



流式细胞术样本制备

流式细胞术的分析及分选

基本概念

流式细胞术 (Flow Cytometry, 简称FCM) 是一种能够同时检测快速直线流动状态中的**单个细胞**的多项物理及生物学特性, 加以**分析**定量的技术, 同时可以对特定群体加以**分选**。

流式细胞仪 (Flow Cytometry, 简称FCM) 是集激光技术、电子物理技术、光电测量技术、电子计算机技术、细胞荧光化学技术、单克隆抗体技术为一体的一种新型高科技仪器。

第一部分：流式样本制备

流式可检测的样本种类多样：

各种细胞（如外周血，骨髓，脾细胞，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

流式样本制备：

单细胞悬液（天然，机械研磨/消化）

$5 \times 10^5 - 1 \times 10^7$ cells/ml, 约0.5 ml, 200目筛网过滤

样本制备：试剂

✚ Staining buffer (PBE) : 含2mM EDTA的PBS, 4°C保存。

✚ 抗凝剂：2%EDTA-PBS

✚ 红细胞裂解液 (ACK) 配方：

化学试剂	终浓度
KHCO_3	10 mM
NH_4Cl	150 mM
EDTA	0.1 mM, 调整 pH 至 8.0

样本制备：骨髓细胞

小鼠骨髓细胞样品准备

- 1) 脱颈处死小鼠，用75%酒精浸泡。
- 2) 取小鼠后肢骨（股骨，胫骨），去除肌肉组织，用含2%血清的PBE冲出BM细胞。将收集的BM细胞用尼龙膜过滤，计数，4°C，1600rpm，离心10min。
- 3) 每 10^8 细胞加入80 μ l PBE。
- 4) 每 10^8 细胞加入适量体积的标记抗体，冰上孵育15-60分钟。
- 5) 每 10^8 细胞用5ml PBE洗一遍，4°C，1600rpm离心10min，弃上清。
- 6) 用含2%血清的PBE重悬细胞，过滤膜（细胞悬液种可能有细胞聚集，最好是上机之前过滤），上机分析或分选。
- 7) 备注：无菌分选时使用含2%FBS+2%双抗的PBE重悬细胞。

样本制备：外周血细胞

小鼠外周血样品采集和流式检测样本制备

样品采集：

- 1) 在1.5ml EP管中加入40 μ l抗凝剂（2%EDTA-PBS溶液）。
- 2) 将小鼠放置于暖气片上数分钟，使其充血，用毛细血管取尾血10-20 μ l。

流式样本制备：

- 3) 每管加入适量体积的标记抗体，冰上孵育15-30分钟。
- 4) 每管1:9加入ACK红细胞裂解液，室温孵育10分钟。
- 5) 每管加入1ml PBE，4 $^{\circ}$ C，1600rpm离心10min，弃上清。
- 6) 用300 μ l含2%血清的PBE重悬细胞，过滤膜（细胞悬液种可能有细胞聚集，最好是上机之前过滤），上机检测。

样本制备：脾细胞

小鼠脾细胞流式检测样本制备

- 1) 脱颈处死小鼠，用75%酒精浸泡。
- 2) 取小鼠脾脏，置于含PBS的6孔板中，用20ml注射器针芯于200目滤网上研磨脾脏，将收集的脾细胞用尼龙膜过滤。
- 3) 每个样品管中加入 $1 \times 10^6/50\mu\text{l}$ 细胞，加入适量抗体进行标记。
- 4) 加入1ml PBE，1600rpm离心10min，弃上清。
- 5) 脾细胞中加入500 μl 红细胞裂解液，立即于4°C，1600rpm离心10min（骨髓细胞无需此步）。
- 6) 弃上清，加入300-500 μl 含2%血清的PBE重悬，过膜，上机检测。

样本制备：脑细胞

小鼠脑细胞流式检测样本制备

- 1) 使用致死剂量的麻醉剂麻醉小鼠。
- 2) 使用冰PBS进行心脏灌流，分离脑组织。
- 3) 取小鼠脑组织，置于含PBS的6孔板中，用20ml注射器针芯于200目滤网上研磨。
- 4) 加入1ml PBE，1600rpm离心10min，弃上清。
- 5) 用5ml 30%的Percoll重悬细胞，400g离心30分钟，弃去上层的髓鞘碎片和液体，保留细胞沉淀。
- 6) 使用PBS洗细胞沉淀2次，显微镜下计数。
- 7) 每个样品管中加入 $1 \times 10^6/50\mu\text{l}$ 细胞，加入适量抗体进行标记。
- 8) 加入1ml PBE，1600rpm离心10min，弃上清。加入300-500 μl 含2%血清的PBE重悬，过膜，上机检测。

第二部分：流式分析和分选

流式细胞仪构造（五部分）：

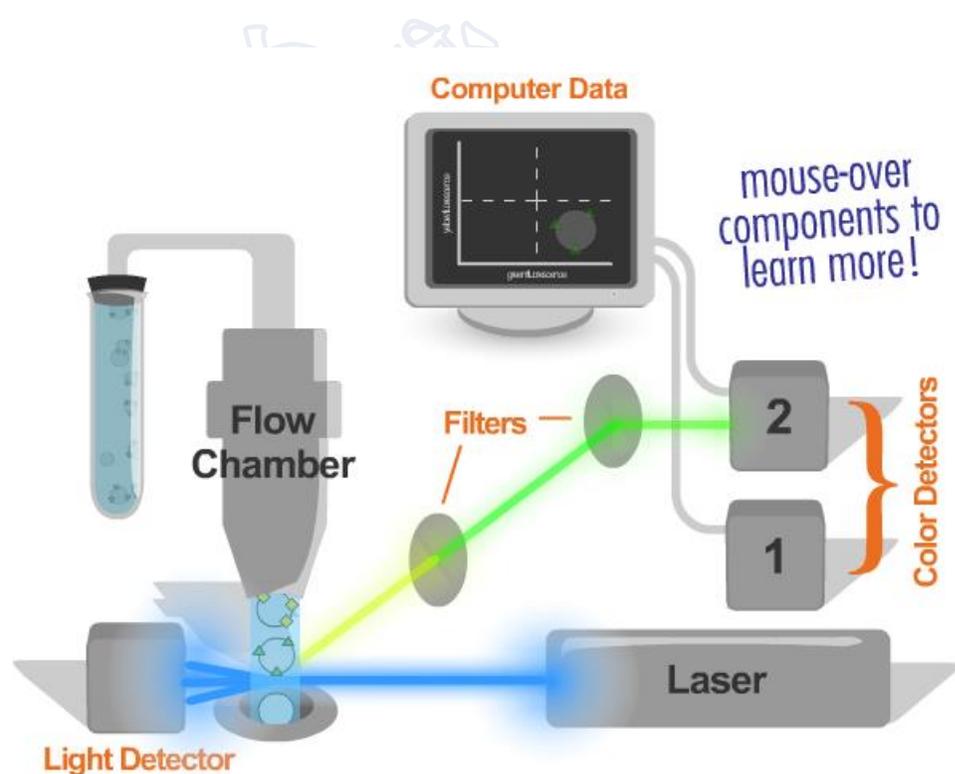
流动室及液流驱动系统

激光光源及光束成形系统

光学系统

信号检测与存贮、显示、分析系统

细胞分选及浓缩系统



流式细胞仪的检测信号



散射光信号：

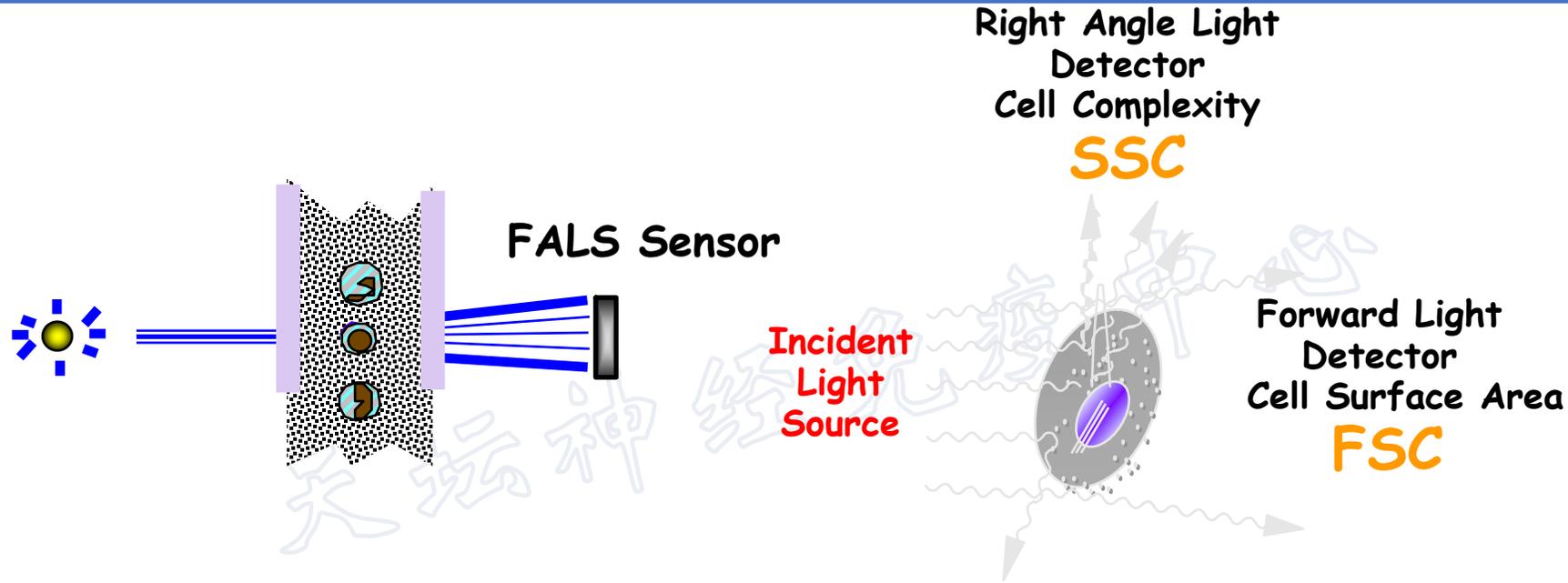
前向角散射光 (FS, Forward Scatter)

侧向角散射光 (SS, Side Scatter)

荧光信号：

FL1、FL2、FL3、FL4.....

散射光信号



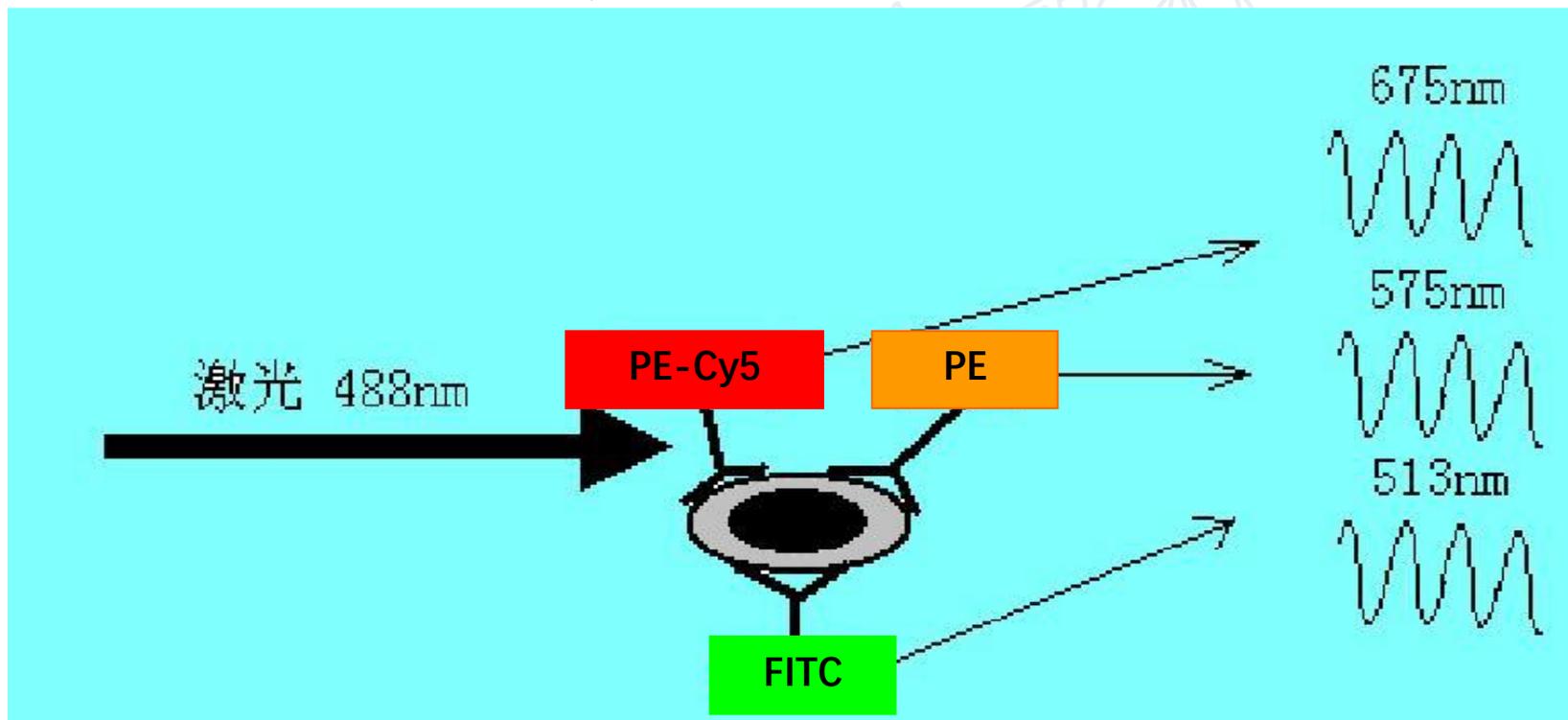
- 前向角散射光 (FSC, Forward Scatter)
细胞相对大小及其表面积
- 侧向角散射光 (SSC, Side Scatter)
细胞粒度及细胞内相对复杂性

流式细胞仪检测的荧光信号



荧光信号

使用荧光标记的单克隆抗体染色，做多色分析
荧光信号的强弱，反映了细胞抗原的表达含量



荧光素的激发和发射光谱

区别



任何发荧光的物质分子都具有这两个特征光谱 (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, 也称为吸收光谱。

吸收波峰 (最大吸收波长) : **Ex-Max**

发射光谱 (Emission) :

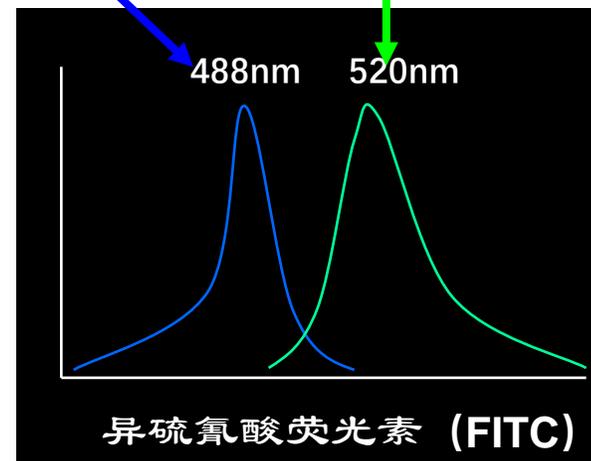
是指某一波长激发光引起荧光素发射的一定波长范围内的荧光

发射波峰 (最大发射波长) : **Em-Max**

荧光素的使用 :

选择正确的激光器

确定所需荧光探测器 (PMT)



常用的标记单克隆抗体的荧光素



488nm激光激发：

FITC (异硫氰酸荧光素)： 荧光强度可受pH的影响，当pH降低时其荧光强度也随之减弱

PE (藻红蛋白)

PerCP (多甲藻叶绿素蛋白)： 光量子产量并不太高，最好应用在检测表达较高的抗原上

PerCP-Cy5.5 (叶绿素蛋白偶联物)

PE-Cy7 (藻红蛋白偶联物)

PE-Cy5 (藻红蛋白偶联物，又称Cy-Chrome)

PE-Texas Red (藻红蛋白-德州红偶联物，又称ECD)

633nm激光激发：

APC (别藻青蛋白)

APC-Cy7 (别藻青蛋白偶联物)

荧光染色对照的设置

阳性对照

使用已知阳性样本，帮助排除试剂的质量、浓度、特异性以及染色方法等因素

阴性对照

空白对照（自发荧光）

自发荧光，即不经荧光染色细胞内部荧光分子经光照发出的荧光。自发荧光信号为噪声信号。一般说来，细胞成分中能产生自发荧光的分子（核黄素、细胞色素等）的含量越高，自发荧光越强，如肿瘤细胞、粒细胞等；样本死细胞比例越高，自发荧光越强。

同型对照（自发荧光 + 非特异荧光）

补偿对照（双色或多色分析时）

同型对照的选择

同型对照 (Isotype Control) :

与实验染色的单克隆抗体特异性无关的免疫球蛋白亚型

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

用于消除由于抗体非特异性结合到细胞表面的Fc受体而产生的背景染色

例如，标记FITC的单克隆抗体为小鼠IgG1亚类抗体，标记PE的单克隆抗体为小鼠IgG2a亚类抗体，同型对照应选用相同浓度和剂量的未免疫小鼠血清的纯化IgG1(γ 1) -FITC和IgG2a(γ 2a)- PE

补偿对照的设置

补偿对照（双色或多色分析时）

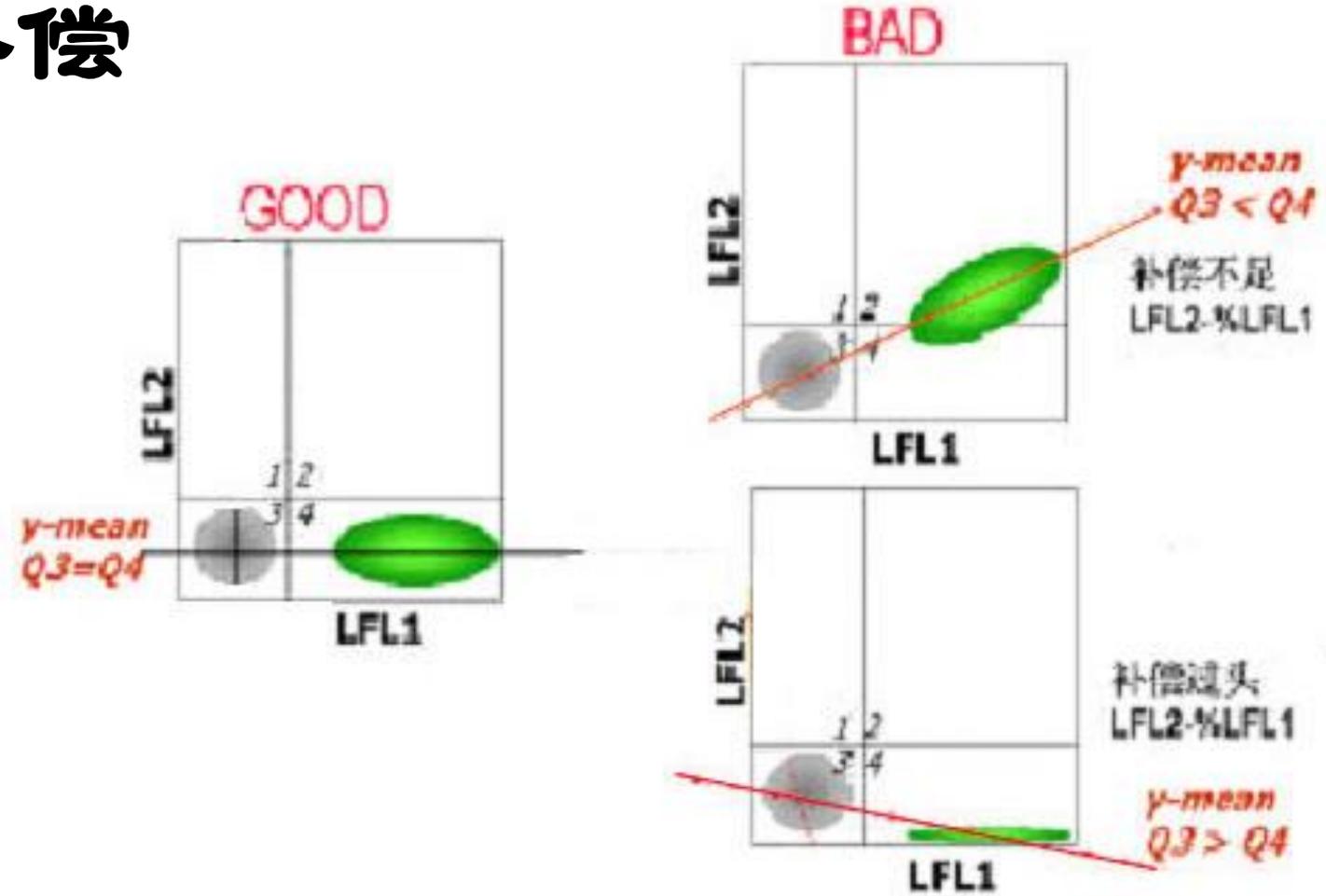
荧光补偿（compensation）是指在流式细胞多色分析中，纠正荧光素发射光谱重叠（spectral overlap）的过程，即从一个被检测的荧光信号中去除任何其他的干扰荧光信号

※几色分析就需要制备几个补偿对照管

※将单种荧光素标记的单克隆抗体分别进行单色荧光染色

双色荧光补偿

天坛





Aria流式细胞仪的具体使用： 见word版本FACS Aria开机、关机、分选程序

天坛神经免疫中心



神经免疫所