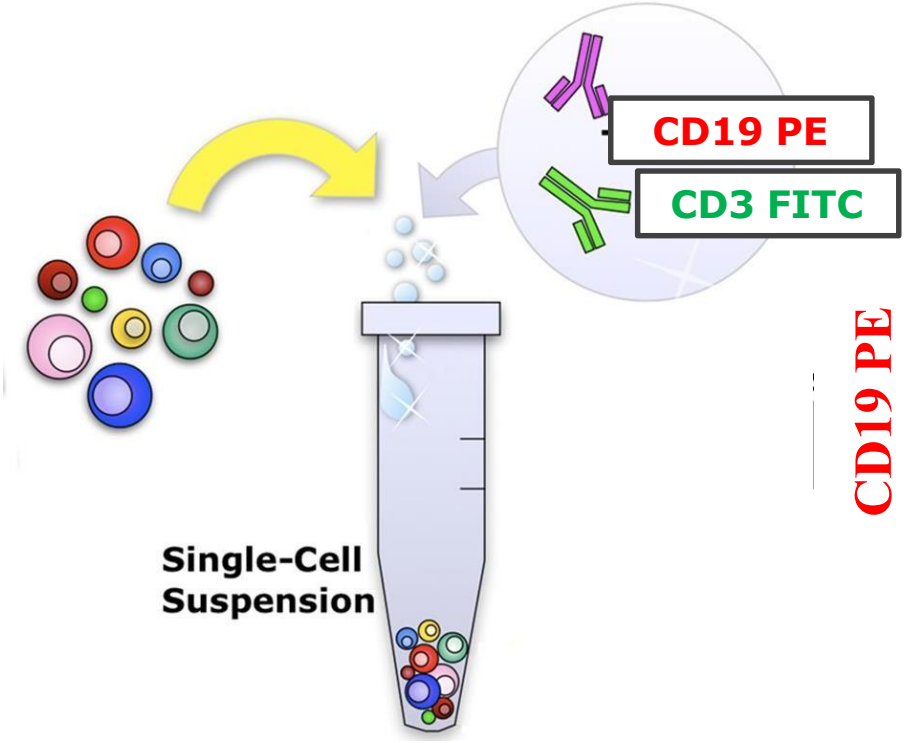
- 使用荧光标记的单克隆抗体染色细胞，激光激发后产生荧光信号
- 荧光信号的强弱，反映了细胞抗原的表达含量

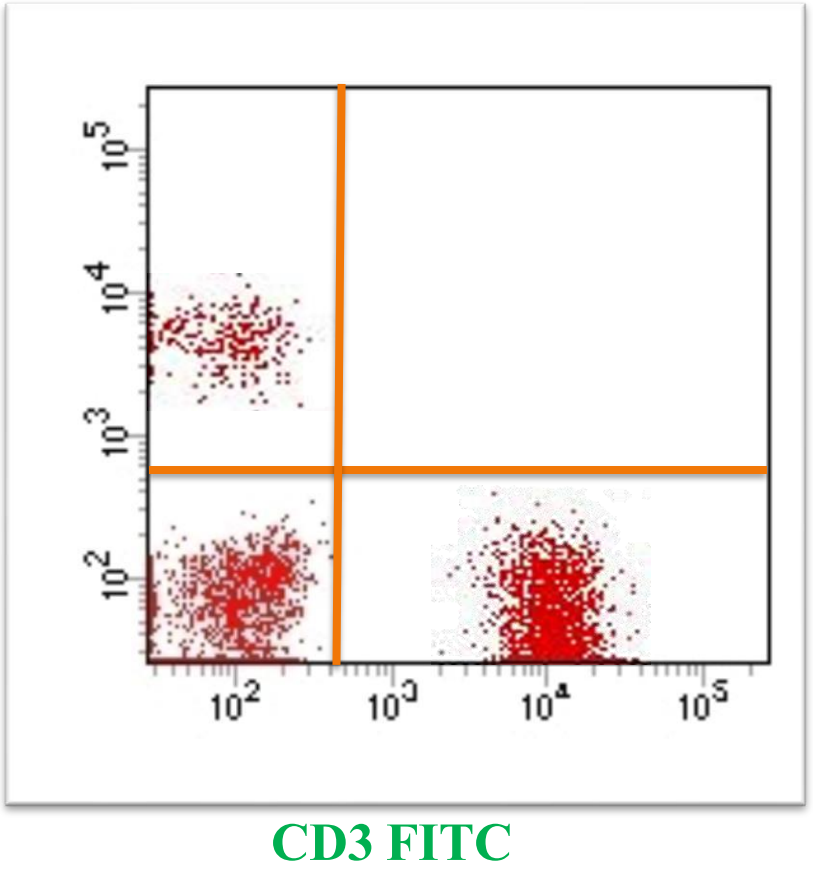


荧光信号双参数散点图

双色直接染色(孵育+洗涤)

双参数散点图





根据仪器配置选择荧光素抗体

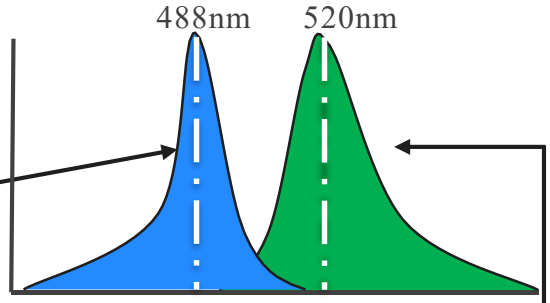
- **荧光素抗体的选择原则：**
  - ✓正确的激光器激发
  - ✓确定所需探测器（滤光片+PMT）
- **选择荧光素抗体需要了解荧光素特征光谱（nm）**

激发光谱（**Excitation，Ex**）：

- ✓ 是指能特异性地激发某种荧光素的一定波长范围内的光线。
- ✓ 激发波峰（最大吸收波长）：Ex-Max

发射光谱（**Emission，Em**）：

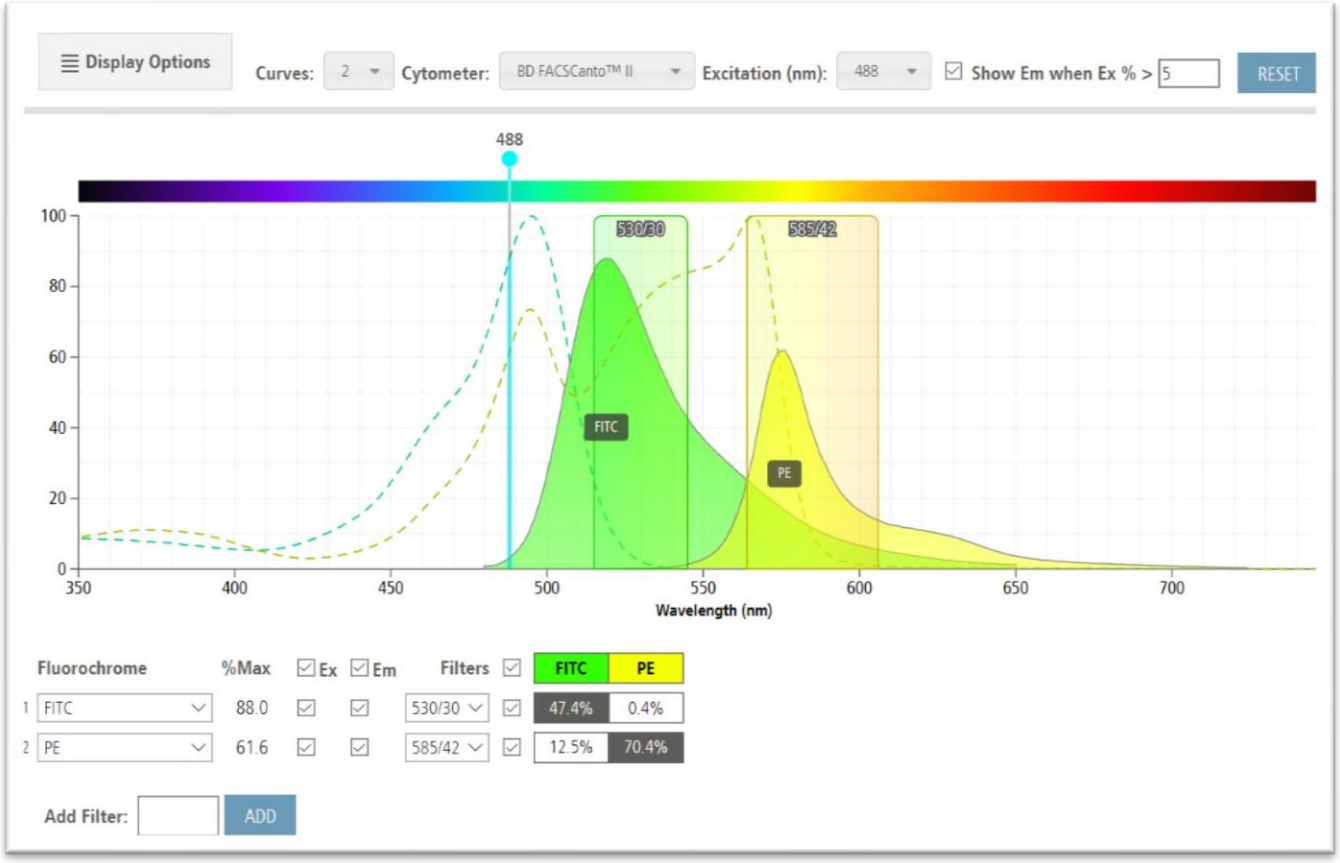
- ✓ 是指某一波长激发光引起荧光素发射的一定波长范围内的荧光
- ✓ 发射波峰（最大发射波长）：Em-Max



异硫氰酸荧光素（**FITC**）

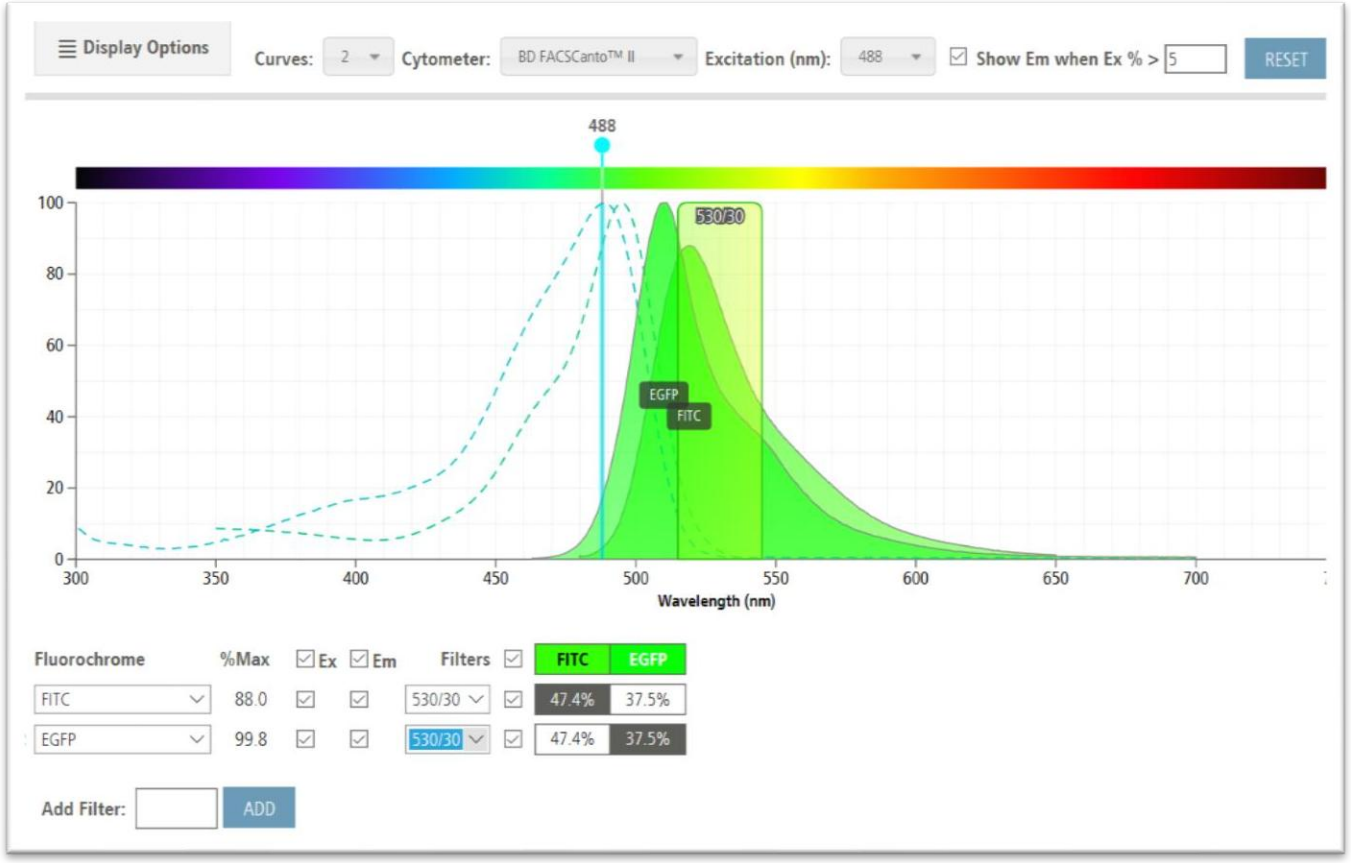
光谱查看器的作用

https://www.bdbiosciences.com/zh-cn/resources/bd-spectrum-viewer



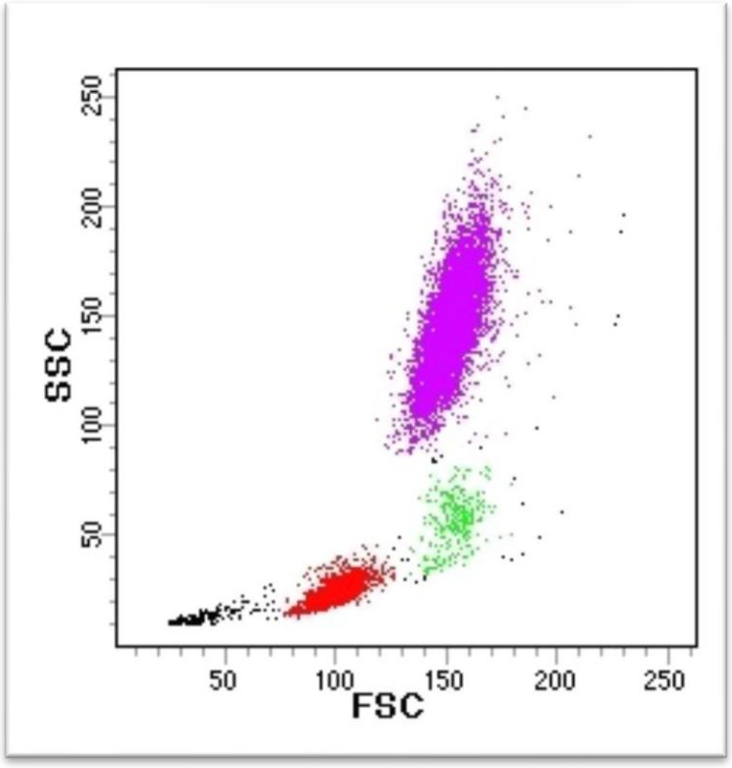
问题：

FITC与EGFP能否同时使用？



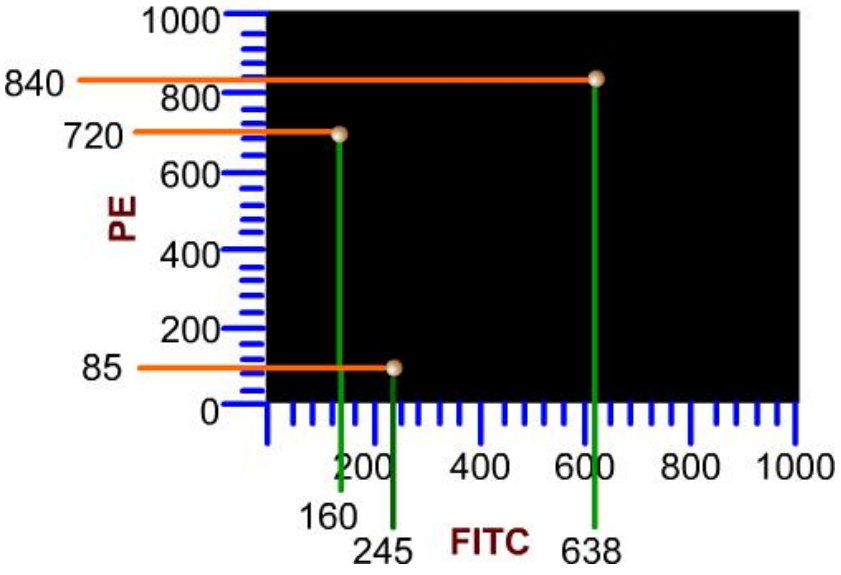
流式图如何形成？

- 散点图



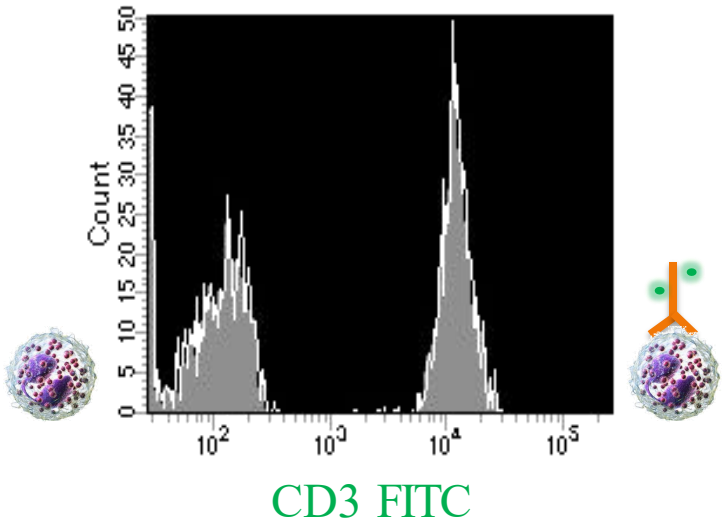
- 数据储存：LIST MODE

	FSC	SSC	FITC	PE
event 1	30	60	638	840
event 2	100	160	245	85
event 3	300	650	160	720

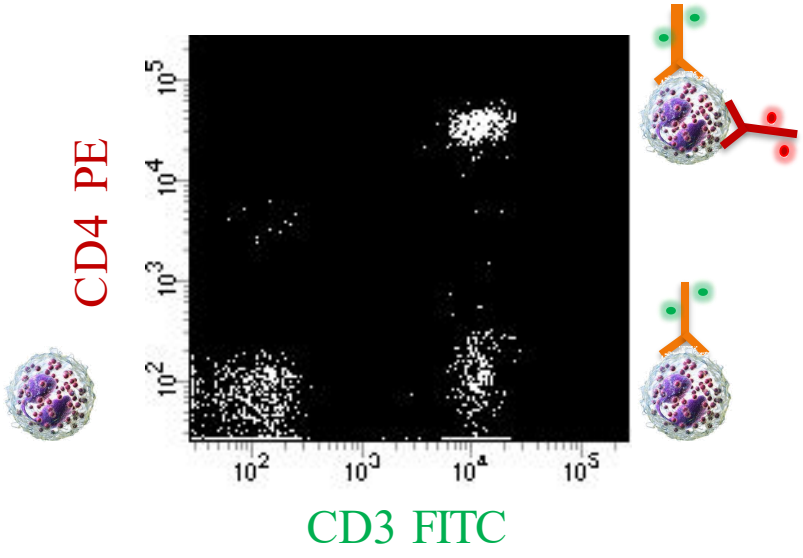


流式图的选取

直方图(Histogram)　　二维点图(Dot Plot)　　等高线图 (Contour)



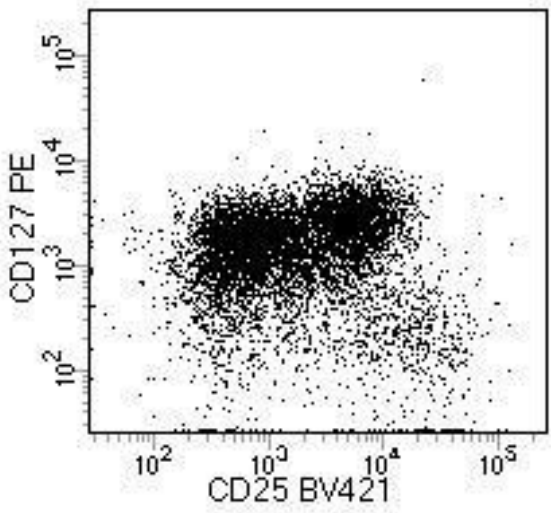
直方图-单参数分析



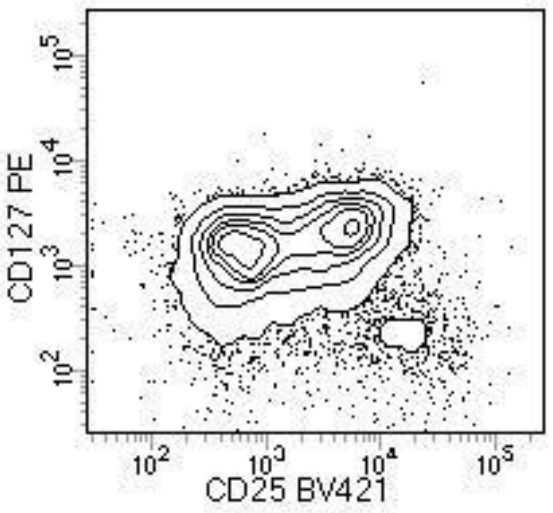
二维点图-双参数分析

流式图的选取

直方图(Histogram)　　二维点图(Dot Plot)　　等高线图 (Contour)



二维点图-双参数分析



等高线图 –点图分群不明显

BD FACS Canto II流式分析仪的操作及注意事项

流式分析检测步骤

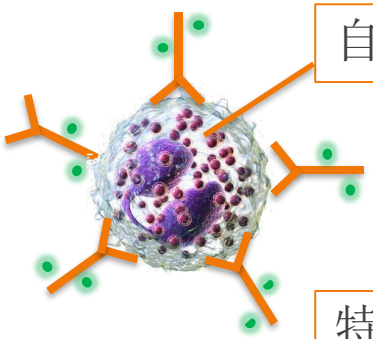
1、获取细胞悬液；
2、荧光抗体染色；
3、设置检测方案（根据配置的激光器、 滤光片，选择荧光素）；
4、同型对照管或空白管调节电压，确定目的细胞群体、阴性与阳性的分界；
5、固定电压条件，分别用每个单色荧光标记的样本调整颜色补偿，消除不同荧光间的干扰；
6、多色同时标记样本进行检测，确认阴性阳性分界及补偿条件的合理性，进行分析检测。

流式对照的设置

如何去除自发和非特异荧光干扰— 阴性对照

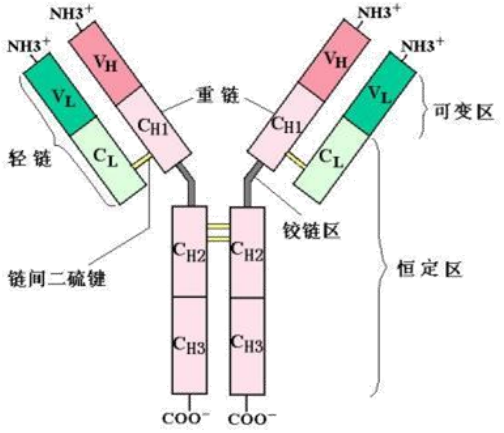
- 实验样本

非特异荧光



自发荧光

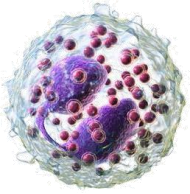
特异荧光



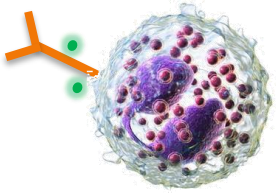
Fab段特异结合

Fc段非特异结合

- 空白对照 （自发荧光）



- 同型对照 （自发荧光＋非特异荧光）



如何购买同型对照

BB515 Mouse Anti-Human CD3

Product Information

Material Number:	**564465**
Alternate Name:	CD3e; CD3E; T3E; TCRE; T-cell surface antigen T3/Leu-4 epsilon
Size:	100 Tests
Vol. per Test:	5 µl
Clone:	UCHT1
Immunogen:	Human infant thymocytes and peripheral blood lymphocytes from a Sézary Syndrome donor
Isotype:	Mouse (BALB/c) IgG1, κ
Reactivity:	QC Testing: Human
Workshop:	III 471
Storage Buffer:	Aqueous buffered solution containing ≤0.09% sodium azide.

Application

Flow cytometry	Routinely Tested

Suggested Companion Products 同型对照

Catalog Number	Name	Size	Clone
564416	BB515 Mouse IgG1, κ Isotype Control	100 µg	X40

- **与染色的单克隆抗体**
  ①相同种属来源 ②相同免疫球蛋白及亚型③相同荧光素标记
  ④相同剂量和浓度⑤由未免疫动物血清纯化而来

同型对照（Isotype Control）作用

- 调整散射光电压

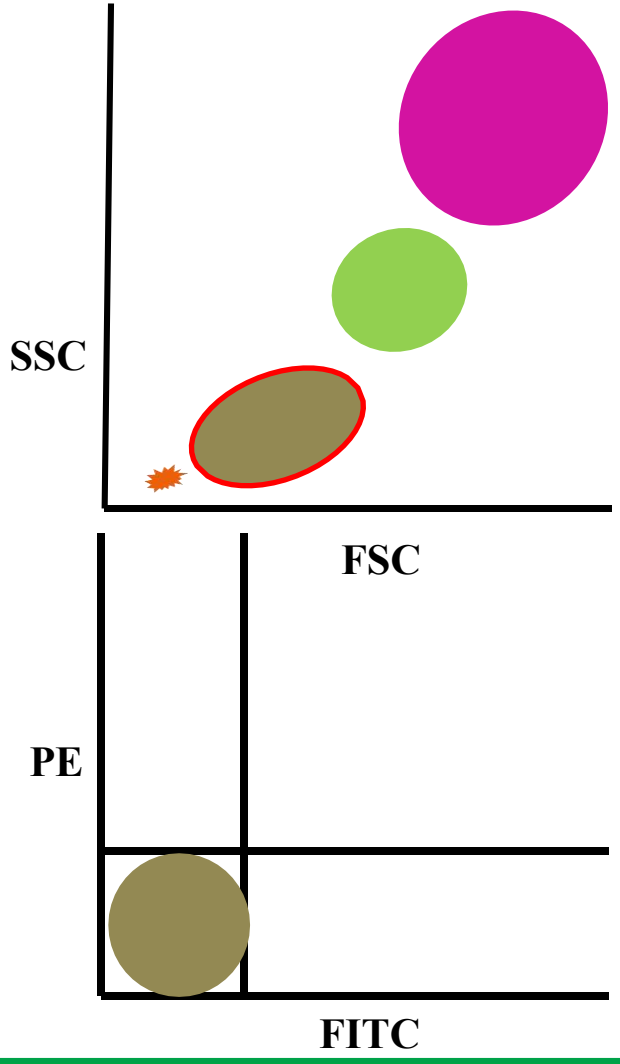
  看到细胞群体

- 设定阈值

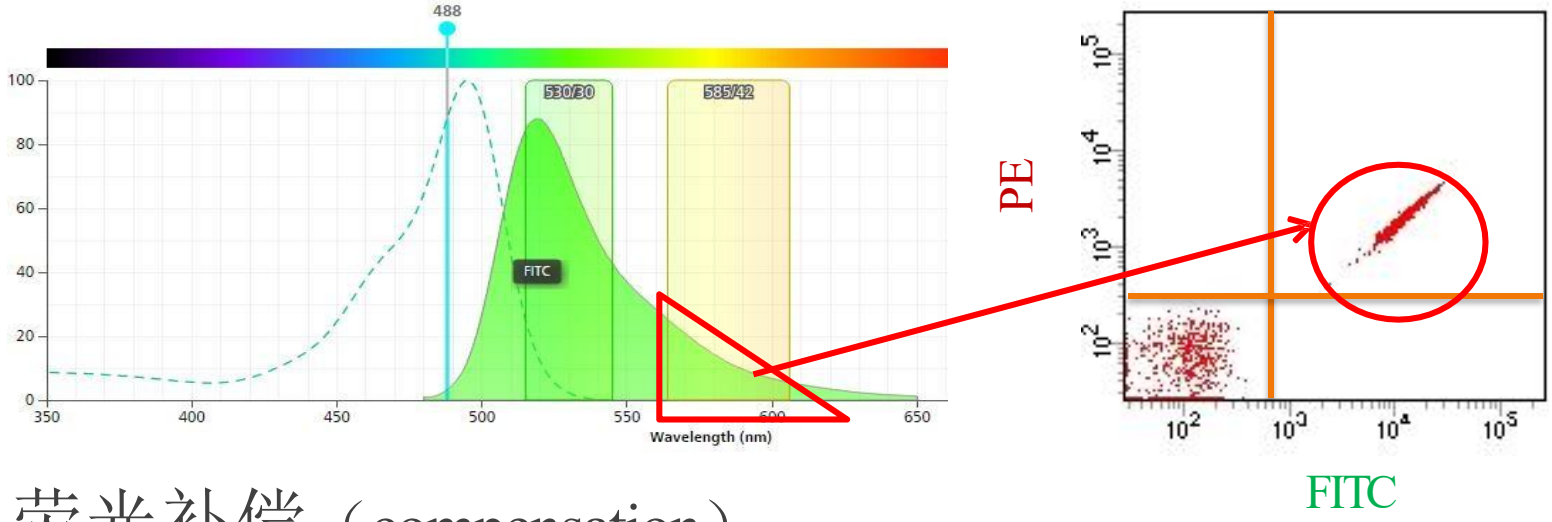
  确定观测范围

- 调整荧光电压

  确定阴性细胞位置



荧光素发射光谱重叠导致假双阳性



荧光补偿（compensation）

是指在流式细胞多色分析中，纠正荧光素发射光谱重叠（spectral overlap）的过程，即从一个被检测的荧光信号中去除任 何其他的干扰荧光信号。

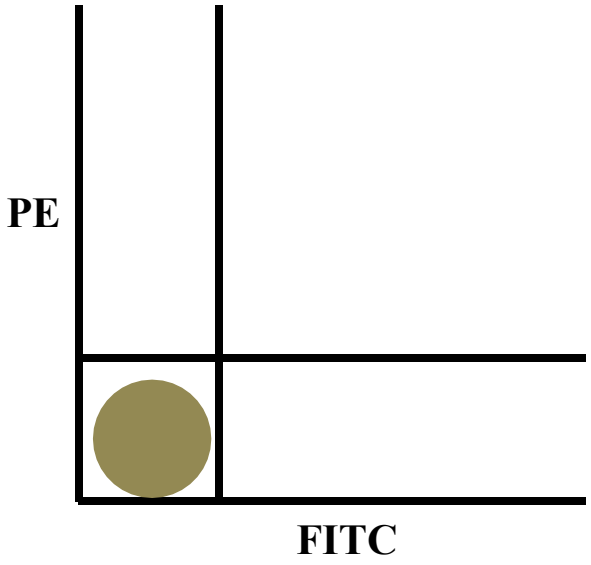
如何进行荧光补偿—单阳性对照

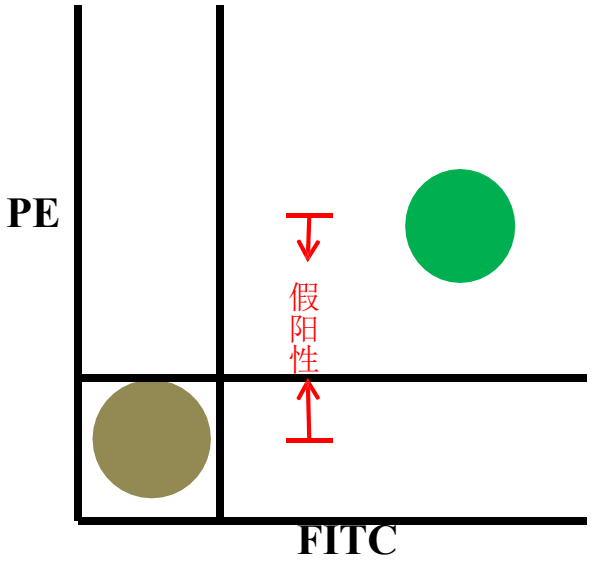
单阳性对照（双色或多色分析中，荧光素发射光谱重叠时）

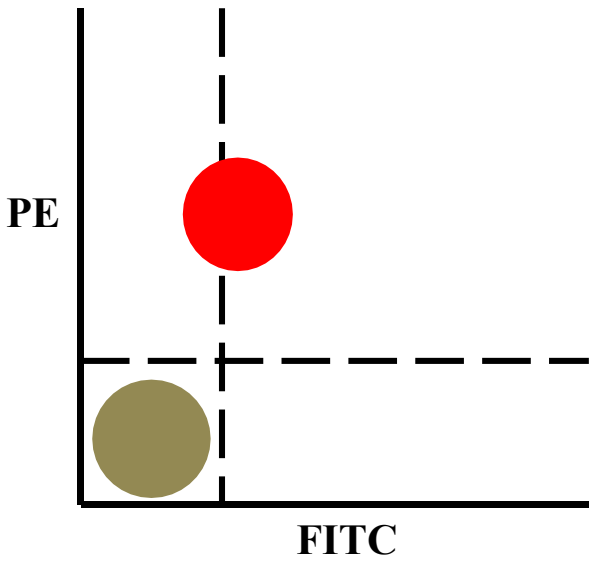
- 明确已知的单阳管样本
- 使用单种荧光素标记的单克隆抗体和其余荧光素对应的同型对照抗体分别进行染色
- 几色分析需要制备几个单阳性对照管

分析类型	管	功能	加入的抗体	
双色分析	1	Isotype	IgG1-FITC	IgG2a-PE
	2	Compensation1	CD3-FITC	IgG2a-PE
	3	Compensation2	IgG1-FITC	CD4-PE
	4	Sample1,2……	CD3-FITC	CD4-PE

补偿模型（FITC-PE双染举例）







STEP1: 阴性样本调电压，确定阴阳界限

STEP2：FITC单阳管

PE-X%FITC

STEP3：PE单阳管

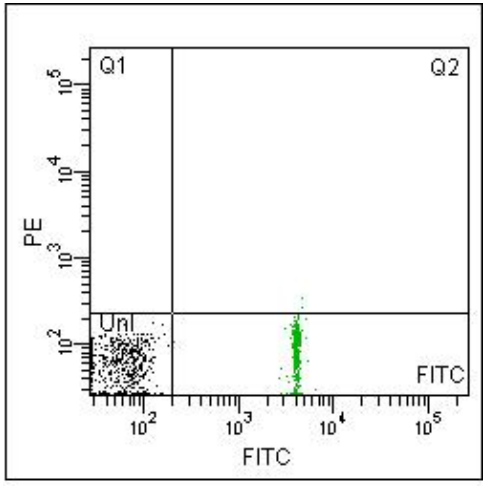
FITC-X%PE

补偿原则：横平竖直

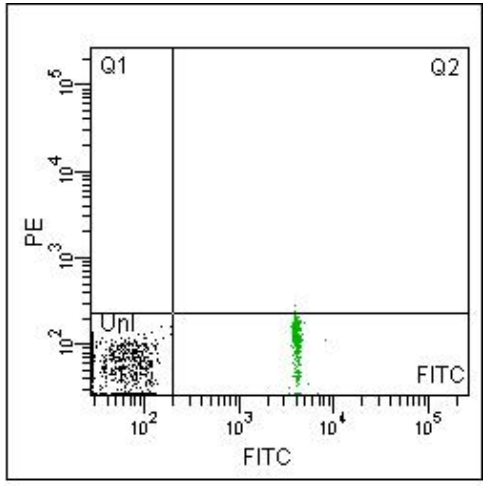
违反补偿原则--错误补偿

错误补偿

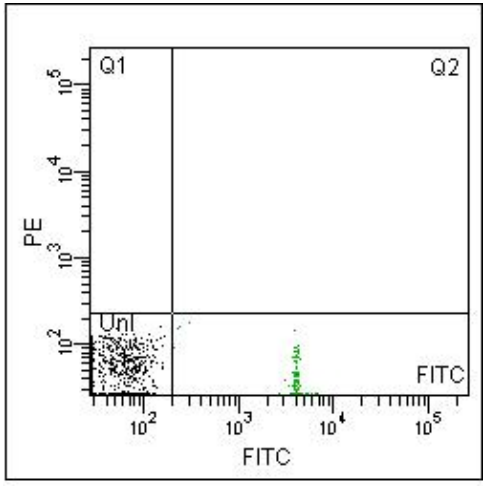
正确补偿　　补偿不足　　补偿过头



Population	PE-A Mean
UnI	64
FITC	69



Population	PE-A Mean
UnI	61
FITC	96



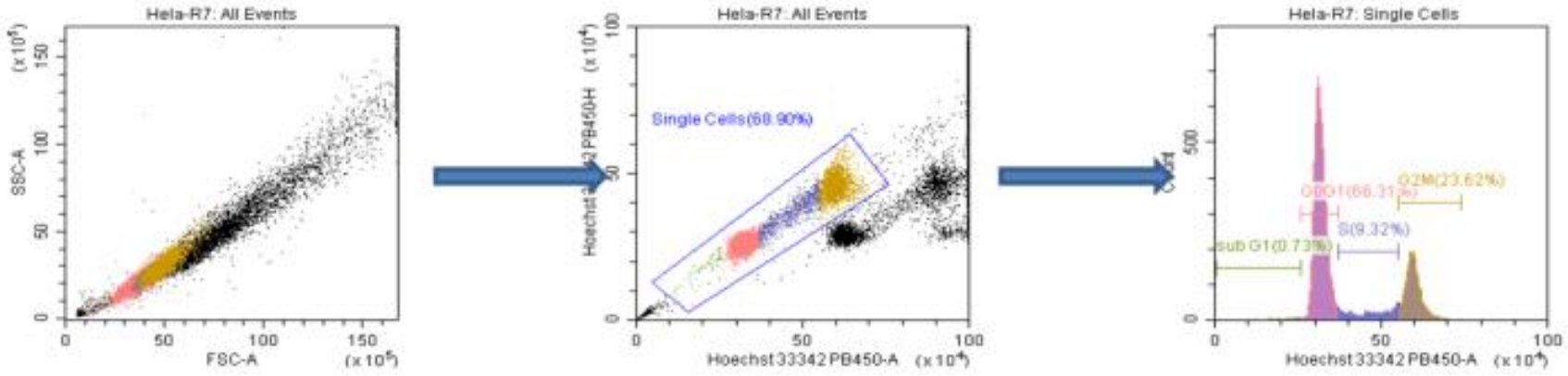
Population	PE-A Mean
UnI	62
FITC	-1

BD FACS Canto II流式分析仪的应用及例子分析

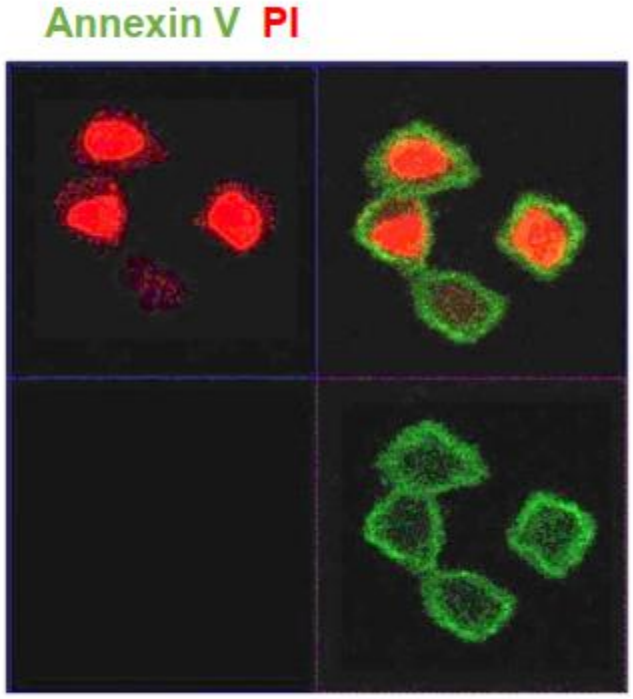
流式分析仪应用

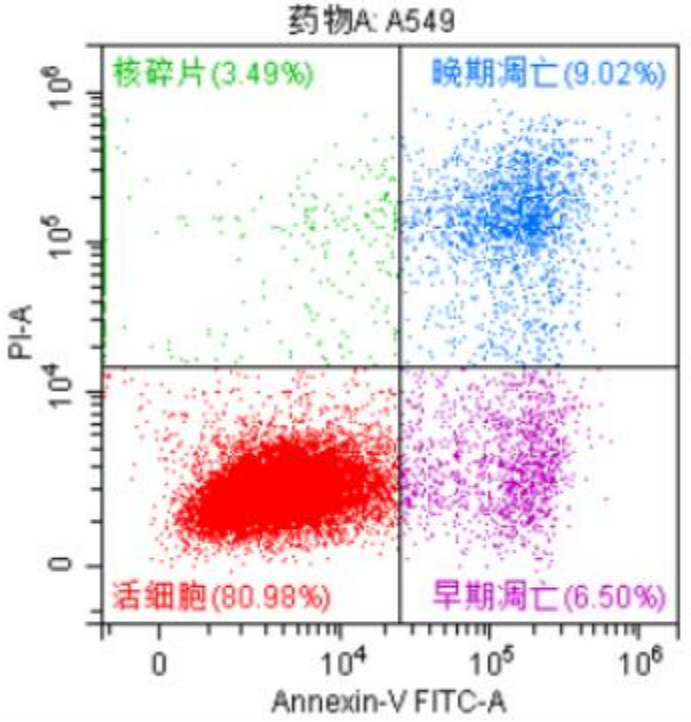
学科	样本应用
免疫学	细胞因子分析 免疫表型 T细胞活化和抑制
细胞和癌症生物学	细胞凋亡 荧光蛋白检测 基因表达和调控 细胞信号传导和钙通量 癌症干细胞免疫表型 细胞迁移
干细胞研究	hESC免疫表型 MSC表征
微生物学	微生物计数和活性 环境研究

流式分析应用案例-细胞周期检测

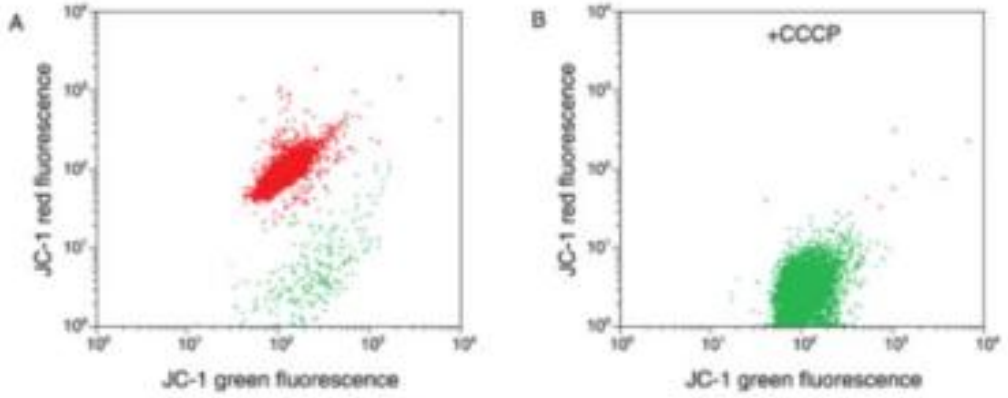


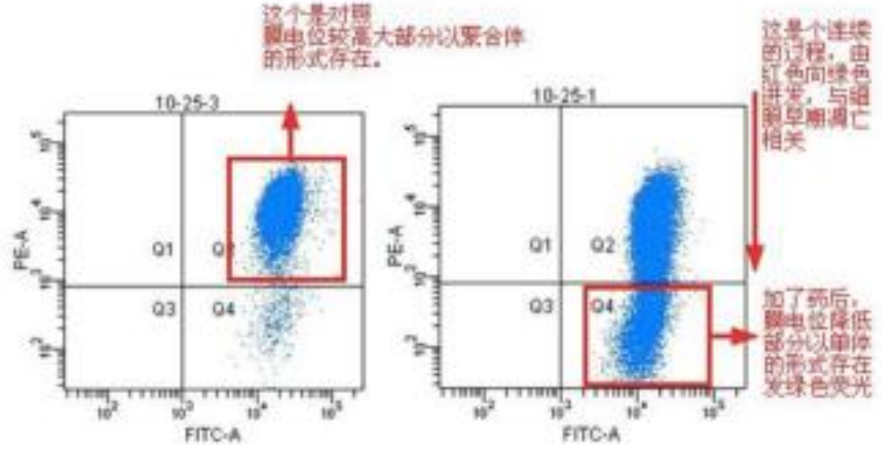
流式分析应用案例-细胞凋亡检测





流式分析应用案例-线粒体膜电位检测





流式技术平台-BD FACS AriaIII流式分选仪

BD FACS AriaIII流式分选仪

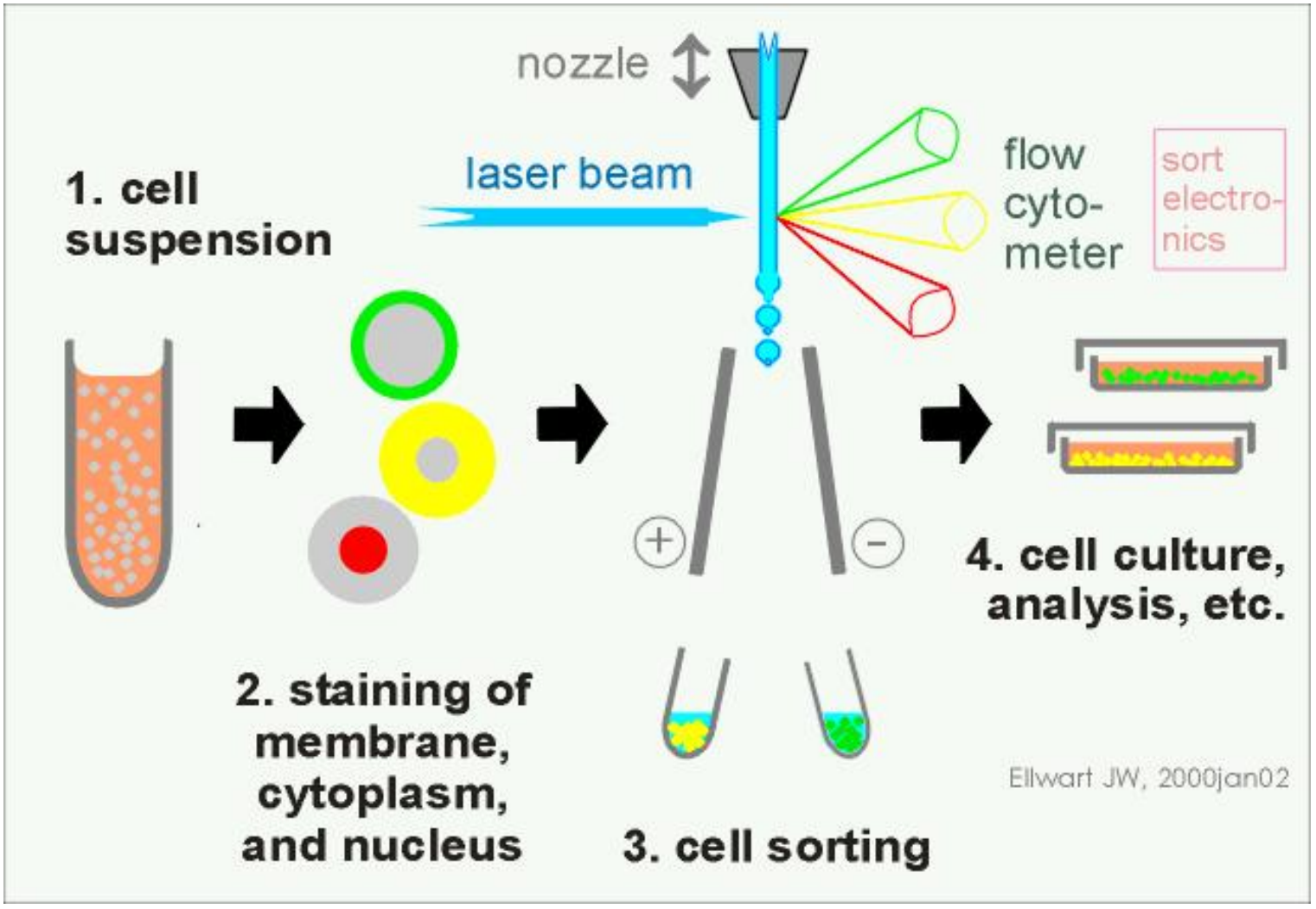
1.1 BD FACS AriaIII流式分选仪的原理

1.2 BD FACS AriaIII流式分选仪的操作及注意事项

1.3 BD FACS AriaIII流式分选仪的应用及例子分析

BD FACS AriaIII流式分选仪的原理

流式分选原理


nozzle
laser beam
1. cell suspension
flow cyto-meter
sort electro-nics
4. cell culture, analysis, etc.
2. staining of membrane, cytoplasm, and nucleus
3. cell sorting
Ellwart JW, 2000jan02

流式分选最重要的问题

- Good Purity – 分选后所得到的细胞是否是想要的?
- Good Recovery – 分选后得到的细胞数量是否够用?
- Good Viability – 分选后有多少细胞是活的?

怎样进行精确分选？

精确分选的基本前提：

1. 精确分选的基本前提-液流稳定

2. 精确分选的基本前提-精确加电

精确分选的基本前提-液流稳定

Sweet Spot — 液滴断点自动监测

调节液流稳定：

1、确定液流断点位置

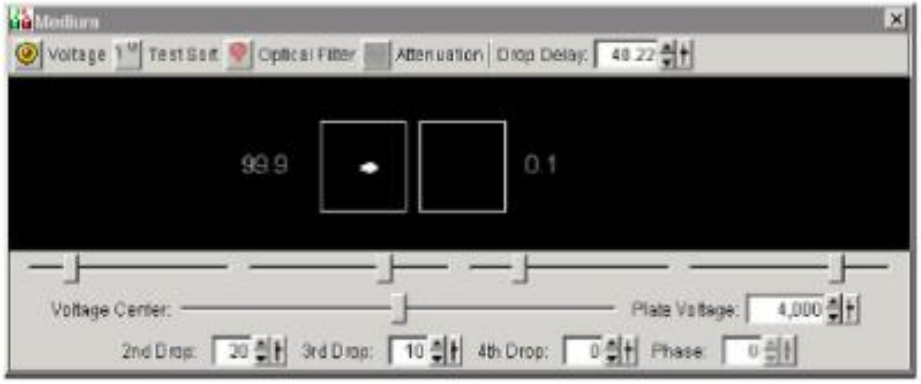
2、确定最佳Gap值

3、确定最佳Drop1值

4、锁定最佳Gap值和最佳Drop1值

精确分选的基本前提-精确加电

Accudrop —— 液滴延时自动控制



- 专利的BD Accudrop技术能够自动地精确确定液滴延迟时间（细胞颗粒与激光正交的时间和细胞颗粒到达断点处的时间这两个时间的间隔），保证最高的分选纯度及得率。
- 全部自动完成精确计算，无需手动调节，并可实时监测。

BD FACS AriaIII的操作及注意事项

流式分选样本制备基本流程

1、获取细胞悬液；
2、荧光抗体染色；
3、调整细胞浓度1x107/ml；
4、避光置冰上运至分选室；
5、移入带过滤头的流式管；
6、上机检测并设定分选条件；
7、试分选并上机检测纯度；
8、分选细胞。

流式分选样品送样检测基本要求

- 细胞大小一般不超过喷嘴孔径1/5，绝不能超过1/3
- 建议无菌样本，容易维持上样针部分的无菌条件
- 减少有高浓度PI的样本，以免残留在管路内，影响后续样本活性
- 浓度可在10^7/ml
- 一定要使用300-400目孔径过滤网过滤

如何提升分选的纯度

1、选择合适的喷嘴孔径

2、确保液流的稳定

3、精确设置drop delay

4、减少样本的粘连

5、进行4路分选时，将纯度要求高的细胞分选设置在最外的2路

6、选择纯度分选模式

如何提升分选的回收率

1、确保液流的稳定

2、精确设置drop delay

3、选择富集分选模式

4、降低冲突事件的发生概率

a.稀释样本、过滤样本、降低上样液流速度

b.使用较小尺寸喷嘴

如何提升分选的细胞活率

1、尽量减少样本制备对细胞造成的损伤

2、保证分选环境洁净，仪器进行无菌清洗

3、增大喷嘴孔径，脆弱细胞必须要用大孔径喷嘴

4、液流偏转角度合适、收集管用血清包被

5、控制温度

6、控制分选时间

流式分选常见问题

Q1. 上机样品需要溶在何种溶液中？是否可以就直接放在原本培养的培养基中?

Ans: 建议不要放培养基中，因为Phenol Red可能会影响分选的结果，可先尝试使用含2%FBS 或BSA的PBS作为分选缓冲液。如要求更好的细胞存活率，按分选细胞的不同，选择不同的分选缓冲液。

1.淋巴细胞（HBSS配方中的阳离子可增进细胞的生存力。如果这些细胞并非易于群集细胞，可以选用没有EDTA的缓冲液）。

2.贴壁细胞（以Trypsin处理后去准备单细胞悬浮液时，待细胞变圆(切记不可过度作用)，以适量含5%血清培养液收取细胞，并均匀地打散细胞悬浮液。离心后，用分选缓冲液调整细胞浓度。如果需要的话可以提高EDTA的浓度(至5mM)以避免细胞重新黏聚）。

流式分选常见问题

Q2. 如果细胞要再培养，会污染吗?

Ans: 分选所用的所有溶液都经高温高压灭菌，流式分选仪管路使用70%乙醇定期清洗，仪器所在房间在每次分选前紫外灭菌，最后在细胞培养基中加入抗生素，可将污染机率降至很低。

流式分选常见问题

Q3. 如果我想在分选后拿到1×106的细胞我应该一开始准备多少细胞去做分选?

Ans: 假设你要的细胞只占总数的10%，则你所需准备的细胞数如下公式: 1×106=10%× 50%回收率× 20×106(起始细胞数)，所以你需要准备2×107细胞。高速分选、纯度模式(purity vs. yield mode)、部分细胞黏附于上样管壁、部分细胞用于样本分析、长时间分选过程中细胞的死亡等等，都会降低回收率。50%回收率是一个一般的参考值。

流式分选常见问题

Q4. 分选后细胞的纯度有多少?

Ans: 通常可以达到95%以上的纯度，如果所分选细胞可以和其他细胞群较好的区分。

流式分选常见问题

Q5. 如果阳性的细胞占总数的1%以下，还可以做分选吗?

Ans: 可以，但是低含量细胞的分选会导致低纯度及低回收率。因此，我们建议使用者事先富集你感兴趣的细胞。细胞富集的方式可以是正选：如用磁珠法富集你感兴趣的细胞；也可以是负选，如利用nylon wool去除B细胞，或磁珠法去除不要的细胞。

流式分选常见问题

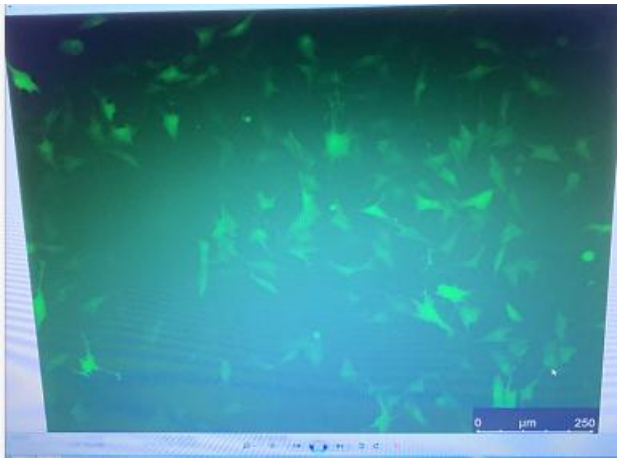
Q6. MACS分选和流式分选的区别在哪里，前者对细胞活性的保护更好吗?

Ans: 根据实验和研究目的，选用合适的方法。MACS磁珠方法更主要是用来富集细胞，适合抗原表达高的、原始细胞量大且指标单一或lineage多种指标阴性的筛选，更温和，但是纯度上有影响；流式分选更适合原始细胞量较少、需要很多指标来定义、目的细胞亚群的比例较低的精细筛选，比如干细胞、稀有细胞或单细胞研究等，灵敏度和纯度上更胜一筹。

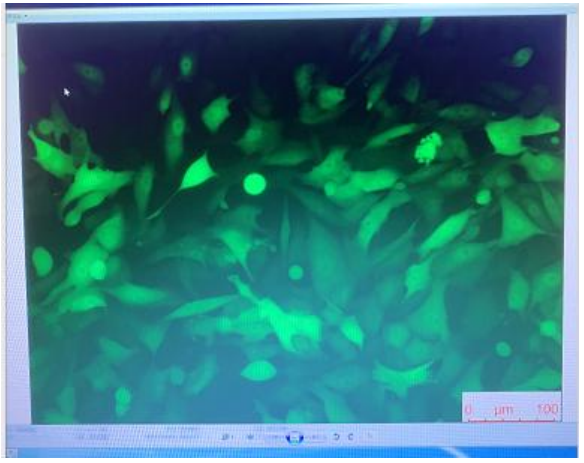
BD FACS AriaIII的应用案例

流式分选应用案例-分选表达GFP肿瘤细胞

分选前



分选后



Thank you