

流式培训

医学研究院共享中心流式平台



第一部分：流式理论及仪器使用

开始前的准备-1

了解你要使用的仪器

BD FACSCelesta (3光12色)



优势：405激光有5个通道

640激光有3个通道

缺点：鞘液桶易漏气，若RUN
指示灯异常，请联系管理员；

Excitation Laser	Filter	Fluorochrom			
405	450/40	DAPI	V450/BFP	BV421	Pacific Blue
	525/50	BV510	V500		
	610/20	BV605			
	670/30	BV650			
	780/60	BV786			
488	530/30	BB515	FITC	Alexa Fluor 488	GFP
	575/25	PE			
	610/20	PI	PE-CF594	PE-Texas Red	
	695/40	7-AAD	PerCP-Cy5.5	PE-Cy5	
640	670/30	APC	Alexa Fluor 647		
	730/45	APC-R700	Alexa Fluor 700		
	780/60	APC-Cy7	APC-H7		

开始前的准备-1

了解你要使用的仪器

BD LSRFortessaX-20 (4光11色)



优势：唯一配有561激光的流式分析仪；
检测mCherry选此仪器；
640激光有3个通道

缺点：鞘液桶体积小，需注意鞘液是否足够

Excitation Laser	Filter	Fluorochrome			
375	450/50	Pacific Blue	DAPI		
	525/50	AmCyan	Indo-1 (Blue)	Pacific Orange	
488	530/30	GFP	Alexa Fluor 488	FITC	
	710/50	PerCP	PerCP-Cy5-5	7-AAD	
561	575/25	PE			
	610/20	PI	PE-mCherry	PE-Texas Red	PE-CF594
	670/30	PE-Cy5			
	780/60	PE-Cy7			
640	670/30	APC			
	730/45	APC-Alexa700			
	780/60	APC-Cy7			

BD的两台仪器开机后，请关注 RUN指示灯的颜色

仪器状态正常
指示灯为绿色，可以正常使用



仪器状态异常
指示灯为桔色，请联系管理员



开始前的准备-1

了解你要使用的仪器

Beckman Cytotflex (3光8色)



优势：操作界面友好，易学易上手，
新仪器好用，一般实验首选该仪器；
做一次补偿，后续实验可以共用一

组补偿矩阵，不需重新制备补偿管进行补偿调节；

缺点：请确认通道是否满足实验需求；

激光	荧光通道	CytoFLEX 通道名称	通用的荧光染料
488 nm	525/40 BP	FITC	FITC、Alexa Fluor™488、 CFSE、Fluo-3
	585/42 BP	PE	PE、PI
	690/50 BP	PC5.5	PC5.5、PC5、PerCP、 PerCP-Cy5.5、PI、DRAQ7™
	780/60 BP	PC7	PC7、DRAQ7™
638 nm	660/10 BP	APC	APC、Alexa Fluor™647、 eFluor™660、Cy5
	780/60 BP	APC-A750	APC-A750、APC-Cy7、 APC-H7、APC-eFluor™780、 DRAQ7™
405 nm	450/45 BP	PB450	Pacific Blue™dye、V450、 eFluor™450、BV421
	525/40 BP	KO525	Krome Orange、AmCyan、 V500、BV510

开始前的准备-1

了解你要使用的仪器

Agilent Novocyte (3光13色)



备配置如下：

流式细胞仪· NovoCyte 3130		配置
√	488-nm	FITC(530/30)
		PE(572/28)
		PE-Texas-Red(615/20)
		PerCP(675/30)
		PE-Cy7(780/60)
√	405-nm	Pacific Blue(445/45)
		AmCyan-430(530/30)
		Pacific Orange(572/28)
		Qdot605(615/20)
		Qdot655(675/30)
√	640-nm	Qdot800(780/60)
		APC(675/30)
		APC-Cy7(780/60)

优势：操作界面友好，易学易上手，开关机简单方便；

可以孔板自动上样，也可以24管自动上样，样品较多时推荐此仪器；

做周期有自带的分析软件，可以在仪器上直接分析；

缺点：复杂配色时调补偿需特别关注；

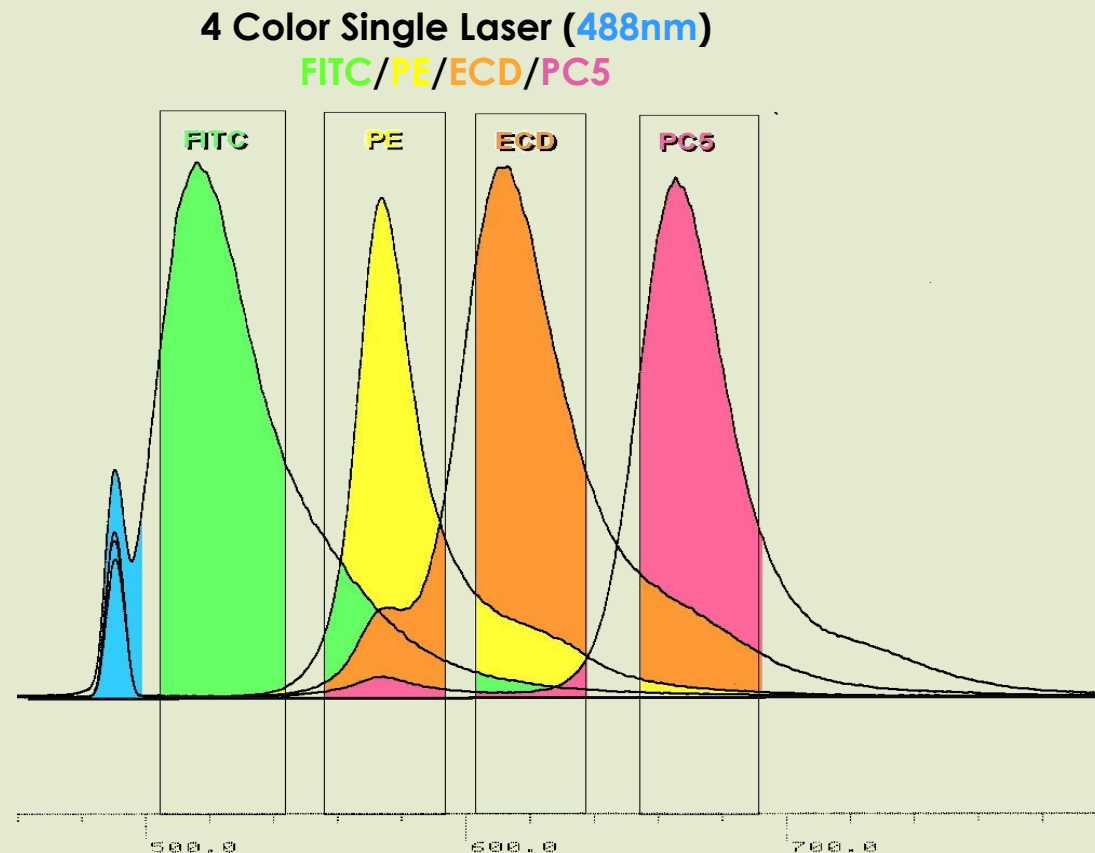
开始前的准备

选择合适的荧光染料

- 选择荧光最强的，但是尽量减少荧光间互相干扰
- 注意抗原表达量的差异与荧光染料的选择

按照荧光强度排序

PE > APC > PE-Cy5
> Alexa Fluor 647
> **PE-Cy7** > PerCP-Cy5.5
> **Alexa Fluor 488**
Pacific Blue > **FITC**
> AmCyan > APC-Cy7
> **PercP** > BD APC-H7



开始前的准备

选择合适的流式耗材

- **BD仪器必须用适配BD的流式管，其他两台可用通用流式管**
- **100-300目尼龙网，过滤样品用**

流式管订购信息：（少量可以在流式平台购买）

梅林峰

电话：139-7104-4012

189-8628-0008

流式基本原理

流路

- 流动室
- 鞘液
- 样本流 单细胞悬液

$5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ 个/ml, 300-500微升

光路

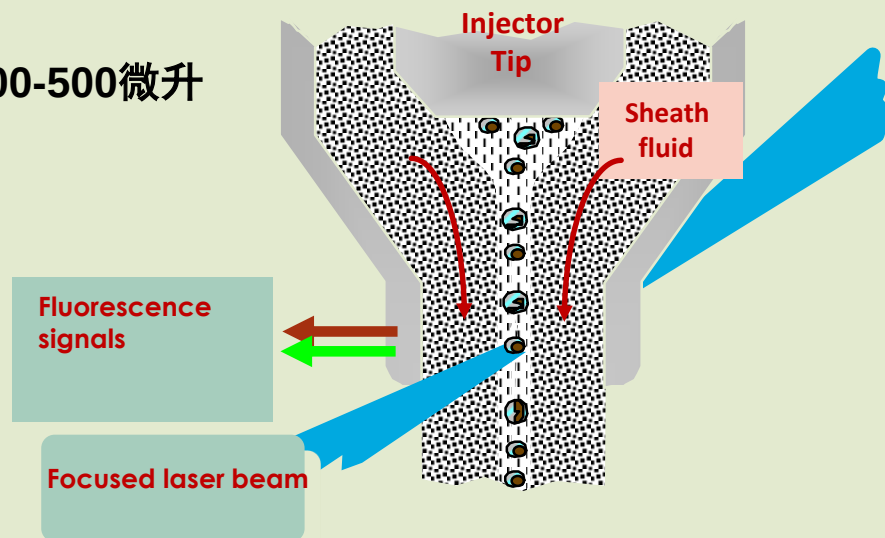
- 光源
- 滤片
- 光电倍增管PMT HV

电路

- 放大电路HV及GAIN 增益
- A/D转换

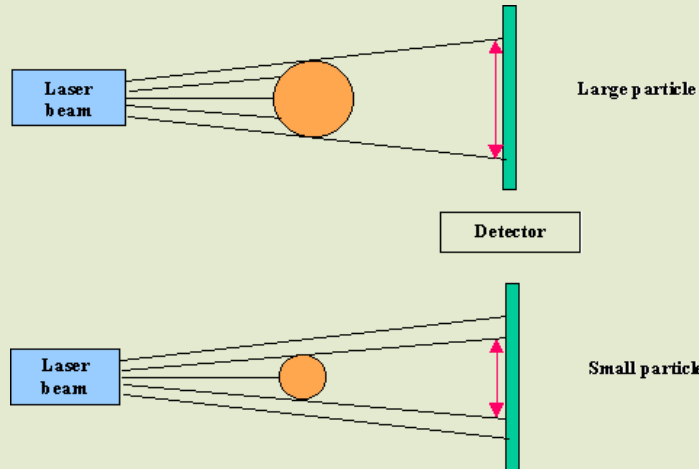
统计

计算机



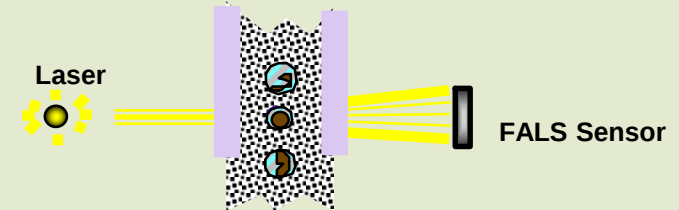
流式基本原理

FSC

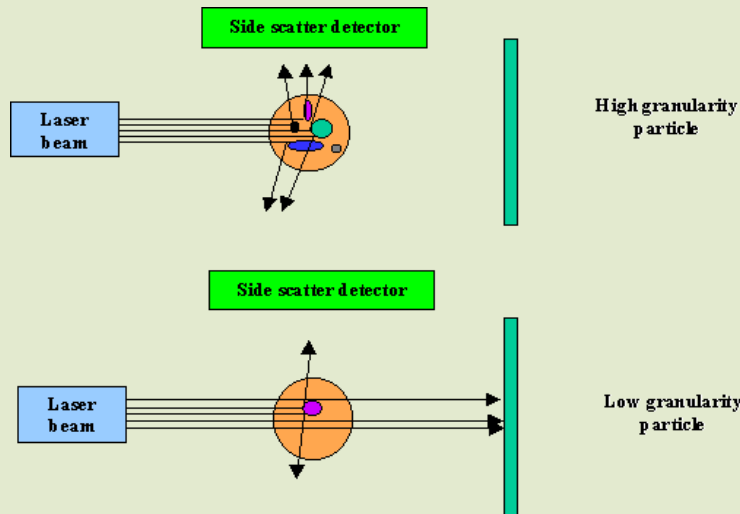


● 前向角散射光 (FSC, Forward Scatter)

入射激光的前向散射光信号
细胞相对大小及其表面积

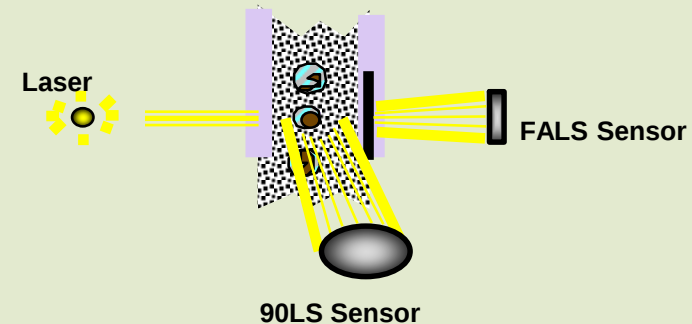


SSC

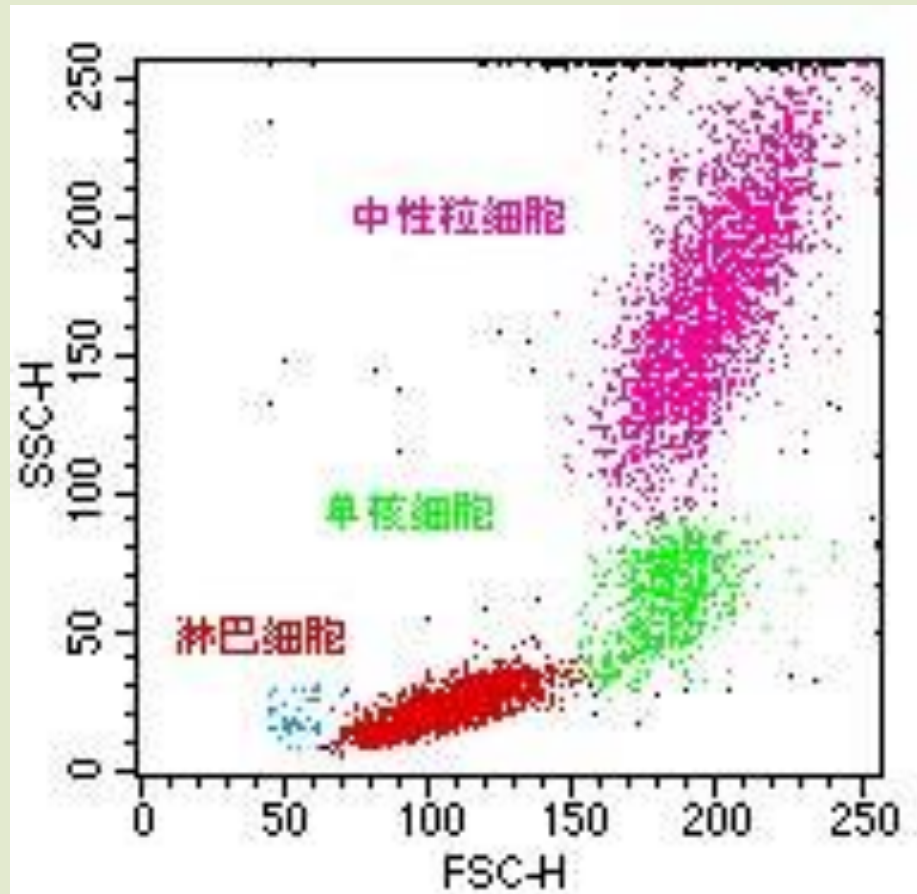


● 侧向角散射 (SSC, Side Scatter)

入射激光90°角的散射光信号
细胞粒度及细胞内相对复杂性



流式基本原理

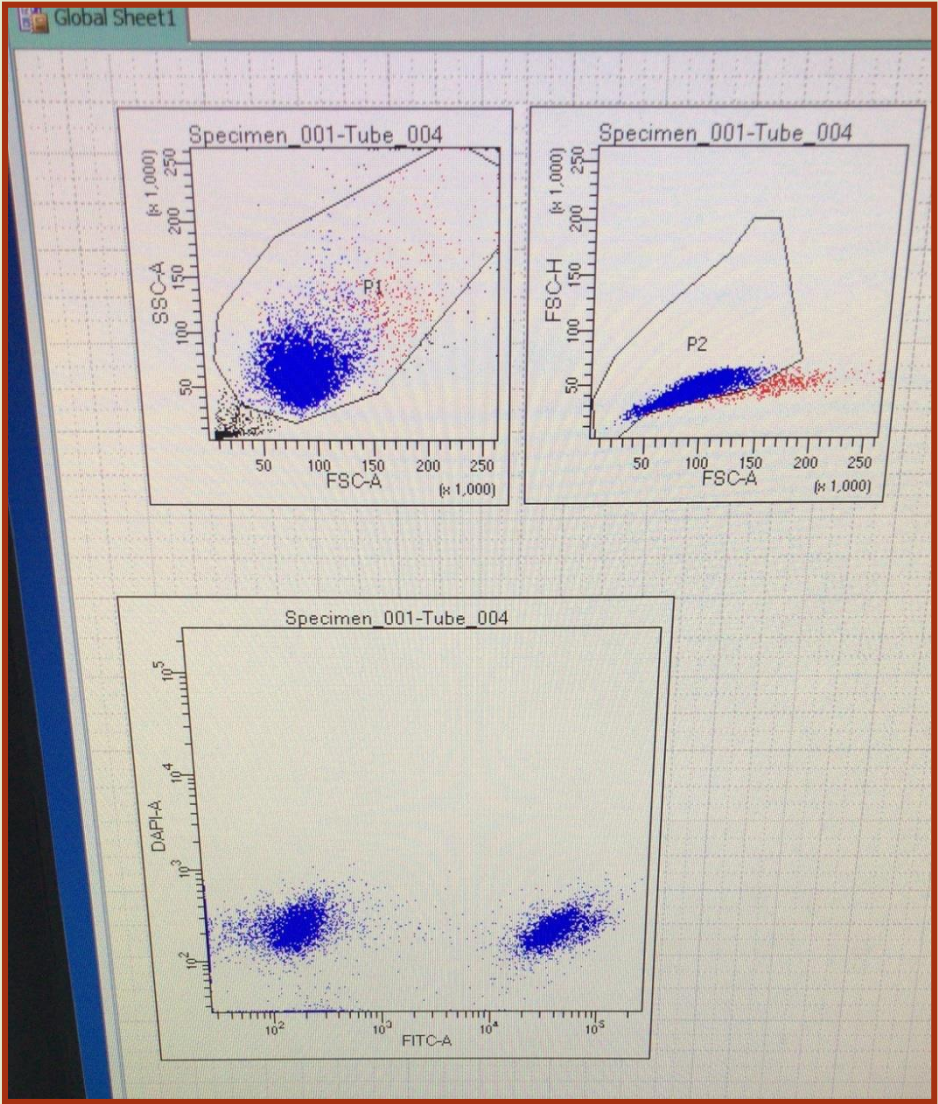


常用流式方案的设计

方案	对照（针对仪器而言）	调节
单染方案的设计： GFP	不染色的细胞（OR同型对照）	电压
细胞周期方案的设计： PI	不需要对照	电压 去粘连
双染方案的设计： FITC/PI	不染色的细胞（OR同型对照）， 单染的细胞（两管）	电压 补偿
多色方案的设计： 大于3色	不染色的细胞（OR同型对照）， 单染的细胞（有几种颜色就需要 几管细胞）	电压 补偿（两两补偿）

常用流式方案图示

	X 轴	Y轴	目的	参数
找到目的细胞	FSC-A	SSC-A	区分细胞和碎片	线性
找到单个细胞	FSC-A或SSC-A	FSC-H或SSC-H	区分单个细胞和黏连细胞	线性
	PI-A	PI-H		
方案	GFP-A			对数
	PI-A			线性
	GFP-A	PI-A		对数



特别提醒

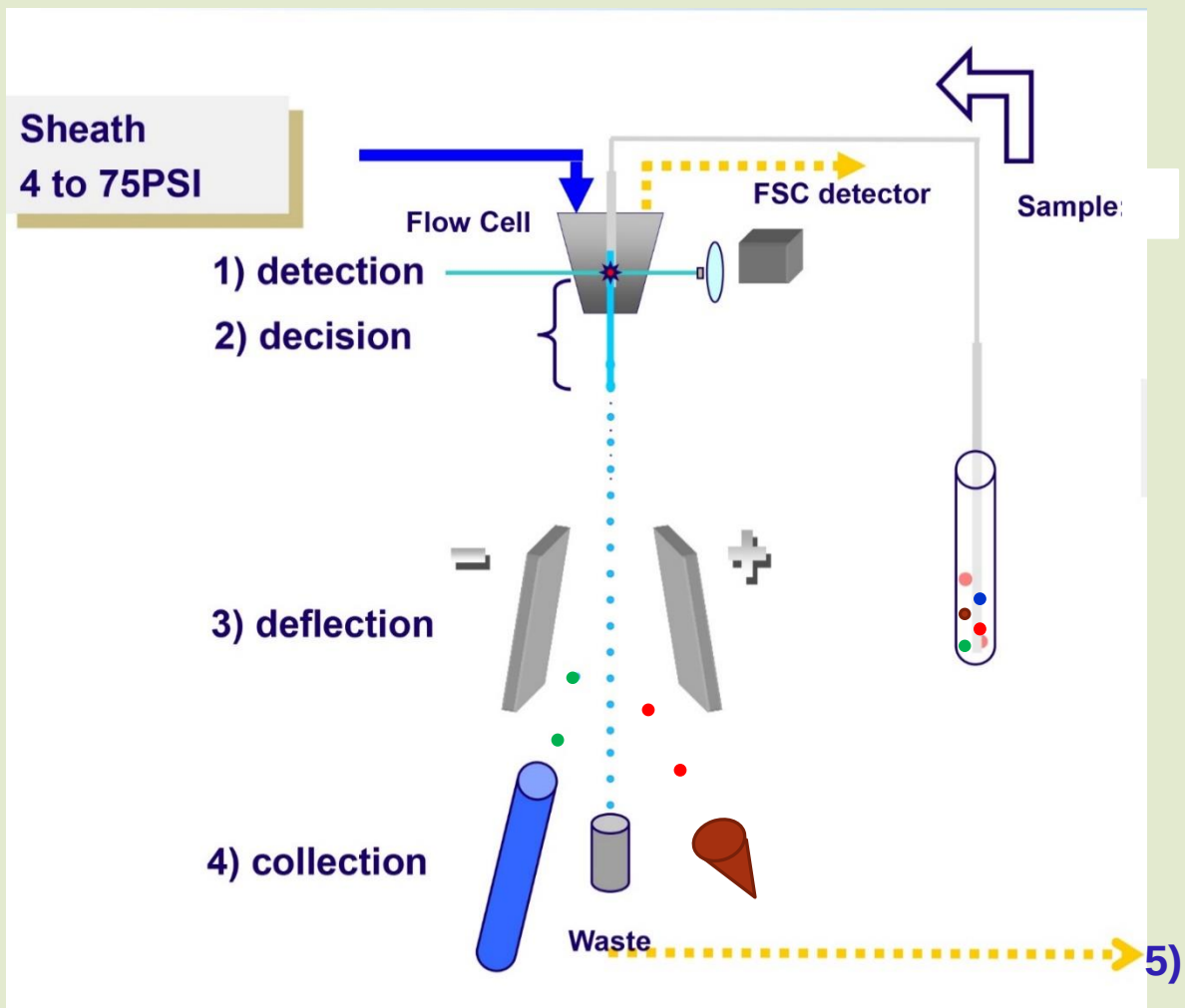
- 禁用U盘；
- 请按照预约时间使用仪器，如有特殊情况，请告诉负责人；
- 所以上机样品**必须经过尼龙网过滤**；上机前振荡样品，防止沉淀，结团；
- 电脑相对清洁，请不戴手套，或者戴干净手套操作；



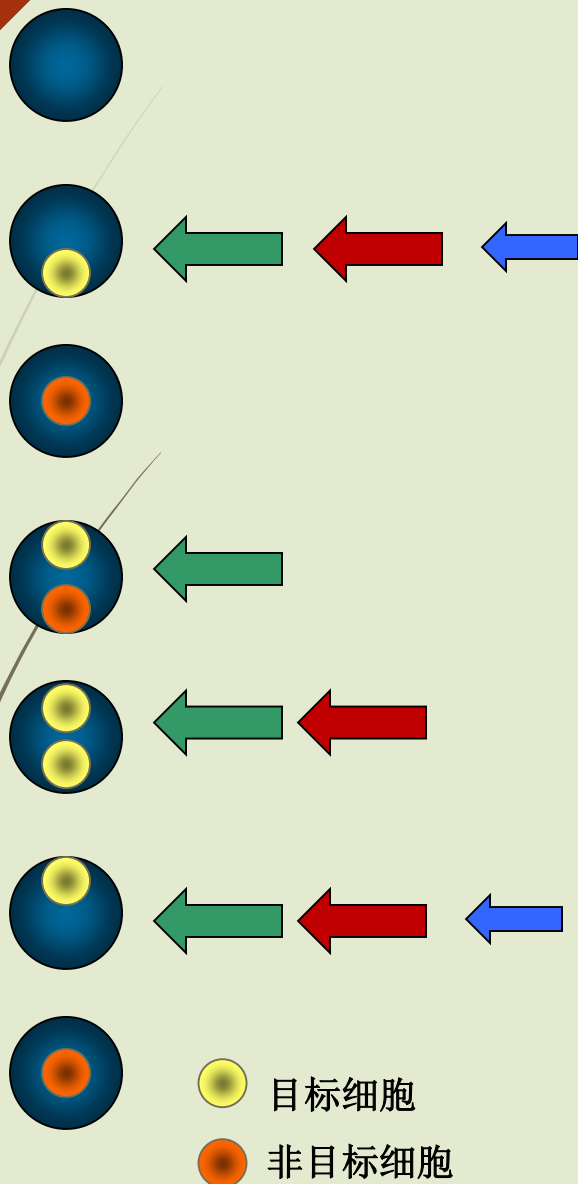
第二部分：流式分选

分选原理

1. 细胞列队通过激光束
2. 信号收集、确认靶细胞
3. 含有靶细胞的液滴即将
断开时加电荷
4. 液滴通过电场，偏转入
收集管
5. 未充电液滴进入废液槽



分选模式



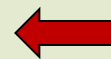
Enrich mode



(富集模式)

所有含有目标细胞的液滴（即使含有非目标细胞或含有多个目标细胞）

Purify mode



(最常用的模式)

只含有目标细胞的液滴（单个或多个目标细胞均可），但不含有非目标细胞。

Single mode



(单细胞分选)

只含有一个目标细胞的液滴

开始前的准备-1

BD FACSAriaIII (4光12独立通道)

Excitation Laser	Filter	Fluorochrome			
375	450/40	Pacific Blue	DAPI	Horizon V450	
	530/30	AmCyan	Indo-1(Blue)	Pacific Orange	
488	530/30	GFP	Alexa Fluor 488	FITC	
	585/42	PE			
	616/23	PE-Texas Red	PE-CF594	PI	
	695/40	PE-Cy5	PerCP /PerCP-Cy5.5	7-AAD	
	780/60	PE-Cy7			
561	610/20	PE (561) / mCherry	PI		
	670/14	PE-Cy5 (561)			
	780/60	PE-Cy7 (561)			
640	660/20	APC	Alexa Fluor 647		
	780/60	APC-Cy7	APC-H7		

开始前的准备-2

- **安全性问题：**

由于在分选过程中，样本可能通过液滴震荡产生气溶胶，所以不接受会传播人类病原菌的生物有害样本，也不接受含放射性生物样品。

- **细胞的大小与形态，以便选择分选用喷嘴。**

（我们目前只有70um——130um 规格喷嘴，无法分选直径大于45um的细胞）

所分选细胞的直径最好小于喷嘴直径的1/5，至少小于1/3。细胞的形态会影响分选的结果，理论上越接近于球形的细胞，分选过程中的剪切力对细胞造成的伤害就越小。形态特殊的细胞应选择较大的喷嘴，以减轻分选过程对细胞造成的伤害。

- **分选用液体为BD专用鞘液，流式上样管、尼龙网请提前无菌处理**

分选工作流程 -1

用户经过培训

流式基本原理
参数的意义
方案的设计调整
数据的分析



了解待分选样品（提前进行流式检测）

目的细胞的用途
目的细胞的理想数目
目的细胞的比例
起始细胞的数目
对无菌的要求

提前准备仪器

清洗、消毒鞘液罐、废液罐
放置专用鞘液
紫外照射
清洗消毒上样管道
仪器运行0.5-2小时



提前**1-3**天填写在线表格，
老师审核后，网上预约



分选当天

分选工作流程 -2

制备待分选细胞的单细胞悬液，重悬于PBS+1%FBS,浓度约为 $1-5 \times 10^7/\text{ml}$ （具体浓度因细胞而异），尼龙网过滤，置于无菌EP管或5ml 流式上样管中，封口、避光。

14ml/5ml/EP管或各种孔板接收（内有双倍血清和抗生素的培养基）。

确认液流稳定

确认光路聚焦

调分选4束液流

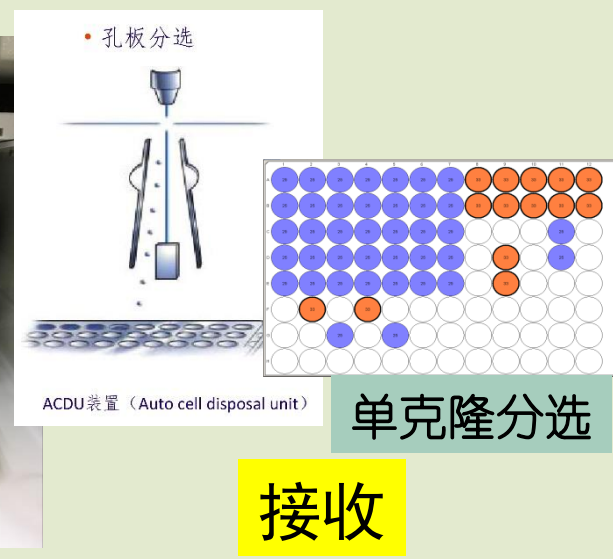
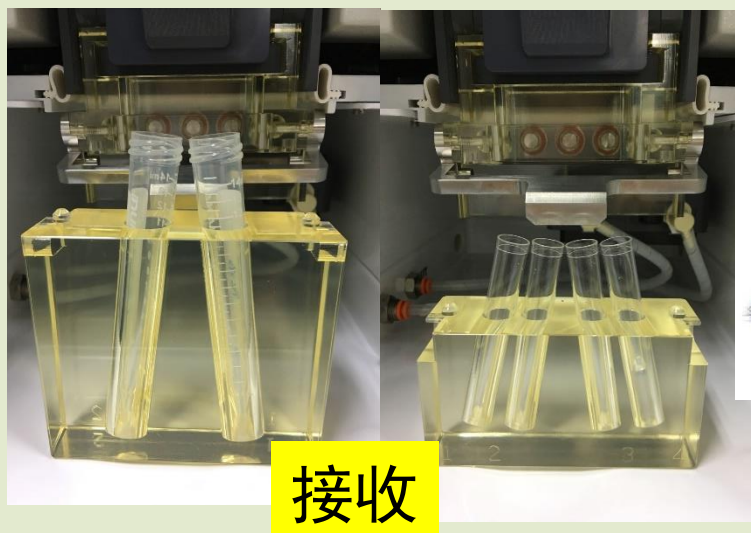
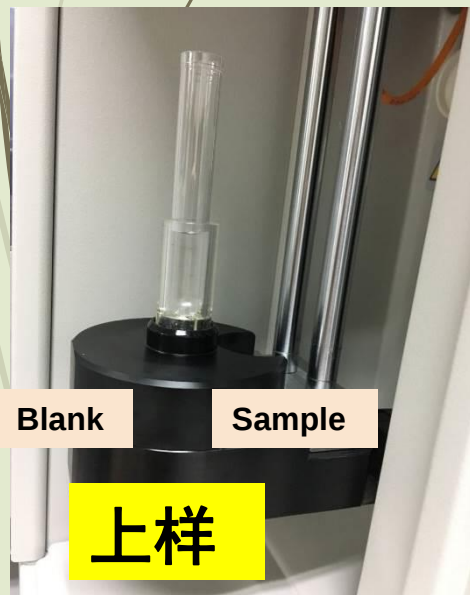
计算液滴延迟时间

确定待分选细胞

确认分选细胞进入接收管

分选

纯度检测



分选工作流程 -3

血清及抗生素加倍的培养基继续2-3天后，转为正常培养基。

注意是否污染。

一周后请反馈细胞情况。

漂白水、超纯水清洗管道

样本制备

获取单细胞悬液→荧光抗体染色→调整细胞浓度 ($1-5 \times 10^7/\text{ml}$)→过滤细胞→移入流式管→避光置冰上运至分选室→上机检测并设定分选条件→分选细胞→上机回测，检测纯度。

1. 上样管，滤网需要提前灭菌，保证细胞的无菌状态，因为分选得到的细胞还要继续培养；
2. 不能使用固定剂固定细胞，因为活细胞经固定剂处理后即死亡；
3. 保证上机样品为单细胞悬液，且细胞数量足够；
4. 建议分选上样管中的缓冲液使用含0.5-1% FBS的PBS，普通培养基中的酚红可能会干扰分选；若用培养基的话，颜色不能太深，血清浓度不能超过2%，否则粘性太大影响分选。
5. 如细胞分选后需再次培养，请准备含血清的收集管。建议在5ml离心管中加入1-2ml血清及其它必需组分，保证分选完毕时血清浓度大于5%；
6. 如要分选GFP等转染的样品，请提供未经转染的相同细胞为阴性对照；
7. 如要多重荧光染色标本的分选，请提供各种单一荧光染色的标本；

常见问题

Q1. 上机样品需要溶在何种溶液中？是否可以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，可使用含1%FBS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。

•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，可以选用以下三种没有EDTA的缓冲液。

- 1 mM EDTA, 25mM Hepes (pH7.0) and 0.5% - 2% BSA in 1× PBS (without Ca^{2+} and Mg^{2+})
- 1× HBSS (without phenol red) with 1% BSA
- 0.5% - 2% BSA in PBS(without Ca^{2+} and Mg^{2+})

常见问题

•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。

- 5 mM EDTA, 25mM Hepes (pH7.0) and 0.5% - 2% BSA in 1× PBS (without Ca^{2+} and Mg^{2+})
- 0.5-2% BSA in PBS(without Ca^{2+} and Mg^{2+})

•含有高比例死细胞的样本

这些配方可减少因死细胞释放出来的DNA所造成的细胞黏聚现象。

- 5mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 25mM Hepes (pH7.0), 25-50 $\mu\text{g/mL}$ DNAase I and 0.5% - 2% BSA in 1× PBS (without Ca^{2+} and Mg^{2+})
- 建议询问有经验者（使用相同细胞进行过分选）的分选缓冲液配方

常见问题

Q2. 如果细胞要再培养，会污染吗？

Ans: 分选房间为细胞间设置，所用的鞘液含防腐剂（微量），流式分选仪管路使用70%乙醇及清洗液定期清洗，分选前后上样管道用含次氯酸的溶液进行清洗，操作过程中尽量无菌操作，细胞培养基中加入正常或2倍量抗生素，可将污染机率降至很低。

Q3. 如果我想在分选后拿到 1×10^6 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：

$1 \times 10^6 \div 10\% \div 50\% \text{回收率} = 20 \times 10^6 \text{(起始细胞数)}$ ，所以你需要准备 2×10^7 细胞。高速分选、纯度模式、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，对会降低回收率。50%回收率是一个一般的参考值。

Q4. 通常做一次细胞分选需要多久时间？

Ans: 按照常规上样速度，分选 1×10^7 个细胞（在1ml总体积里），大概需要25-40分钟。（不同喷嘴耗时不同，喷嘴越大，分选耗时越长）

常见问题

Q5. 一个样品可以同时分选出几种细胞？

Ans: 从一个样品中最多同时分选出四种不同的细胞。

Q7. 分选后细胞的纯度有多少？

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

Q8. 如果阳性的细胞占总数的1%以下，还可以做分选吗？

Ans: 可以。

Q9. 分选时所使用的管子有哪些？

Ans: 上样一般使用1.5ml EP管和5ml流式管(无菌)；收集可以使用下面这几种，14ml尖底离心管 (最多双路分选)，5ml流式管/EP管 (最多四路分选)，以及各种标准孔板。