



流式基础原理及应用

BD COE 卓越中心

BD Life Science

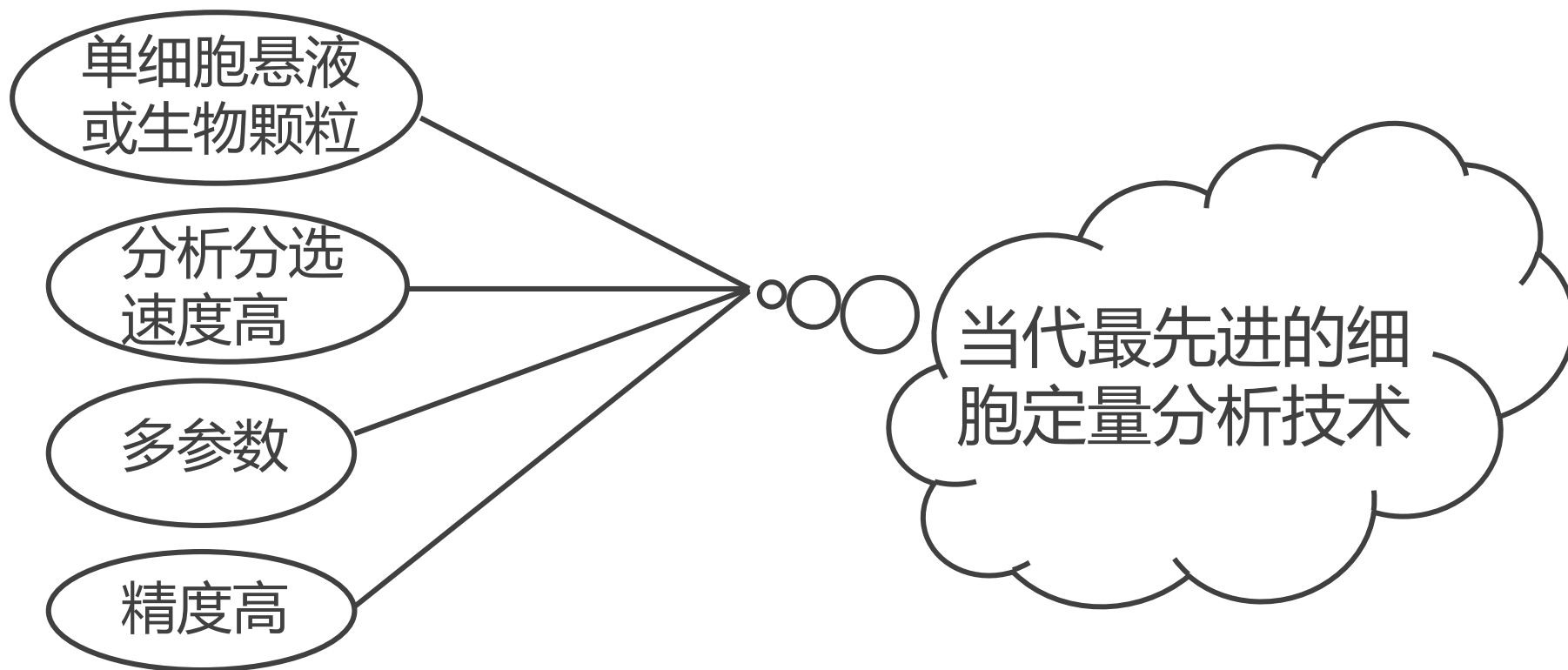


流式基本概念

流式细胞术的基本概念

- 研究对象为生物颗粒，如各种细胞、微生物及人工合成微球等。
- 流式细胞术（Flow Cytometry, 简称FCM）是一种对于快速直线流动状态中的连续的单个细胞或微粒进行多参数的分析或分选的技术。

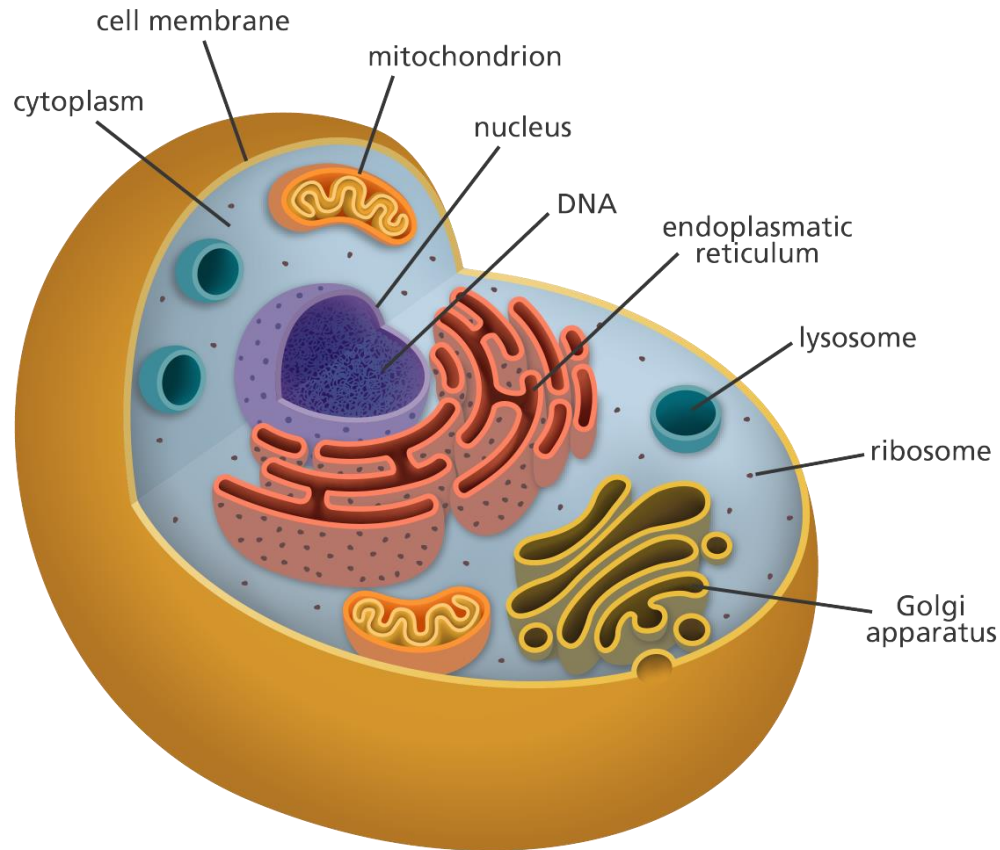
流式细胞术的特点



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）
 - ✓ $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ cells/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
-



流式细胞仪的组成 和工作原理

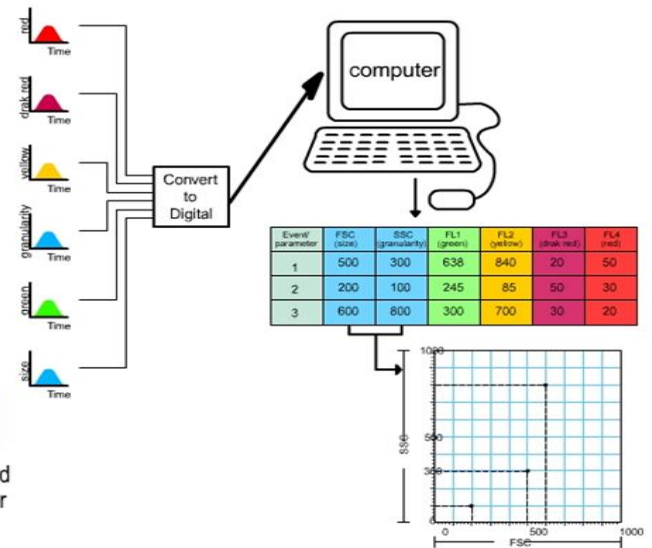
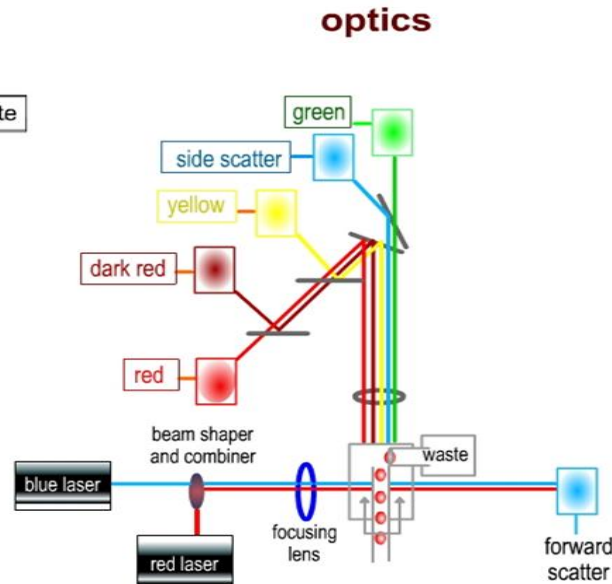
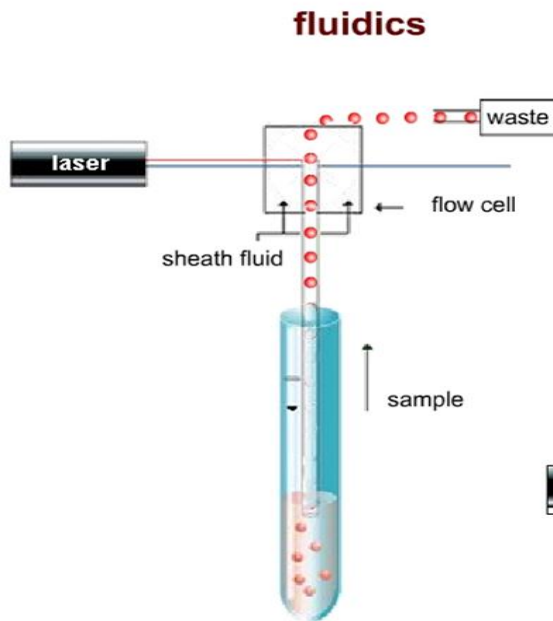
流式细胞仪仪器结构

- 液流系统

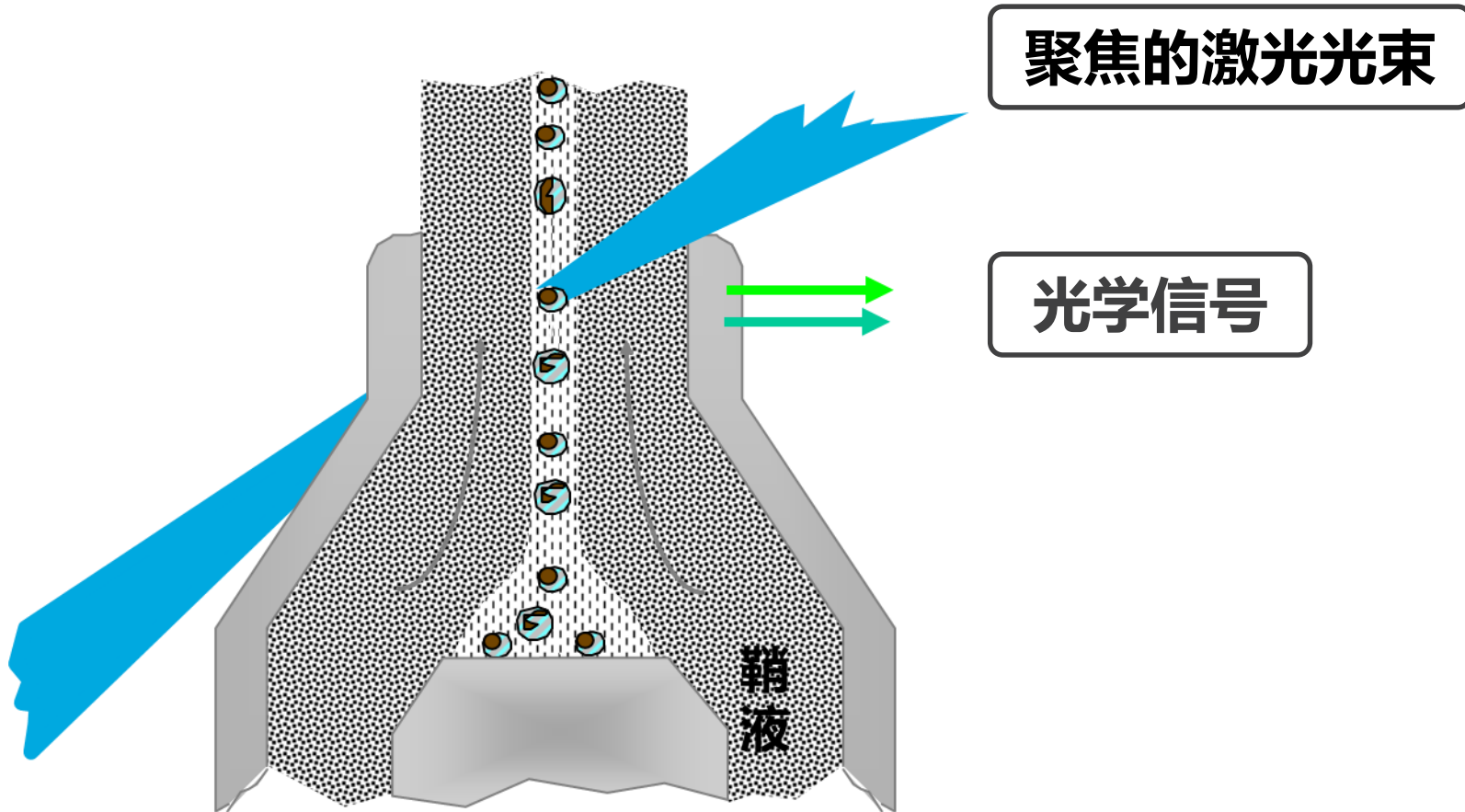
- 光学系统

- ✓ 激光光源
- ✓ 光收集系统

- 电子系统



液流系统-FLOW CELL(流动室)





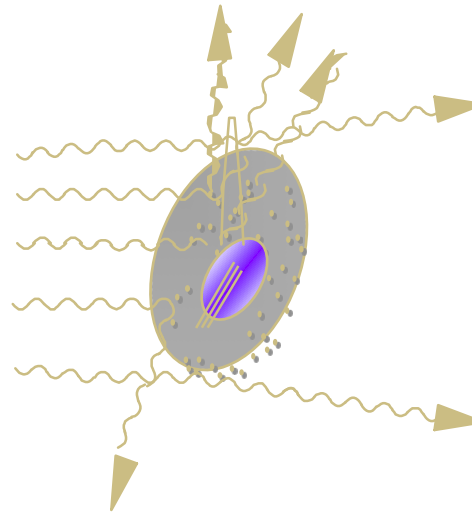
流式细胞仪的检测信号

散射光信号

侧向角散射光探测器

SSC (颗粒度)

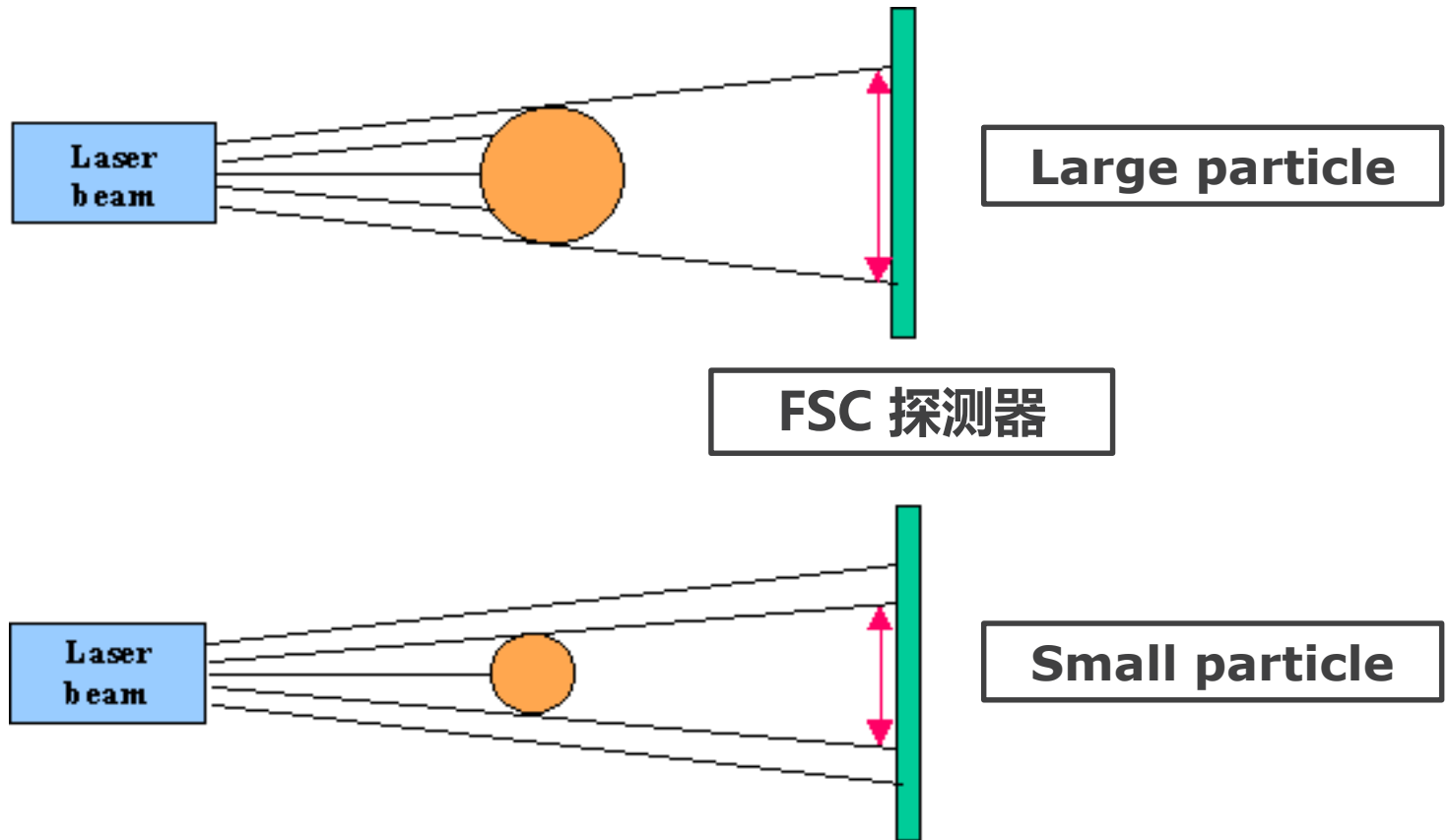
激光光源
Incident Light
Source



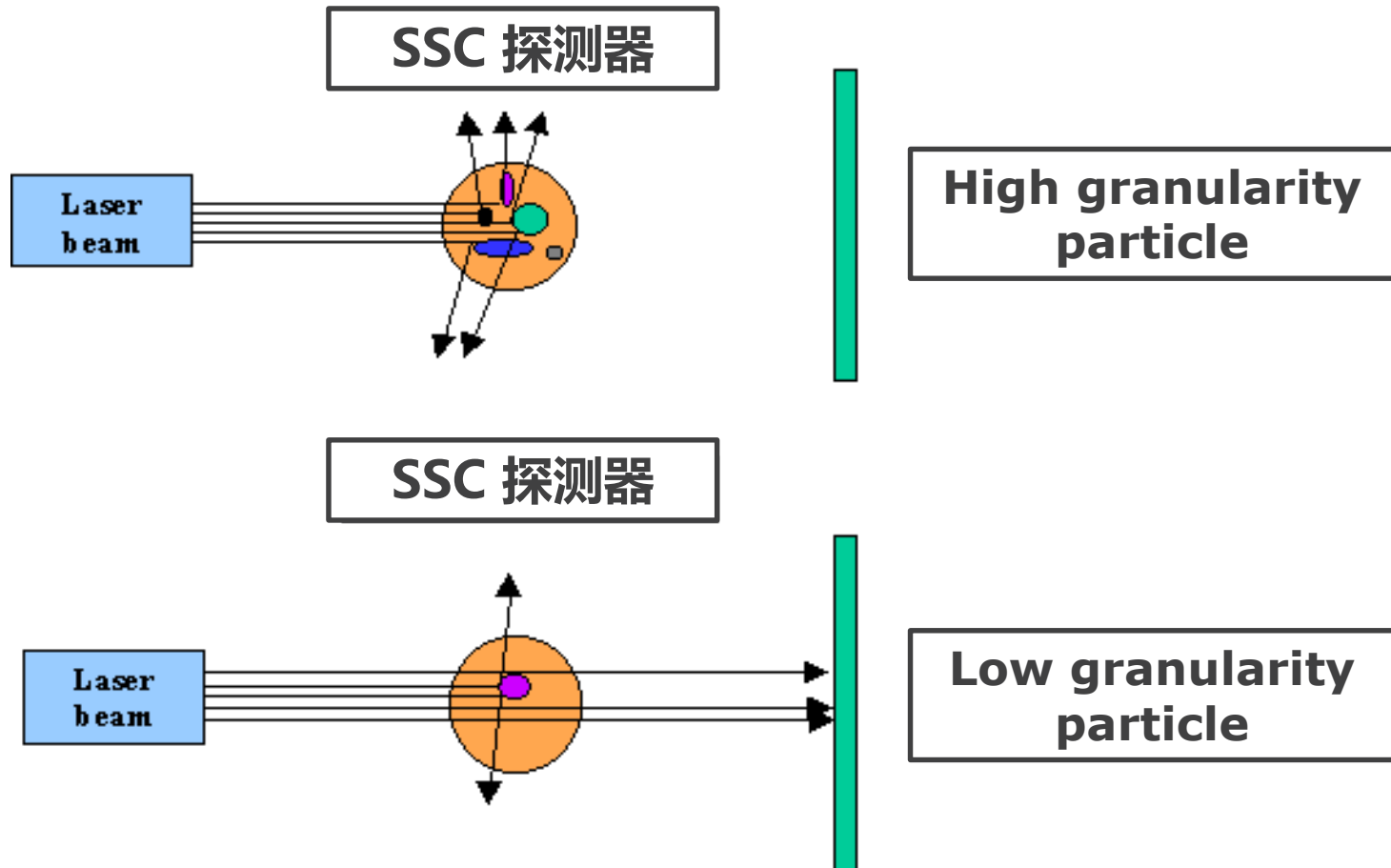
前向角散射光探测器

FSC (相反大小)

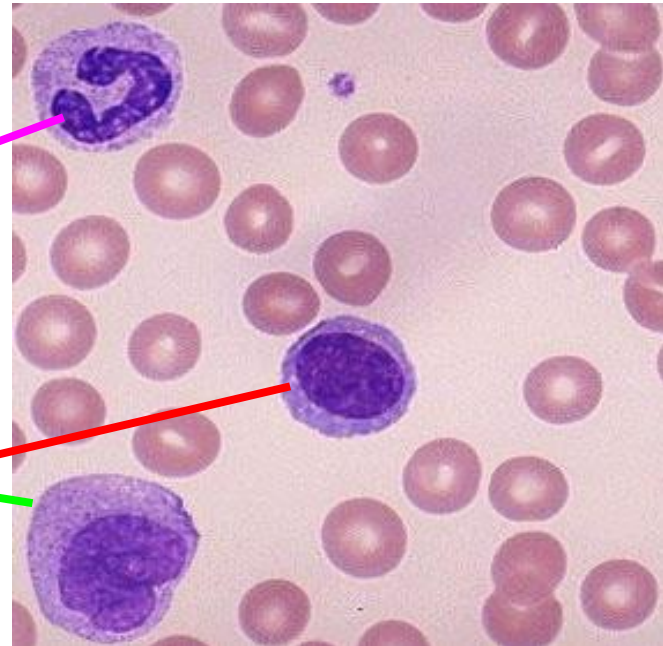
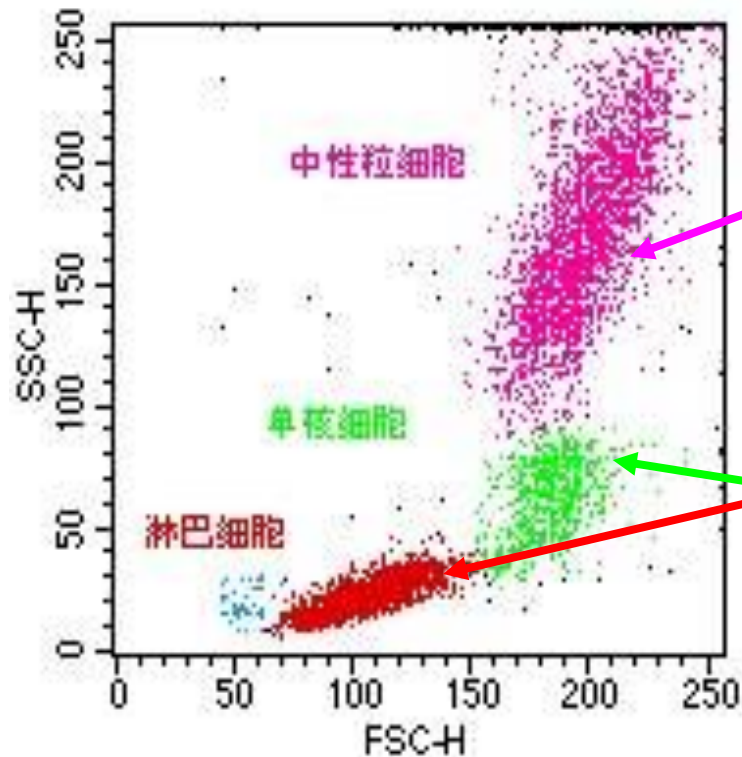
前向角散射光信号



侧向角散射光信号



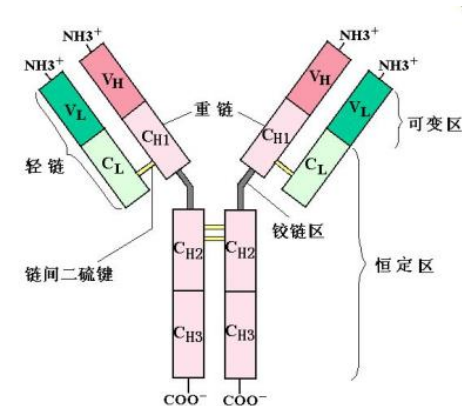
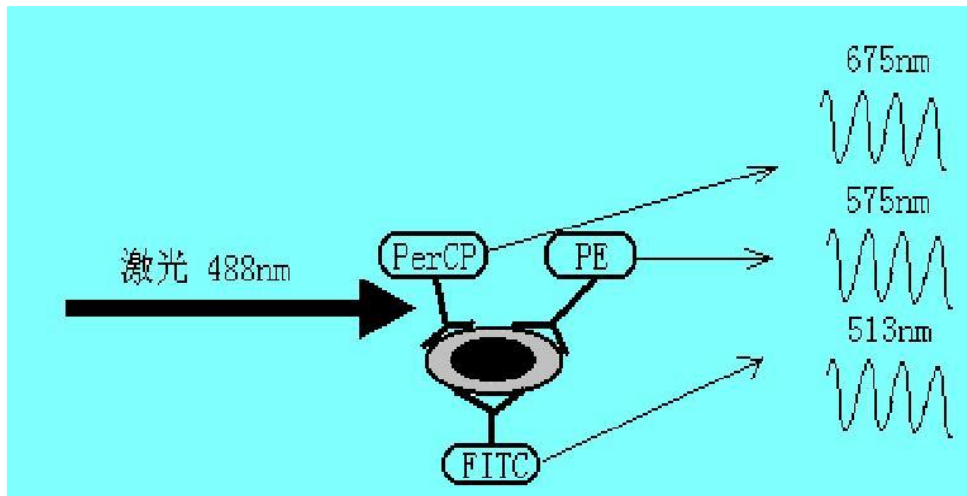
外周全血细胞散射光双参数点图 (红细胞溶解后)



流式细胞仪的检测信号

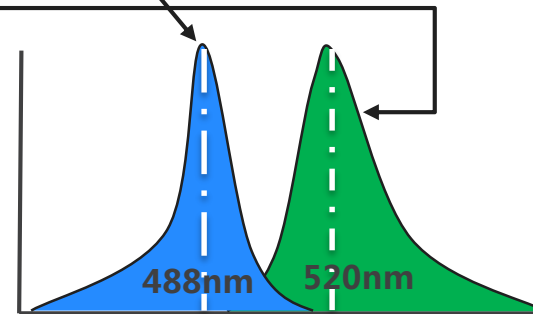
荧光信号

- 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

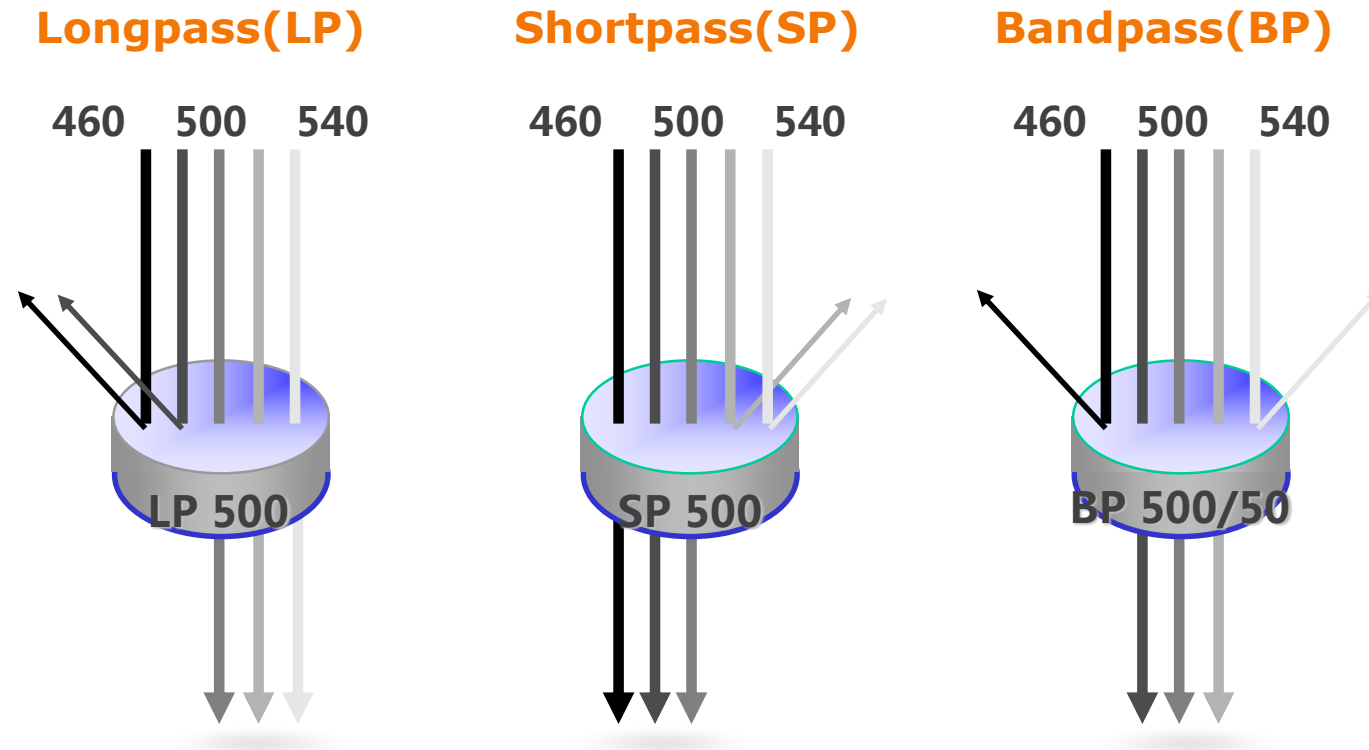
- 任何发荧光的物质分子都具有这两个特征光谱（nm）
- 激发光谱（Excitation, Ex）：
 - ✓ 是指能特异性地激发某种荧光素的一定波长范围内的光线，也称为吸收光谱。
 - ✓ 激发波峰（最大吸收波长）：Ex-Max
- 发射光谱（Emission, Em）：
 - ✓ 是指某一波长激发光引起荧光素发射的一定波长范围内的荧光
 - ✓ 发射波峰（最大发射波长）：Em-Max
- 荧光素的使用：
 - ✓ 选择正确的激光器
 - ✓ 确定所需探测器（PMT）



异硫氰酸荧光素（FITC）

光学系统：滤光片

- 如何将一束混合的荧光区分开来，分别进行收集呢？
- 滤光片置于荧光探测器前，限定其接收的荧光的波长范围



Fluorescence Spectrum Viewer

Display Options

Curves:

4

Cytometer:

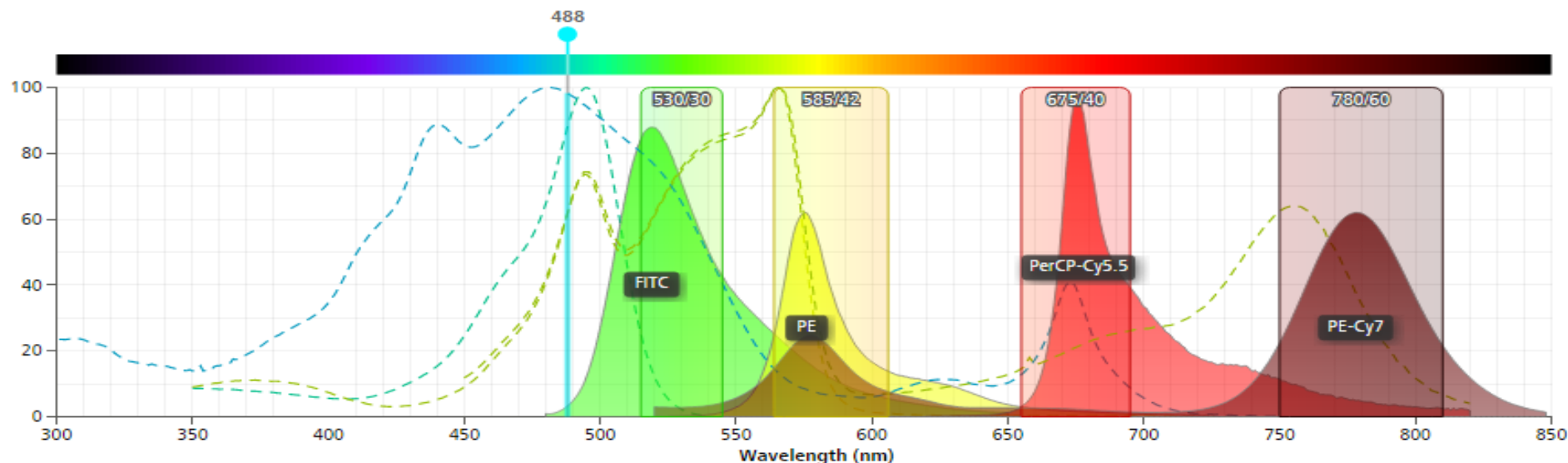
BD FACSAria™ II

Excitation (nm):

488

☒ Show Em when Ex % > 5

RESET

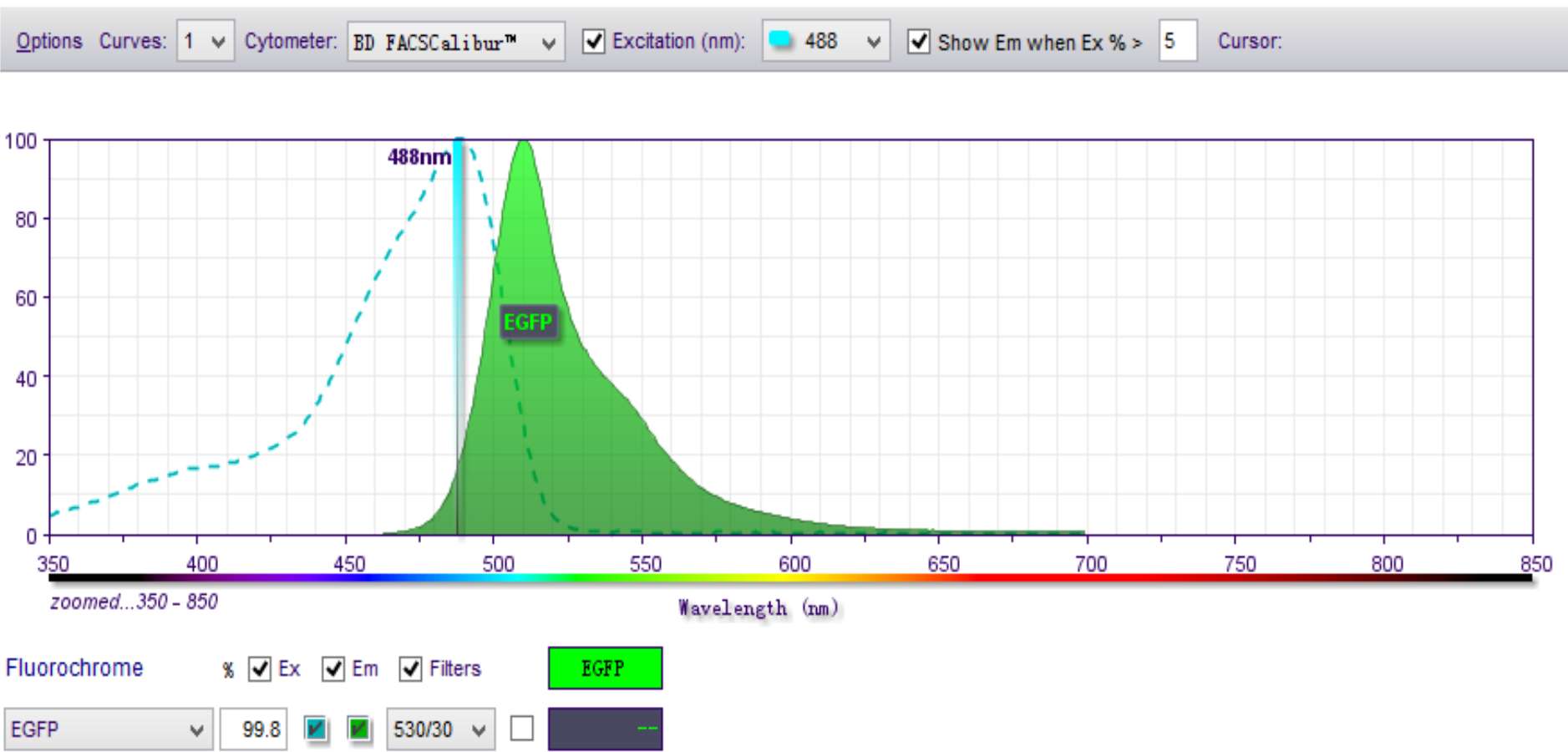


Fluorochrome	%Max	☒ Ex	☒ Em	Filters	☒	FITC	PE	PerCP...	PE-Cy7
1 FITC	88.0	☒	☒	530/30	☒	47.4%	0.4%	x	1.8%
2 PE	61.6	☒	☒	585/42	☒	12.5%	70.4%	x	16.4%
3 PerCP-Cy5.5	98.2	☒	☒	675/40	☒	x	3.3%	57.1%	1.9%
4 PE-Cy7	61.8	☒	☒	780/60	☒	x	x	9.6%	60.5%

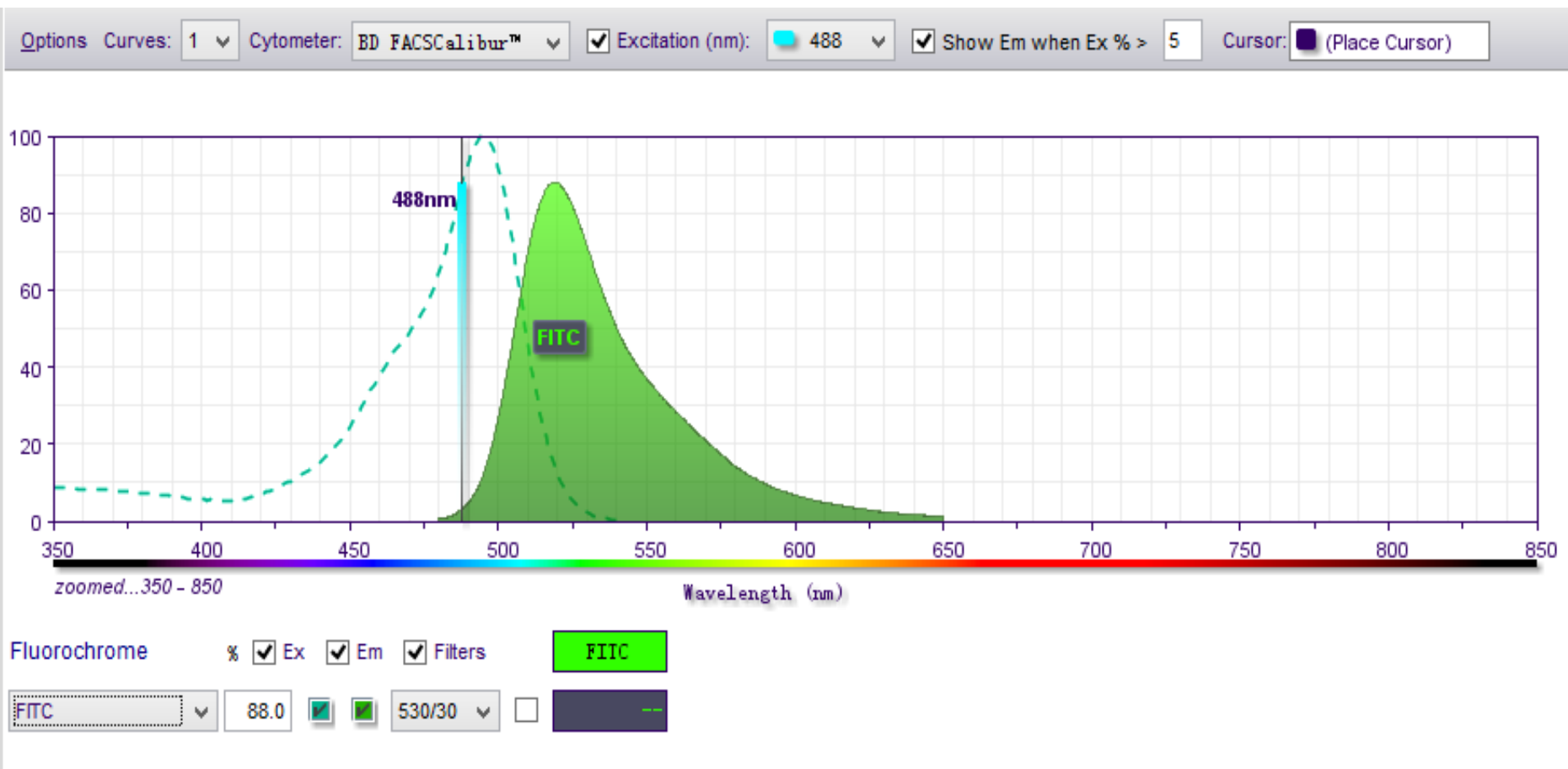
Add Filter:

ADD

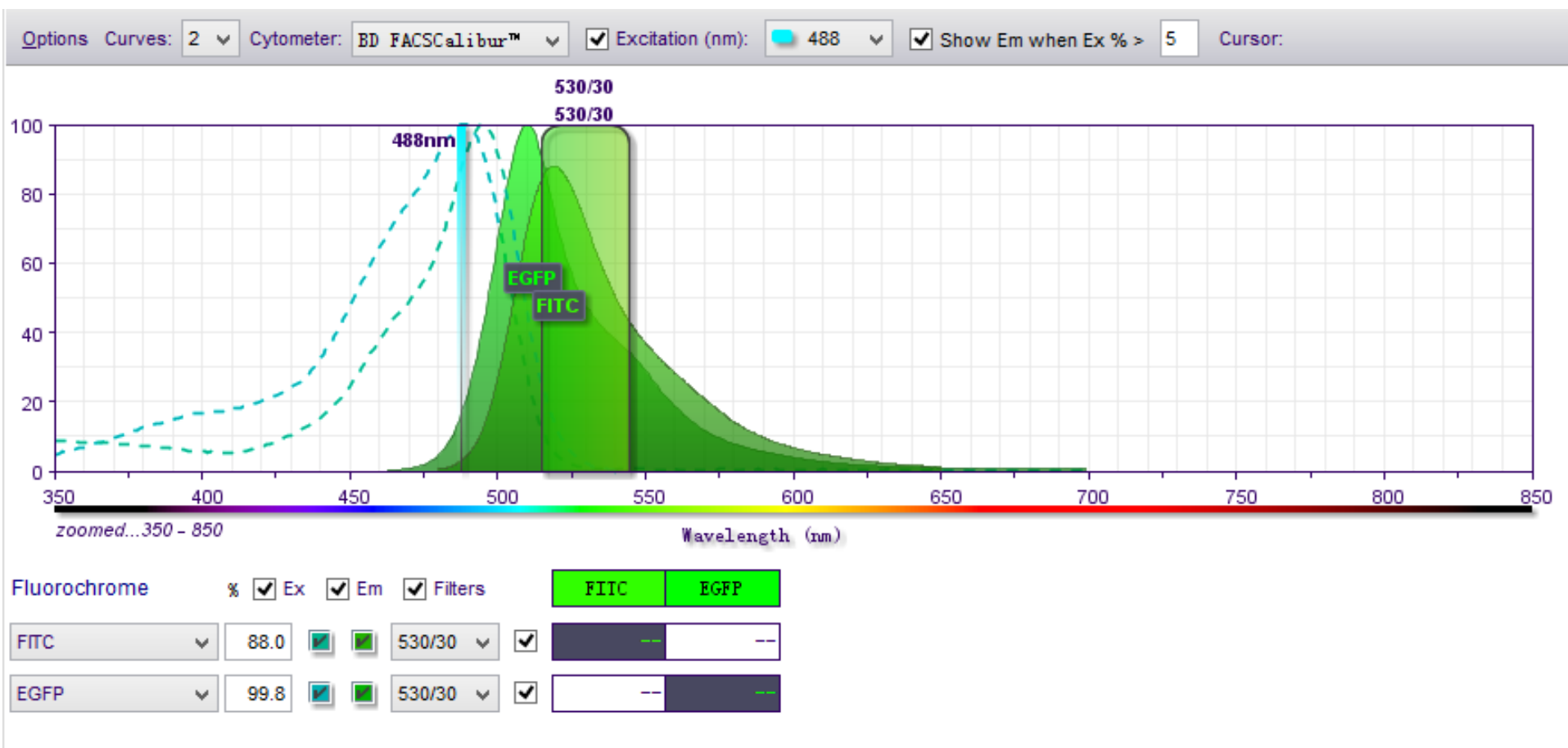
Fluorescence Spectrum Viewer



Fluorescence Spectrum Viewer

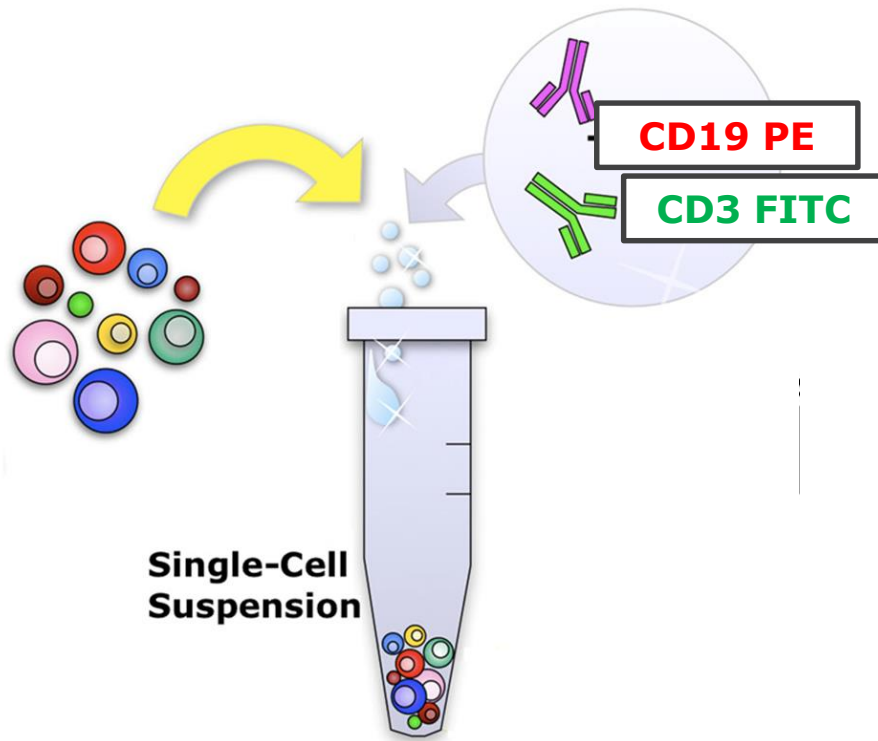


Fluorescence Spectrum Viewer

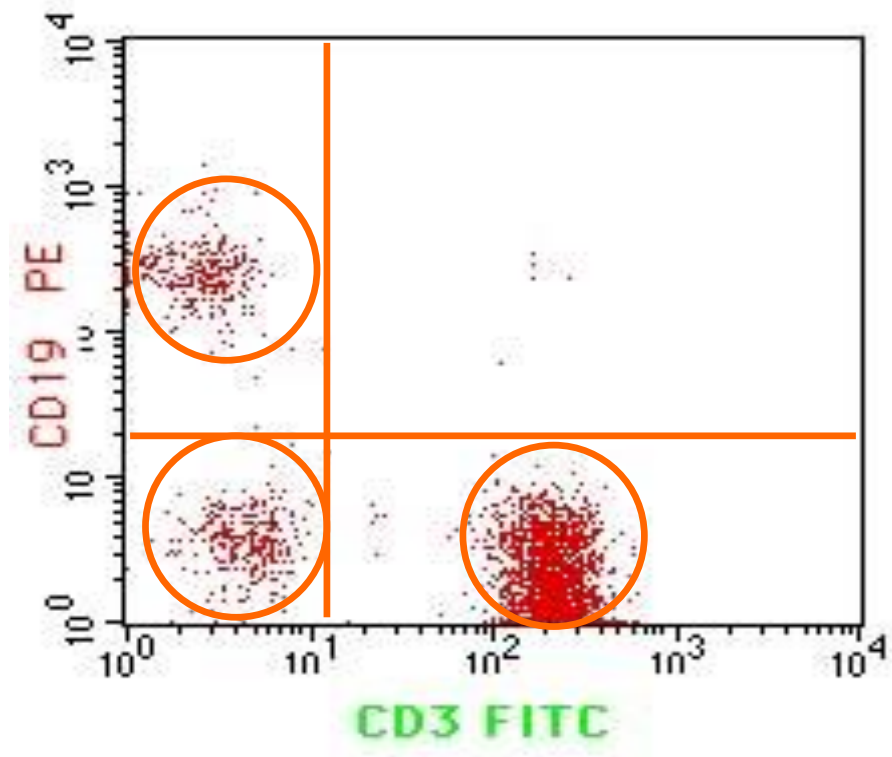


荧光信号

双色直接染色(孵育+洗涤)



双参数散点图





流式数据分析形式

数据存储

- FCS 2.0格式 , FCS3.0格式
- 常以列表模式 (LIST MODE) : 将每个细胞的每个检测参
量依次排列顺序存储

	FSC	SSC	FL1	FL2
Event 1	30	60	638	840
Event 2	100	160	245	85
Event 3	300	650	160	720

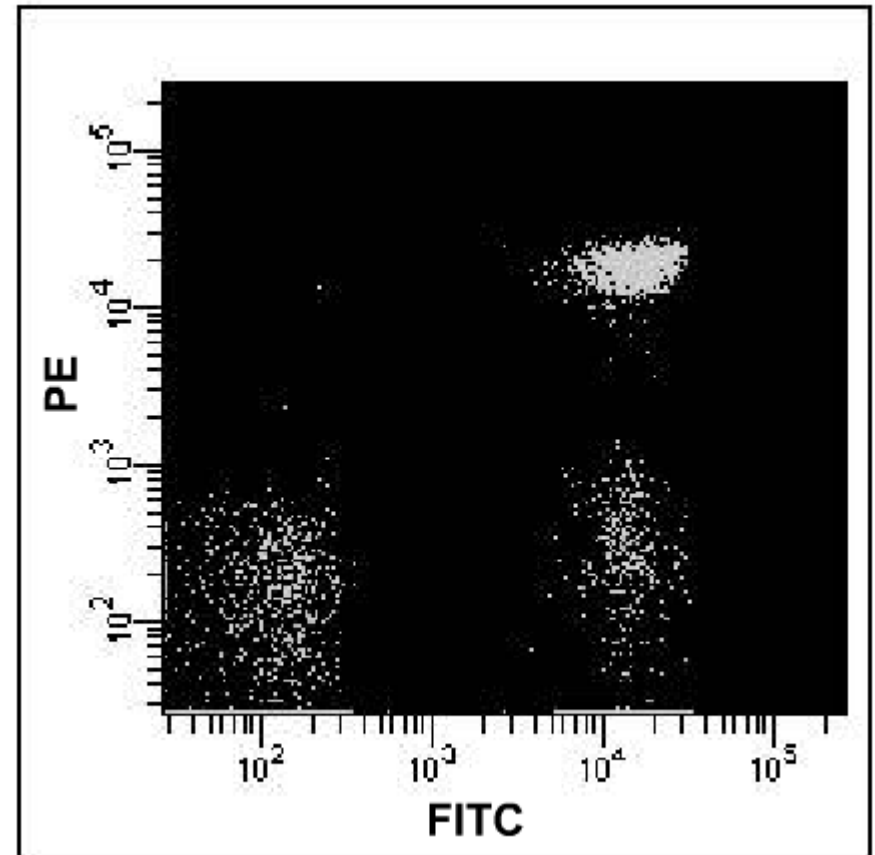
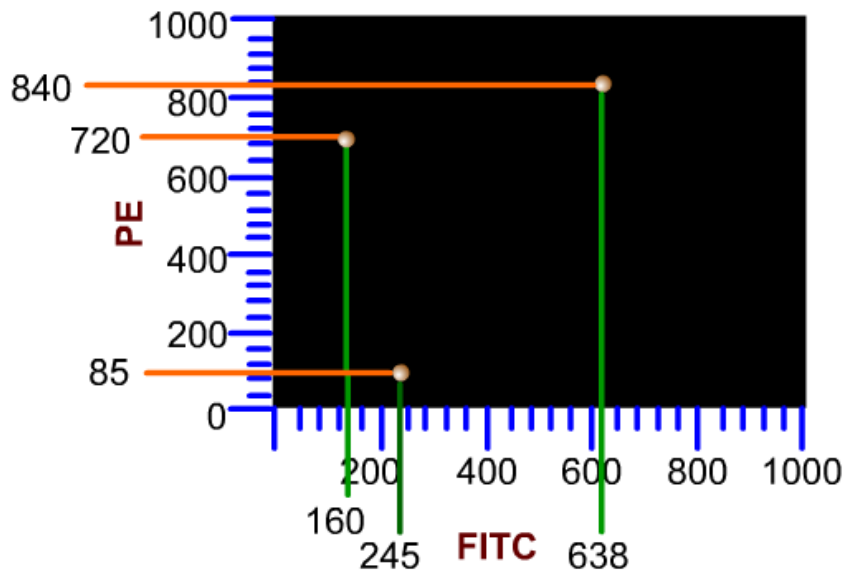
FITC/PE双
染样本

数据显示

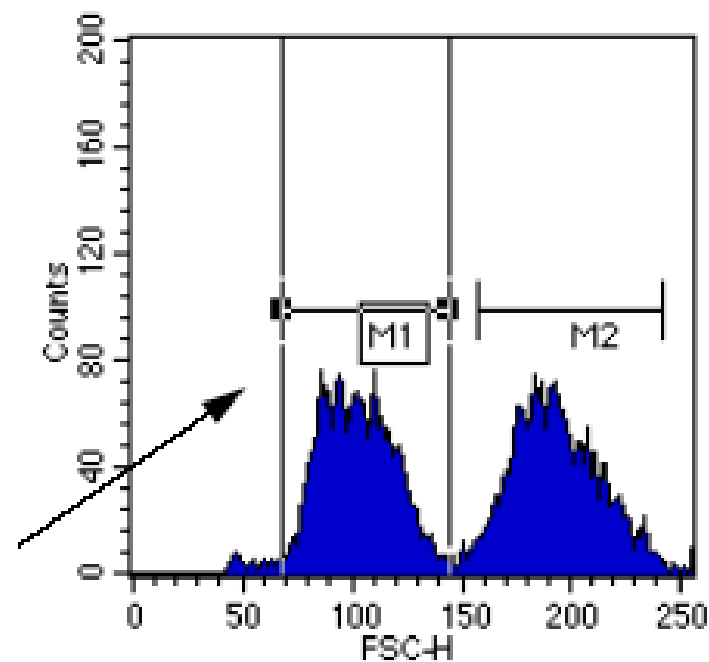
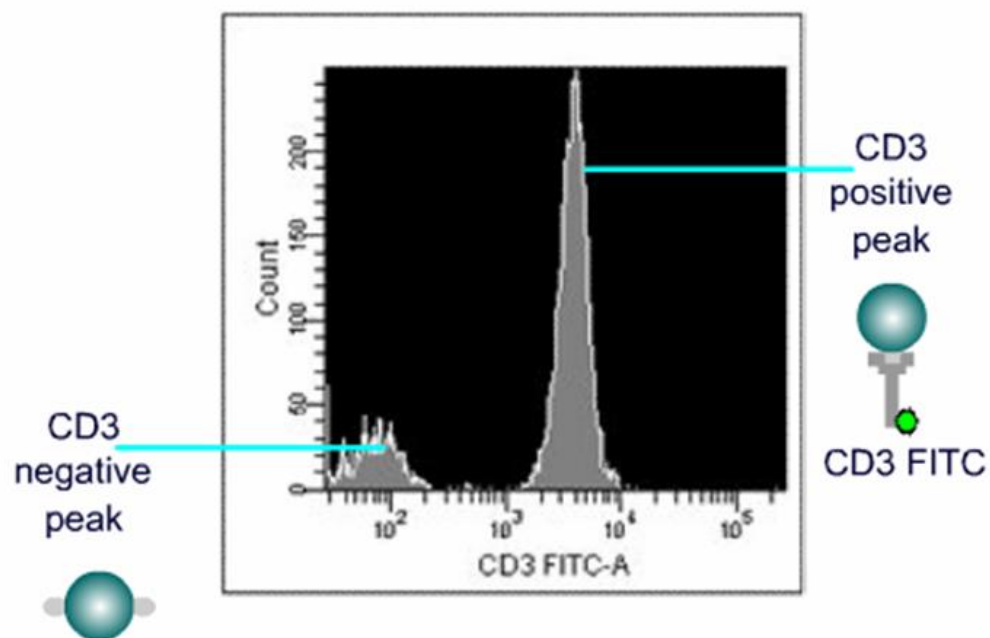
- 直方图 (Histogram)
- 二维点图 (Dot Plot)
- 等高线图 (Contour Plot)

数据分析

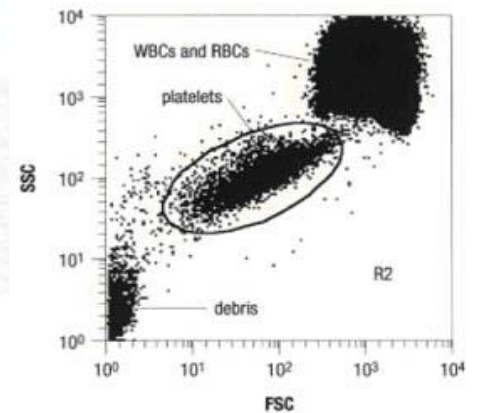
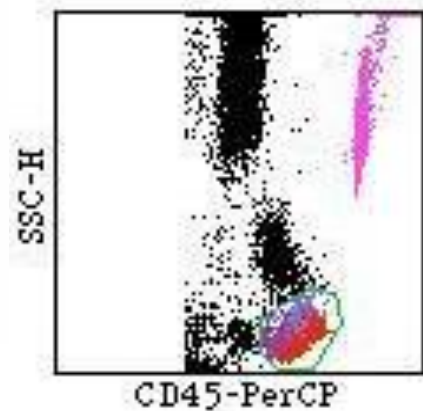
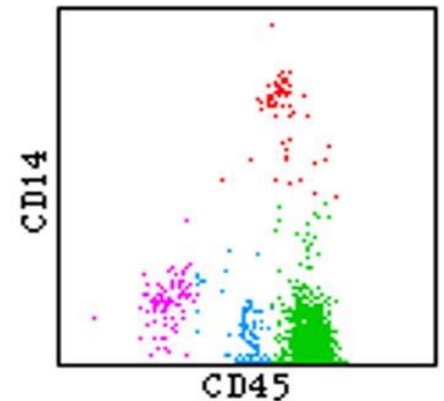
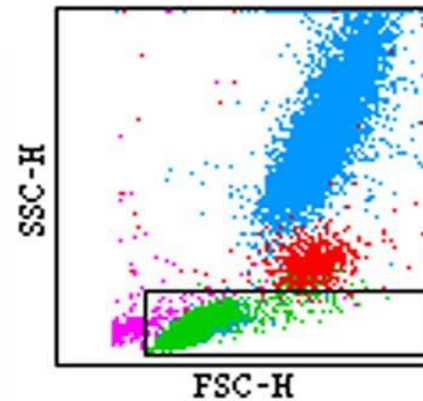
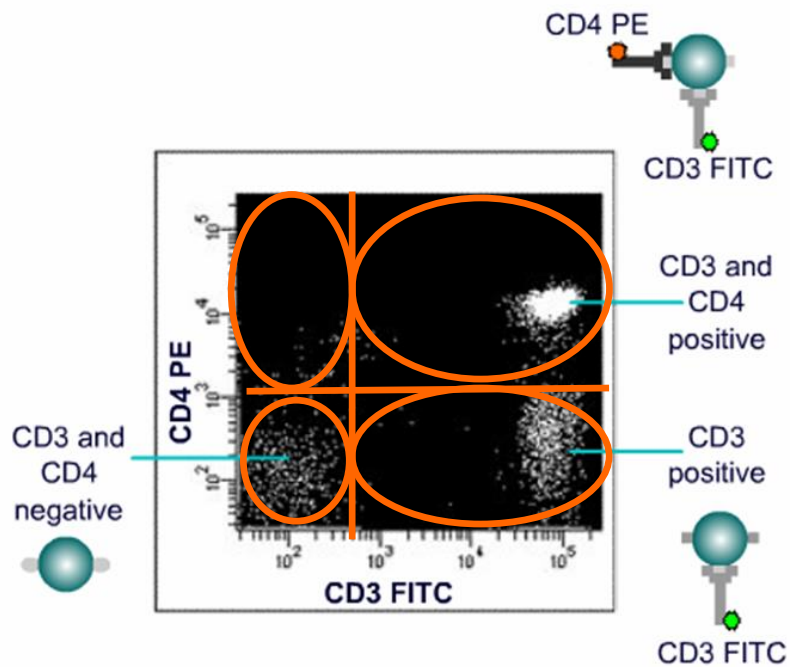
	FSC	SSC	FITC	PE
event 1	30	60	638	840
event 2	100	160	245	85
event 3	300	650	160	720



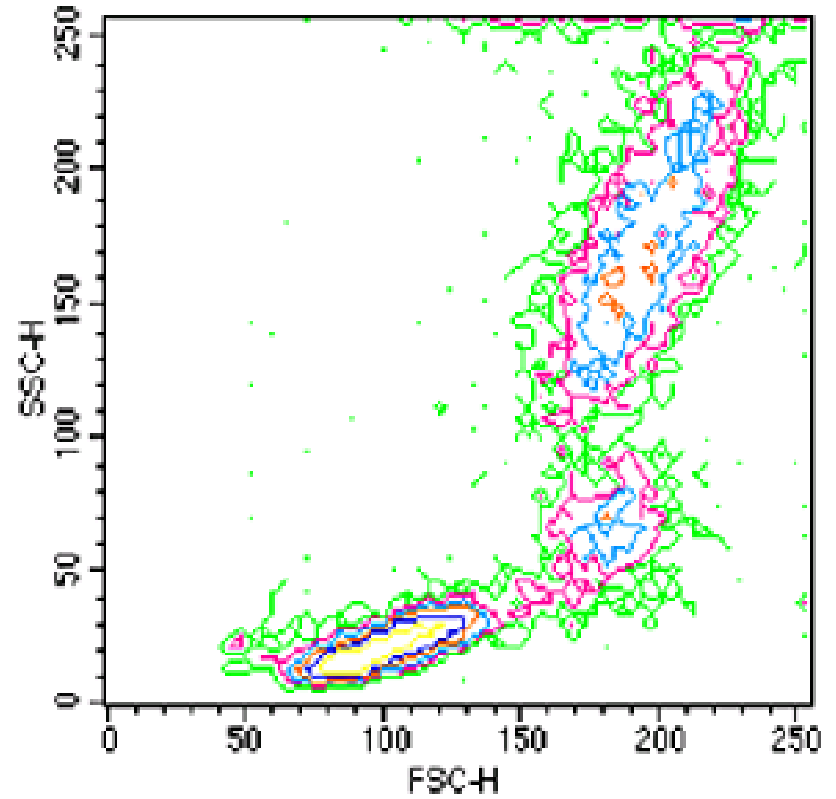
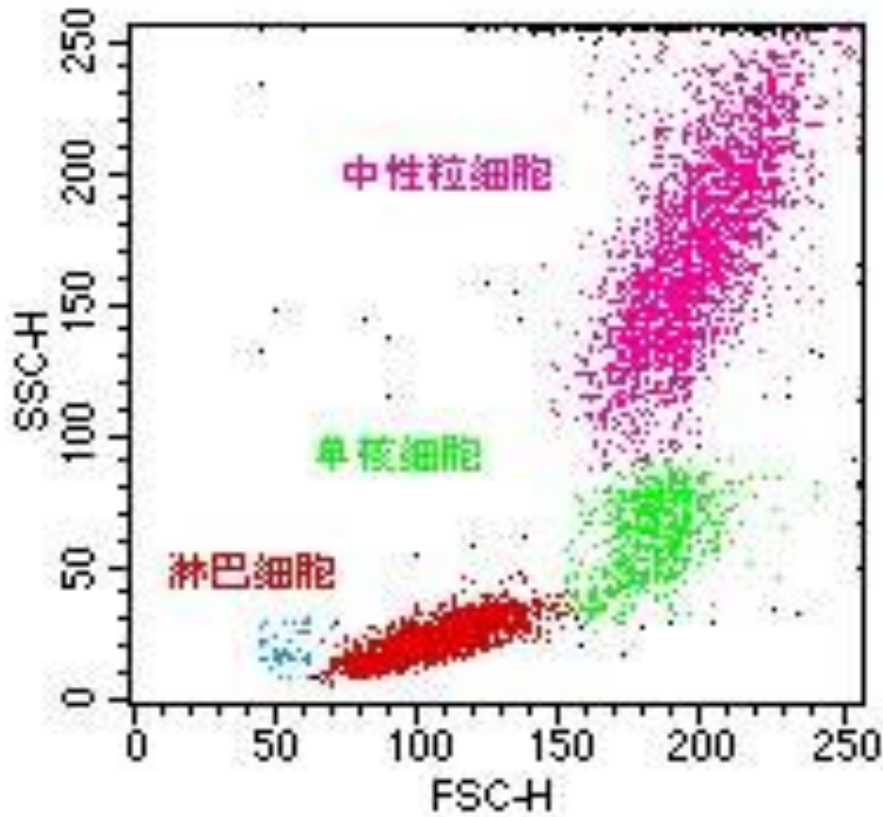
双参数散点图分析



单参数直方图分析



等高线图





流式对照的设置

荧光染色对照的设置

- 实验样本

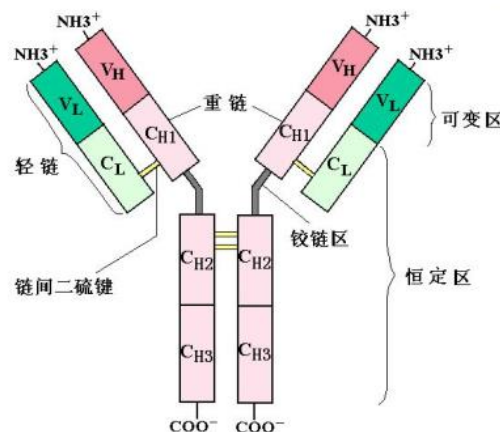
- ✓ 自发荧光，即不经荧光染色细胞内部荧光分子经光照发出的荧光。自发荧光信号为噪声信号。
- ✓ 特异荧光，即抗体F(ab')₂段与细胞抗原特异结合上的荧光染料受光照发出的荧光
- ✓ 非特异荧光，即抗体Fc段与细胞表面的Fc受体非特异结合上的荧光染料受光照发出的荧光

(自发荧光 + 特异荧光 + 非特异荧光)

- 阴性对照

- 空白对照 (自发荧光)

- 同型对照 (自发荧光 + 非特异荧光)



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 (即Fc段相同 , F(ab')₂段不同)

- 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

No.	Antibody	Isotype
	Mouse anti-human	未免疫Mouse血清纯化而来
1	A-FITC (γ1)	γ1-FITC
2	B-PE (γ2a)	γ2a'-PE

- 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

传统商业化荧光素的发射光谱

Display Options

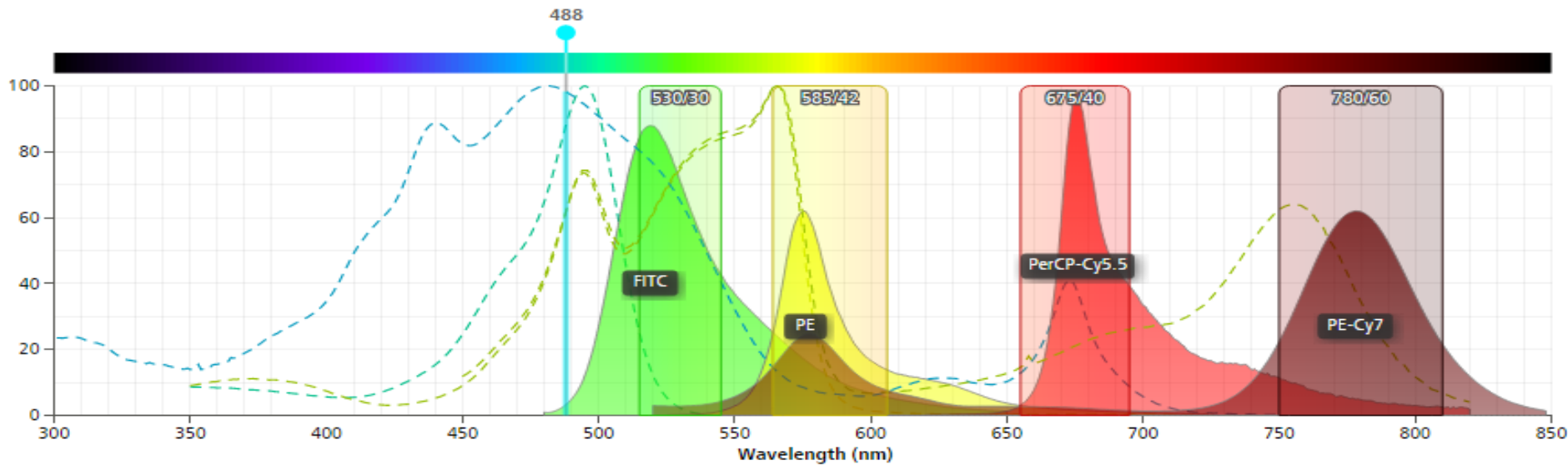
Curves: 4

Cytometer: BD FACSAria™ II

Excitation (nm): 488

☒ Show Em when Ex % > 5

RESET

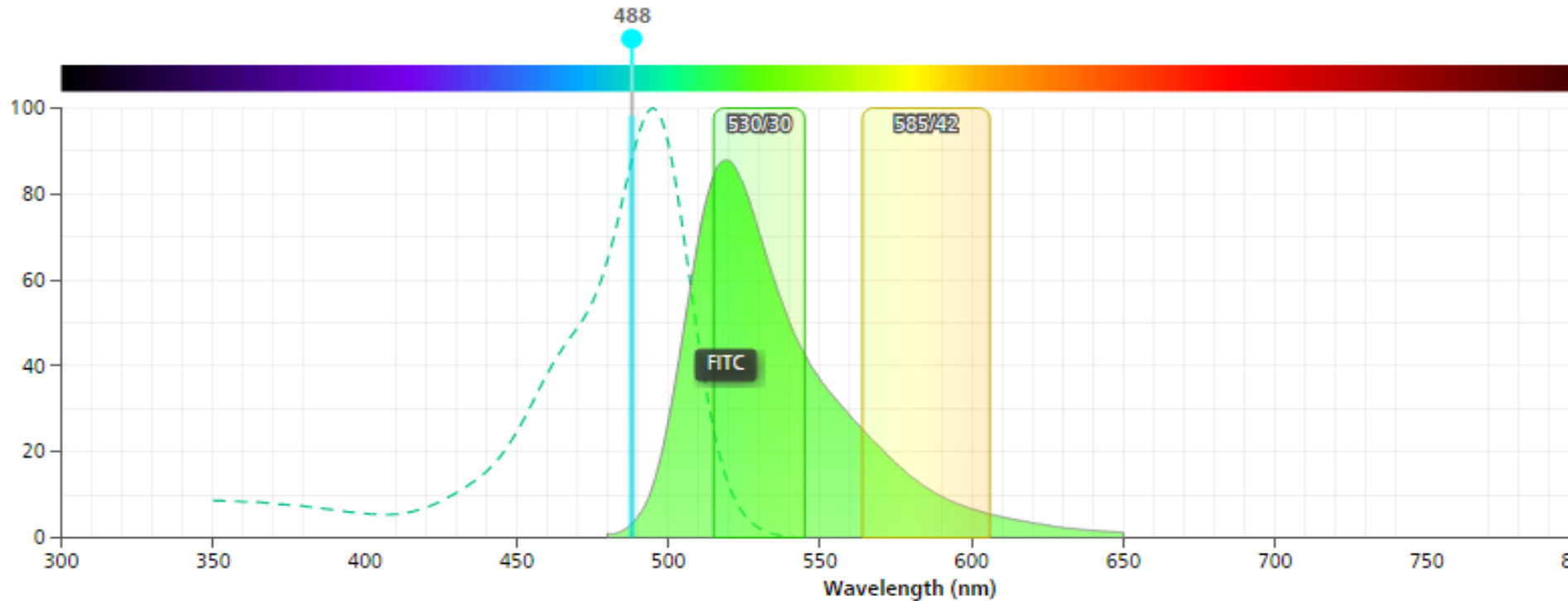


Fluorochrome	%Max	☒ Ex	☒ Em	Filters	☒	FITC	PE	PerCP...	PE-Cy7
1 FITC	88.0	☒	☒	530/30	☒	47.4%	0.4%	x	1.8%
2 PE	61.6	☒	☒	585/42	☒	12.5%	70.4%	x	16.4%
3 PerCP-Cy5.5	98.2	☒	☒	675/40	☒	x	3.3%	57.1%	1.9%
4 PE-Cy7	61.8	☒	☒	780/60	☒	x	x	9.6%	60.5%

Add Filter: ADD

Spectral overlap

Fluorescent Spill Out如何解决？

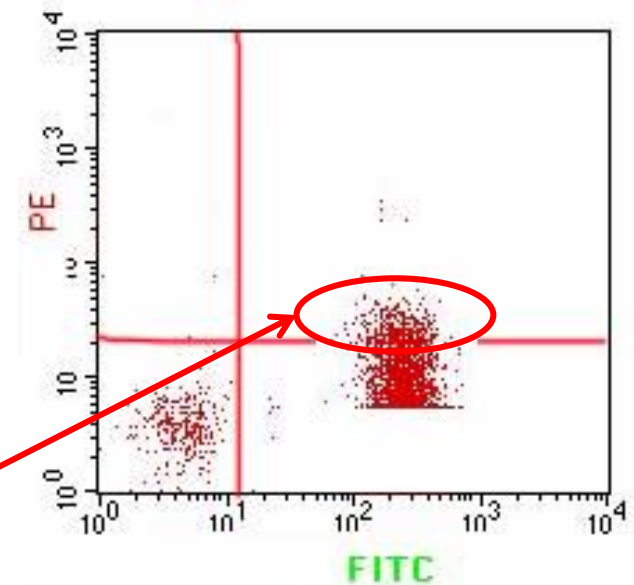
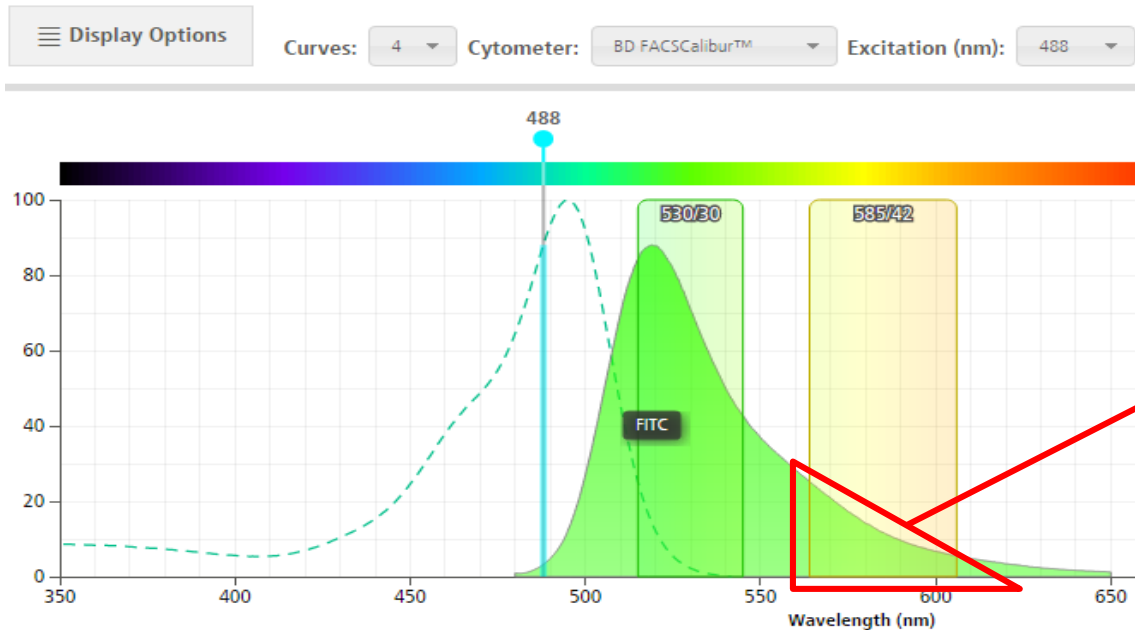


Fluorochrome	%Max	☐ Ex	☐ Em	Filters	☐	FITC	PE	PerCP...	PE-Cy7
1 FITC	88.0	☒	☒	530/30	☒	47.4%	0.4%	x	1.8%
2 PE	61.6	☐	☐	585/42	☒	12.5%	70.4%	x	16.4%

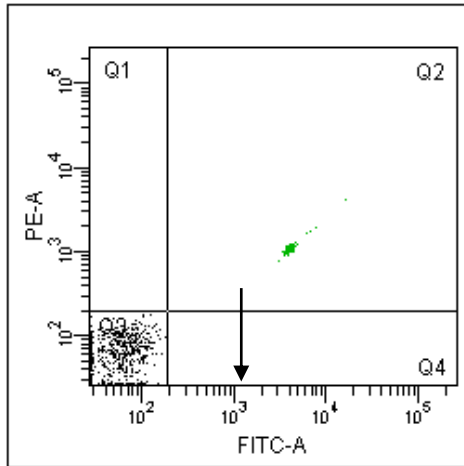
荧光染色对照的设置

荧光补偿 (compensation)

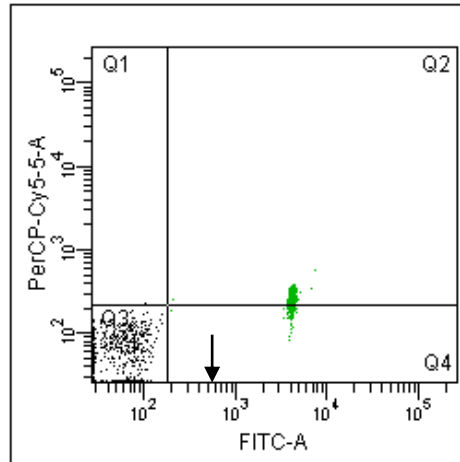
是指在流式细胞多色分析中，纠正 荧光素发射光谱重 (spectral overlap) 的过程，即从一个被检测的荧光信号中去除任 何其他的干扰荧光信号。



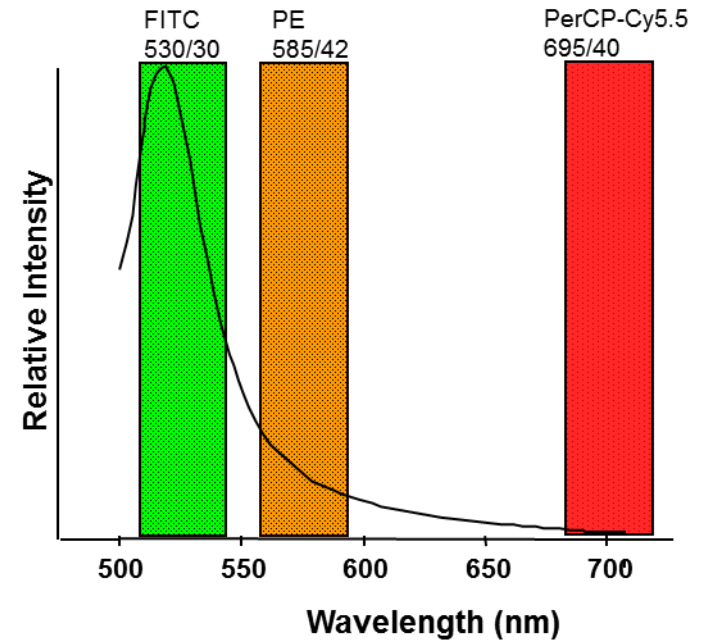
FITC 补偿



Population	PE-A Mean
■ Q3	64
■ Q4	####



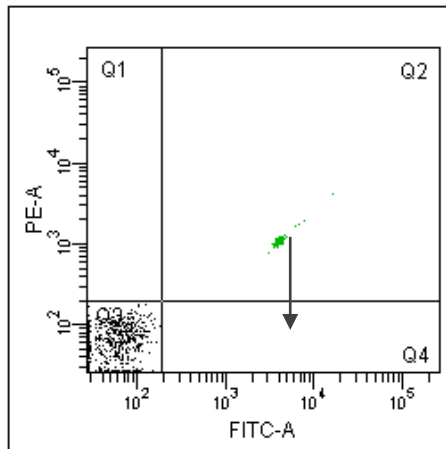
Population	PerCP-Cy5-5-A Mean
■ Q3	68
■ Q4	179



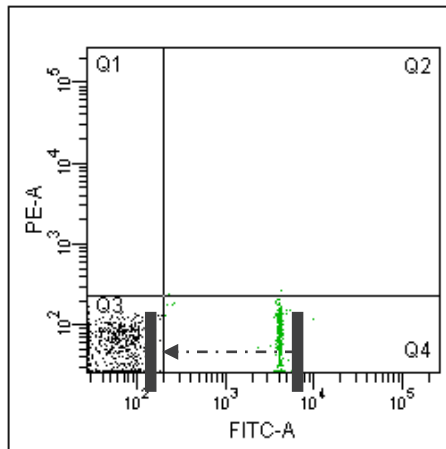
	Fluorochrome	- % Fluorochrome	Spectral Overlap
•	PE	FITC	0.00
•	PerCP-Cy5-5	FITC	0.00

→ **Increase values**

FITC 与 PE 的补偿

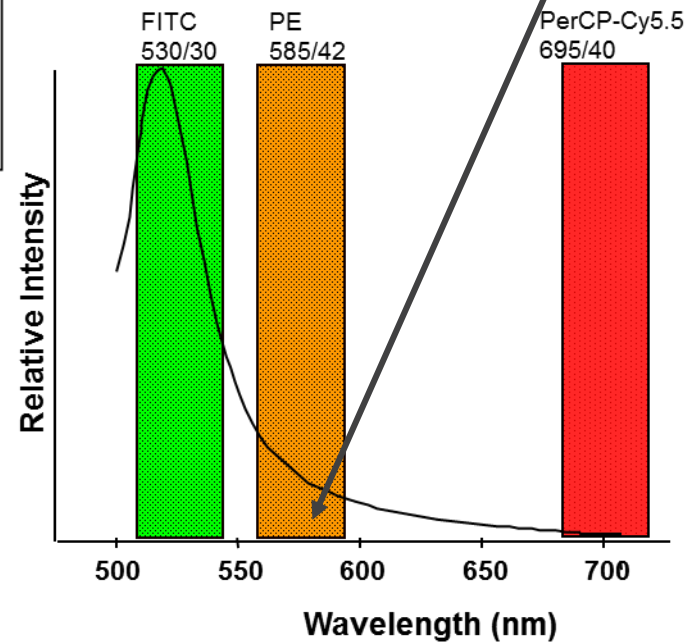


Population	PE-A Mean
Q3	64
Q4	####



Population	PE-A Mean
Q3	61
Q4	60

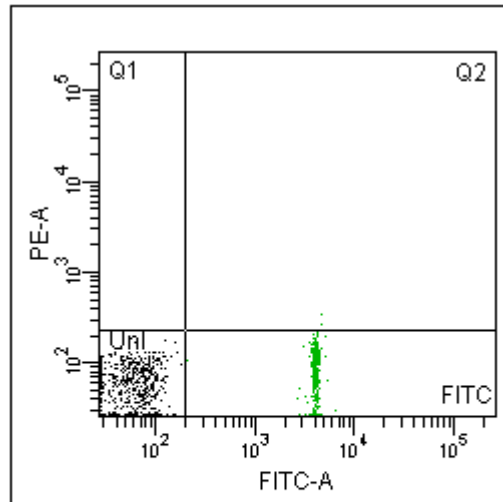
Fluorochrome	- % Fluorochrome	Spectral Overlap
PE	FITC	20.10
PerCP-Cy5-5	FITC	0.00



FITC 与PE的补偿

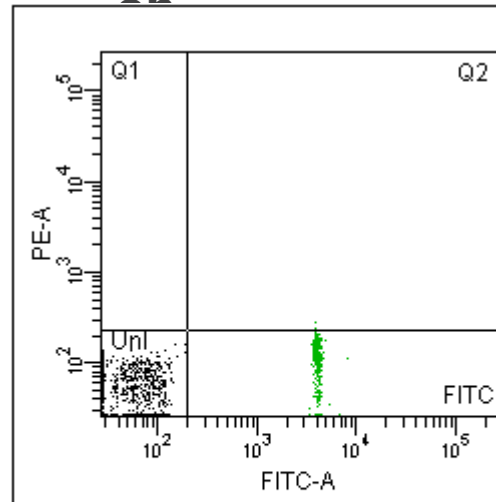
Incorrect Compensation

Correct Compensation



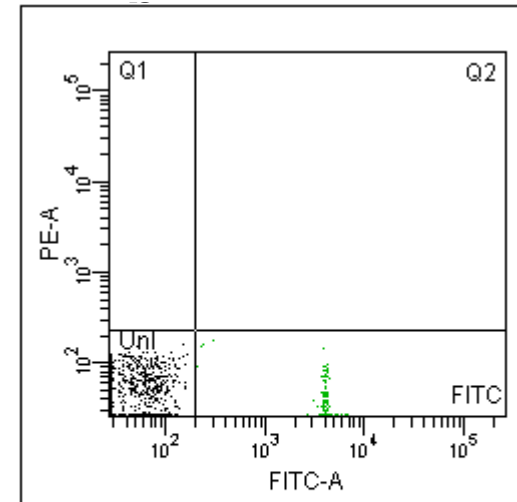
Population	PE-A Mean
Unl	64
FITC	69

Undercompensati



Population	PE-A Mean
Unl	61
FITC	96

Overcompensatio



Population	PE-A Mean
Unl	62
FITC	-1

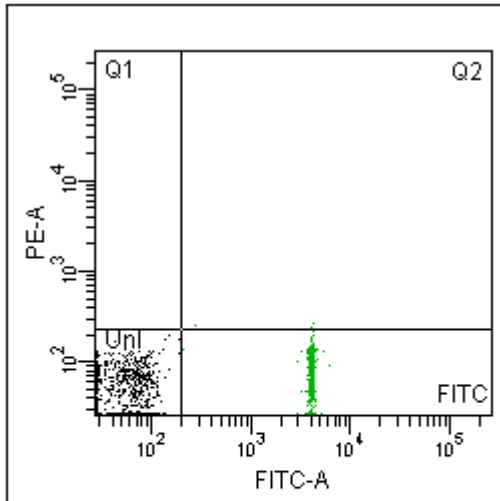
荧光染色对照的设置

- 补偿对照（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补偿对照管

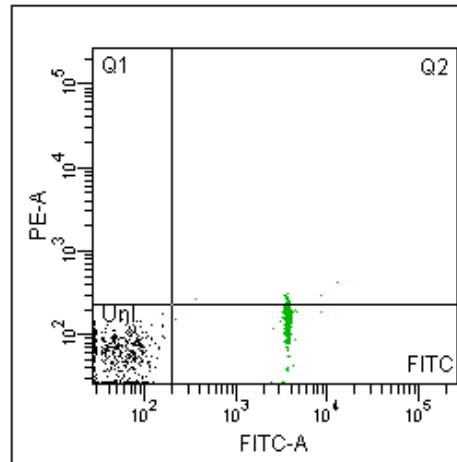
分析类型	管	功能	加入的抗体	
双色分析	1	Isotype	γ1-FITC	γ2a-PE
	2	Compensation1	A-FITC	γ2a-PE
	3	Compensation2	γ1-FITC	B-PE
	4	Sample1,2.....	A-FITC	B-PE

电压改变后，补偿需要重新调整

Correct Compensation

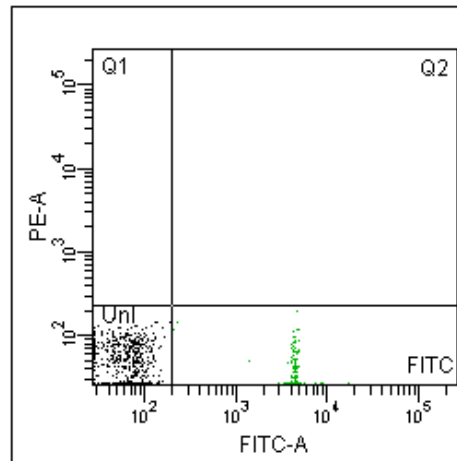


Population	PE-A Mean
Unl	69
FITC	64



FITC Voltage Decreased by 5 V

Population	PE-A Mean
Unl	68
FITC	132



FITC Voltage Increased by 5 V

Population	PE-A Mean
Unl	67
FITC	49

BD生物科学——流式整体方案提供者

BD生物科学客服电话：400-819-9900

---为您提供：

- 产品咨询
- 技术解答
- 仪器维修
- 意见反馈

卓越中心 Center of Excellence (COE)

---前所未有的流式4S体验

- Showcase 产品展示
- Support 技术支持
- Service 售后服务
- Survey 用户调查



Thank you!

