



陕西师范大学
SHAANXI NORMAL UNIVERSITY

研究生教育教学改革研究项目
(研究生优质课程项目)

生物实验室安全及大型仪器应用

流式细胞仪技术

主讲教师 丁小丽

生命科学学院实验教学中心



Contents

1

流式细胞术基础原理

2

CytoFLEX流式细胞仪性能

3

软件简介

4

流式在生命科学领域的应用

❖ 流式细胞术（**Flow Cytometry**）

流式细胞术：是一种可以快速、准确、客观，并且能够同时检测快速直线流动状态中的单个颗粒（通常是细胞）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。

❖ 如何实现流式细胞术检测？

❖ 流式细胞仪

❖ 分析型：只能分析不能分选

❖ 分选型：既能分析又能分选

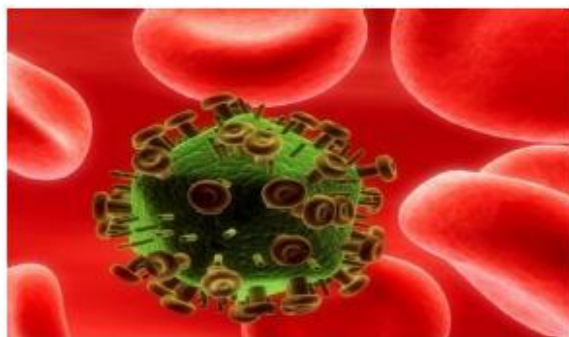
❖ 流式细胞术的特点

- □ 单个细胞分析
- □ 同时多参数分析
- □ 高速，最高达上万个细胞/秒
- □ 精度高、准确性好
- □ 定性或定量分析
- □ 可对目标细胞进行分选

Diagram

流式细胞术能研究什么

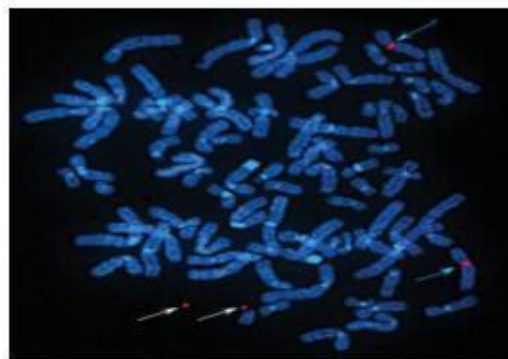
各种
细胞



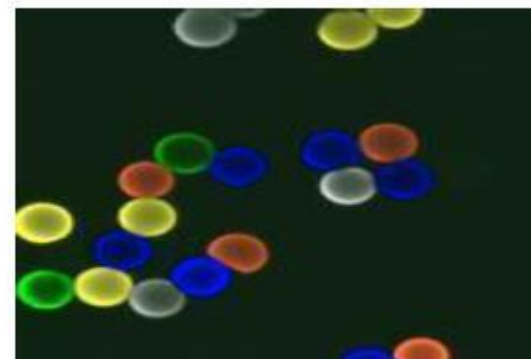
微生物



病毒颗粒



染色体



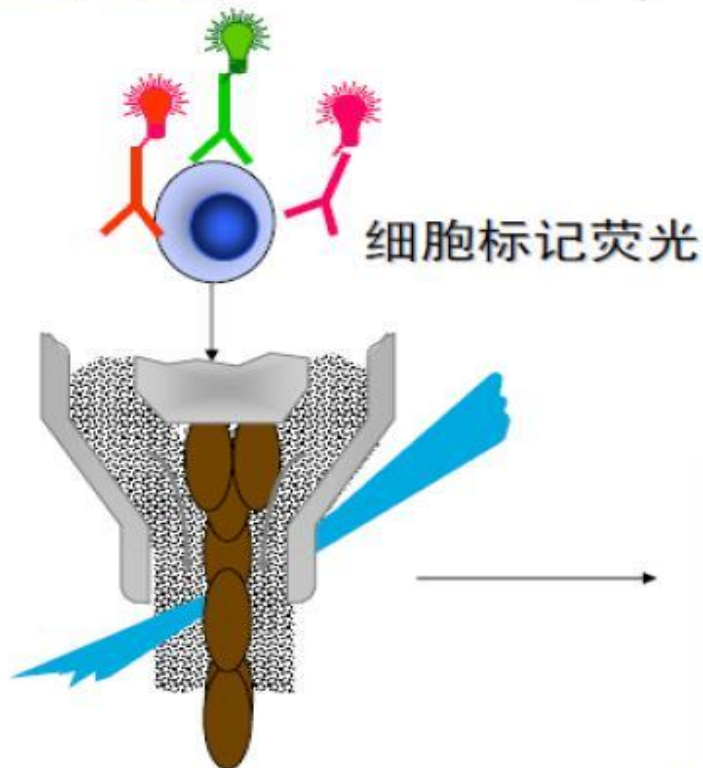
人工合成的微球

或者其他单个的生物颗粒、可溶性细胞因子等

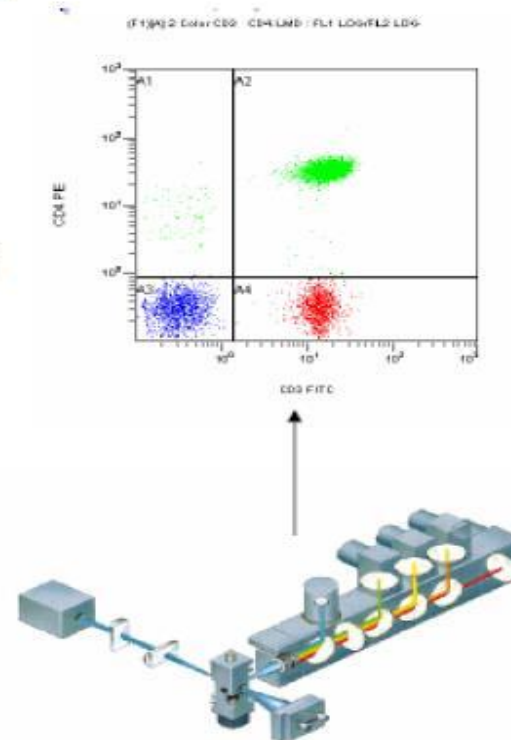
Diagram

流式细胞仪检测过程

PowerPointFlow_IntStd_025.jpg



激光照射到单个细胞上，产生光学信号。



通过信号处理系统转换为数字信号。得到直方图，散点图等图形。

Diagram

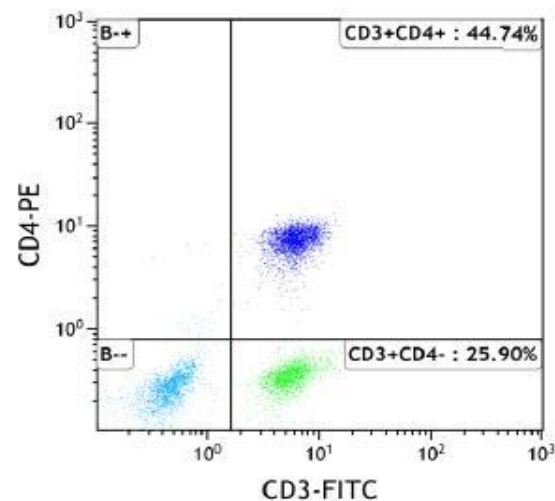
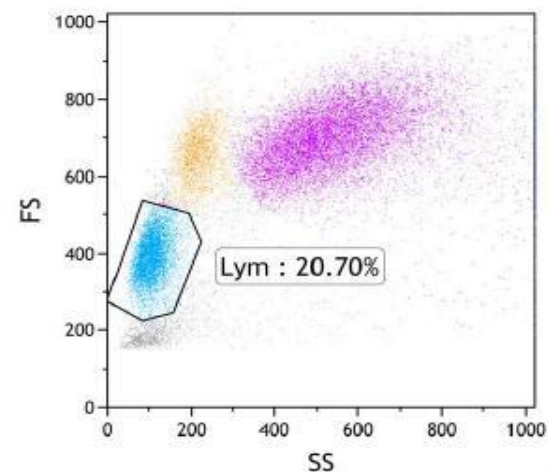
流式数据的产生

光的产生

光的传递

光电转换

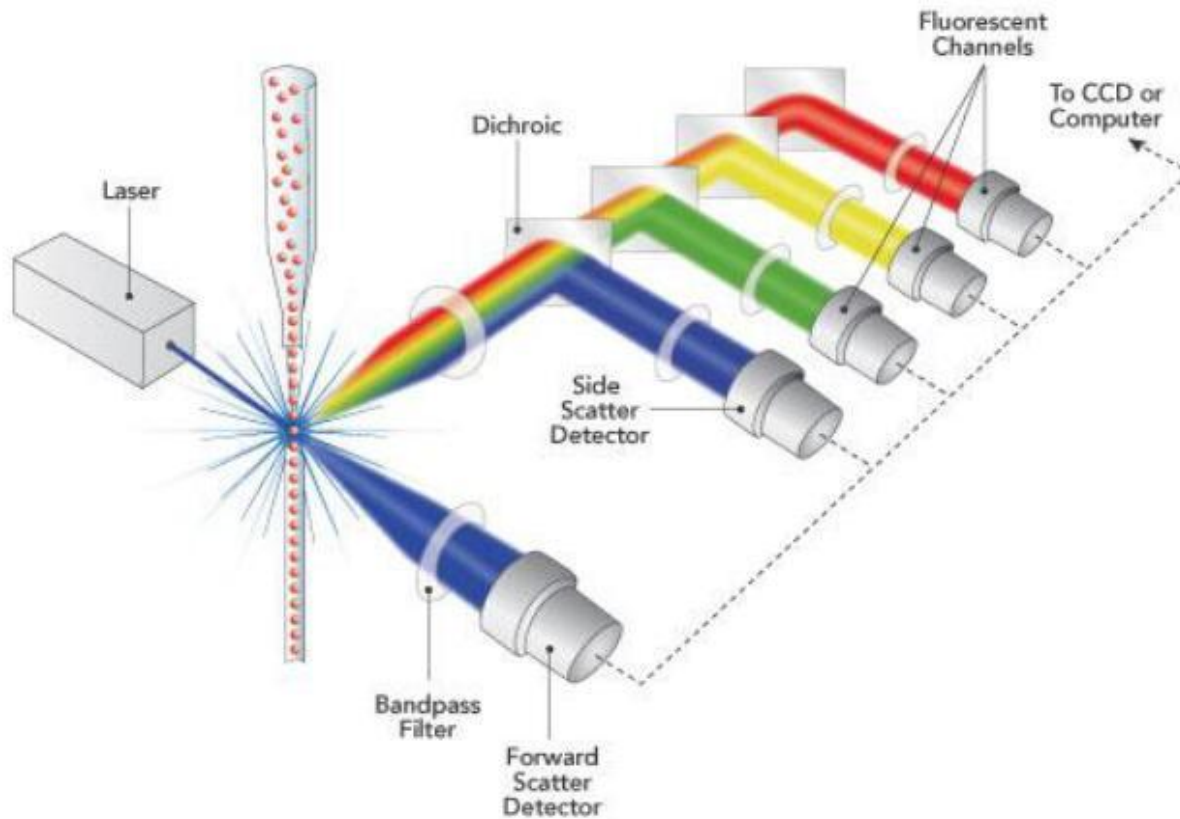
数据处理



Diagram

光的产生

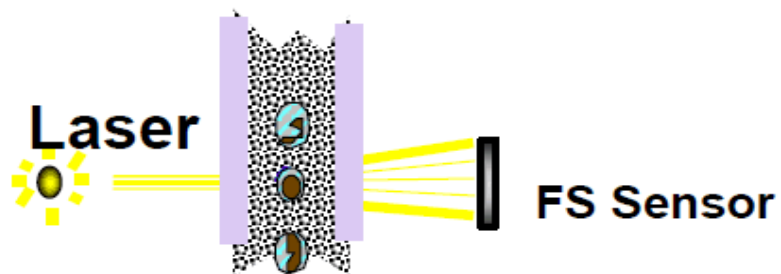
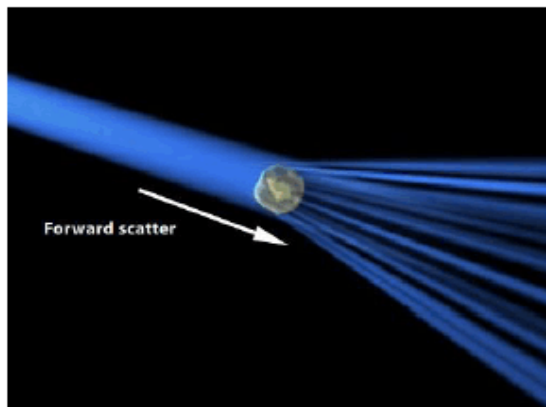
- 激光照射液流内单细胞（颗粒），细胞会折射激光形成**散射光**；或者激光激发细胞的荧光基团发射**荧光**。



Diagram

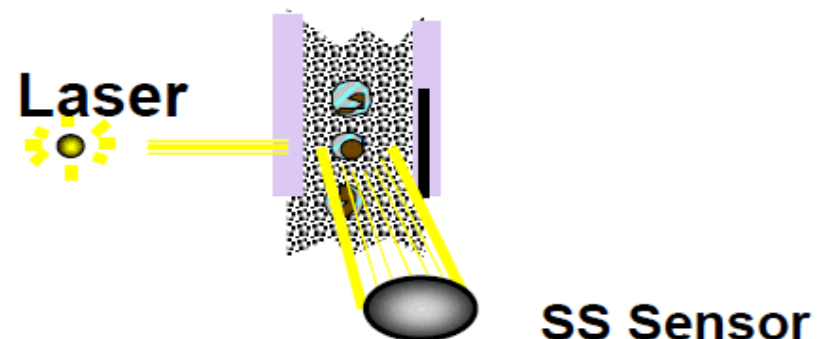
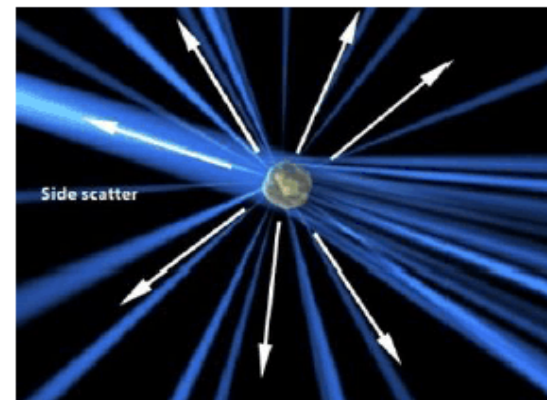
散射光

前向散射光(FS)



反映细胞大小

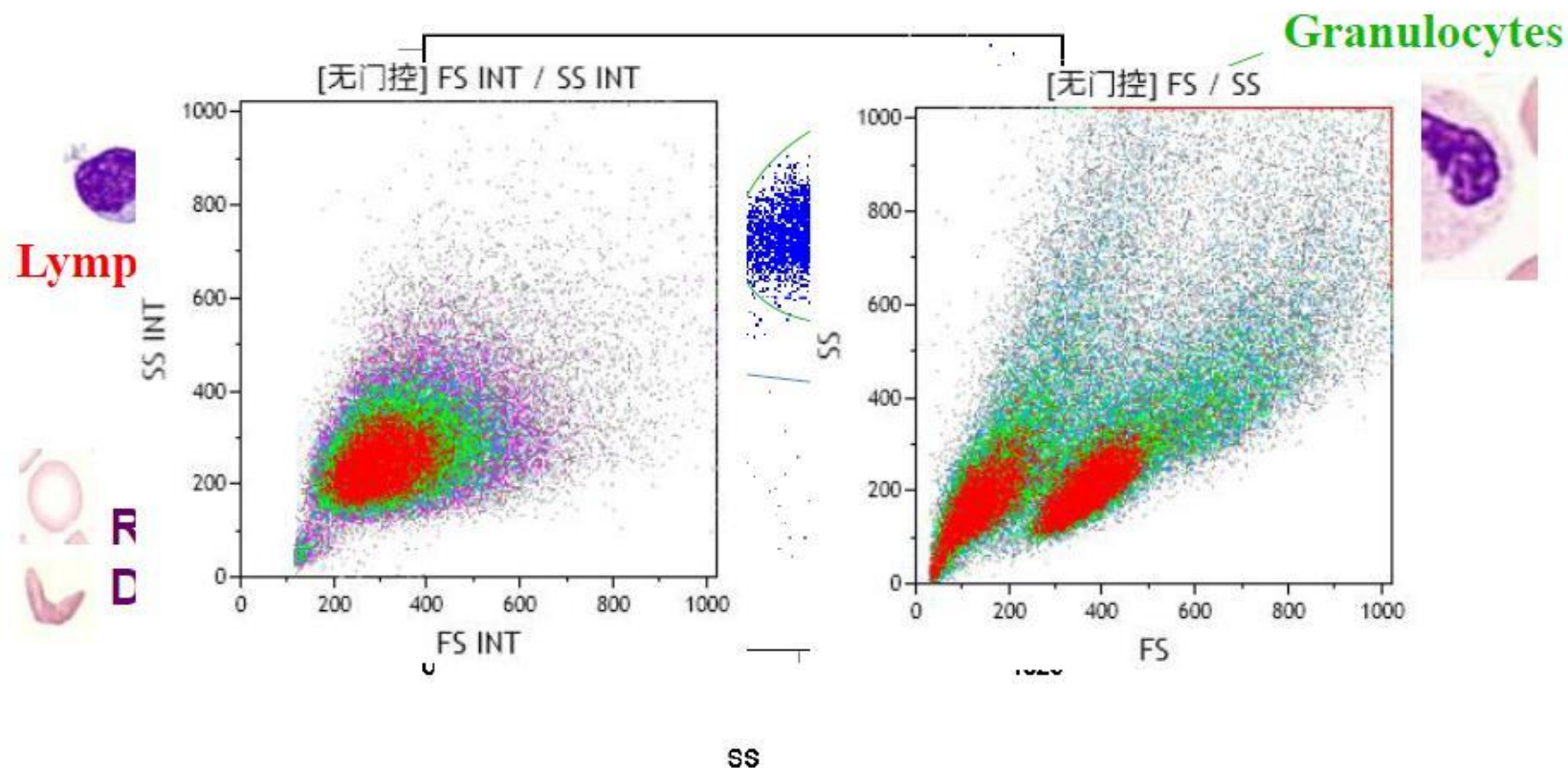
侧向散射光(SS)



反映细胞复杂程度

Diagram

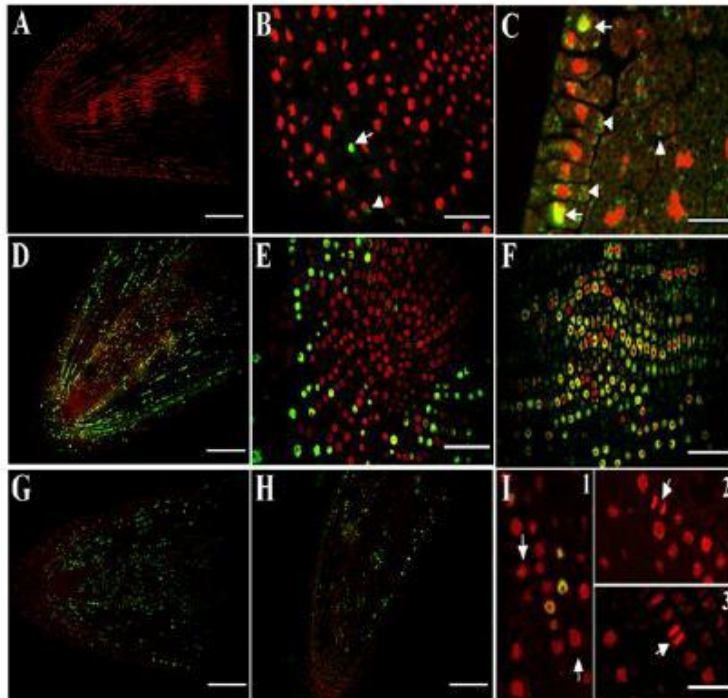
散射光散点图



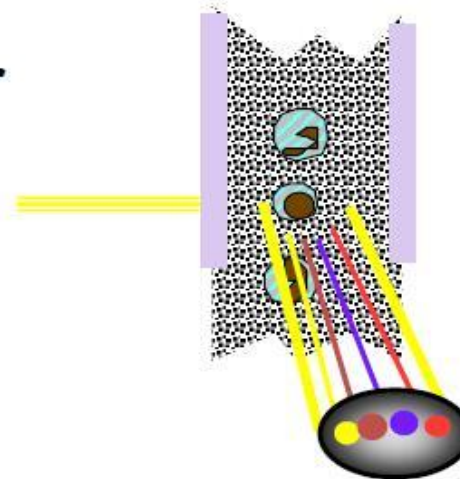
可以根据细胞的大小和颗粒度这两个基本特征，对细胞进行初步的分群或分类。

Diagram

荧光



Laser



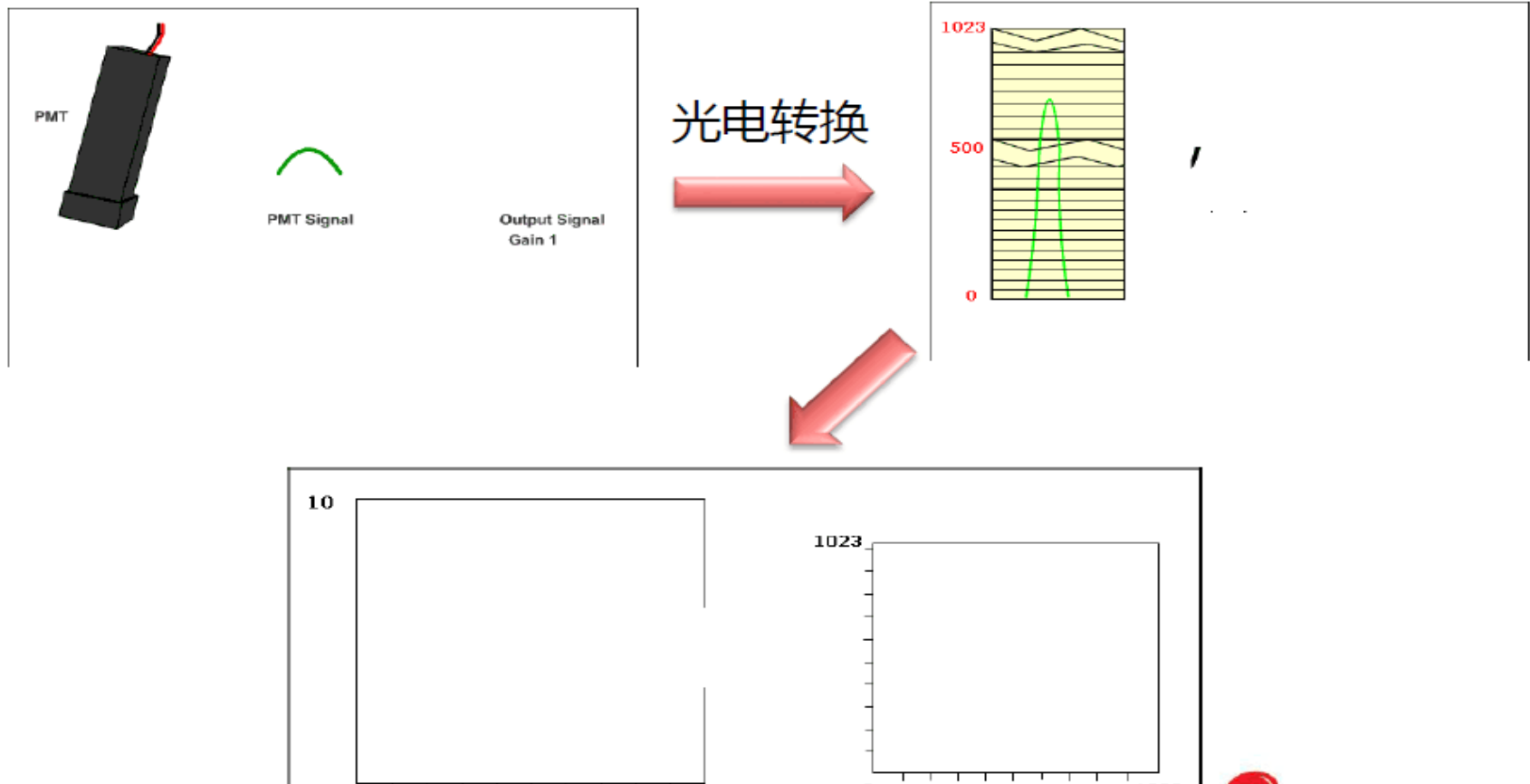
Fluorescence detector
(FL1,FL2,FL3,FL4,FL5.....)

细胞自身荧光或使用特异性荧光染料、抗体标记细胞，对细胞的生物/化学指标进行检测。

Diagram

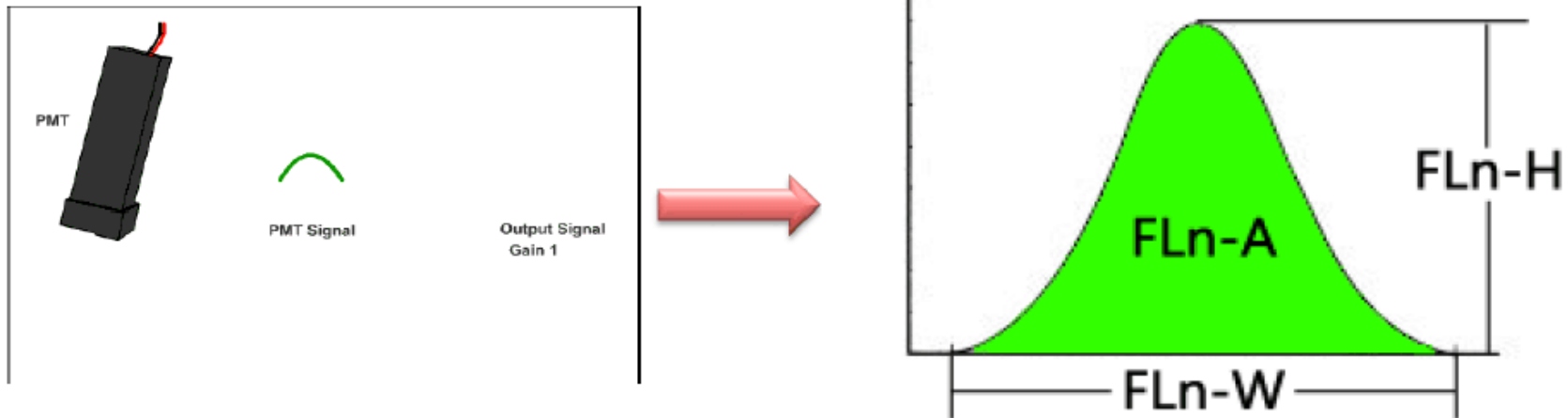
光电转换

- 光通过光电转换器（PMT或者APD），转为电信号，通过放大，形成数字信号。



Diagram

数据处理



FCS、LMD 流式文件

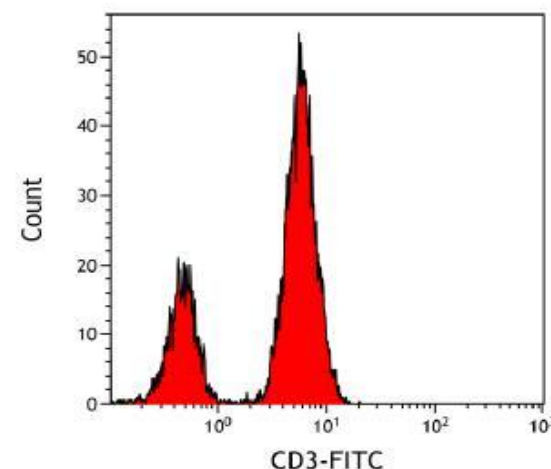
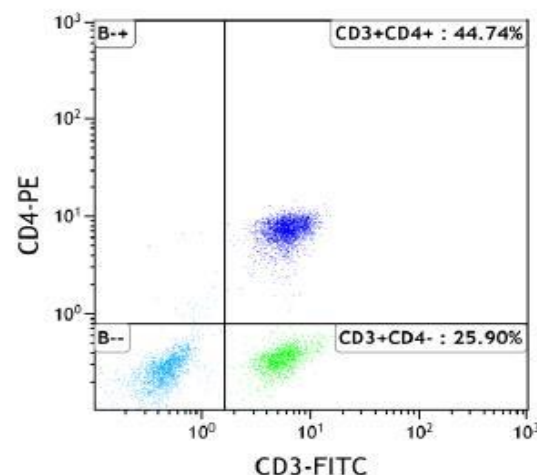
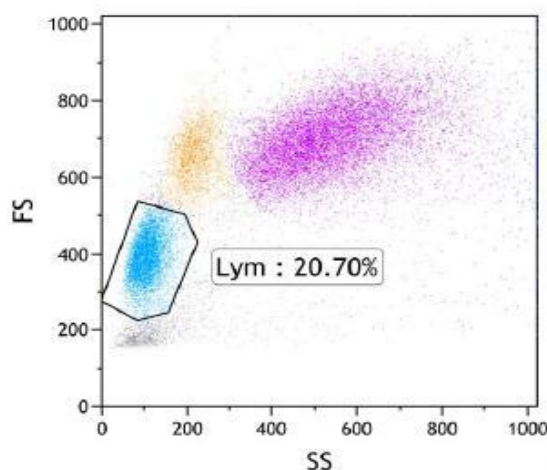
Log (对数)

Lin (线性)

{	A rea	面积
	H igh	峰高
	W idth	峰宽

Diagram

流式数据的解读



- 相对的细胞大小和内部复杂度
- 细胞群比例：用于比较细胞数的变化
- 相对荧光强度：用于比较蛋白表达情况的变化
- 细胞浓度

Diagram

流式细胞仪CytoFLEX系列



Contents

1 CytoFLEX系列特性

2 各种波长激光的用途

3 流式检测的一般步骤

Contents

CytoFLEX平台特点

1

性能强大

2

操作简便

3

配置灵活

4

应用广泛

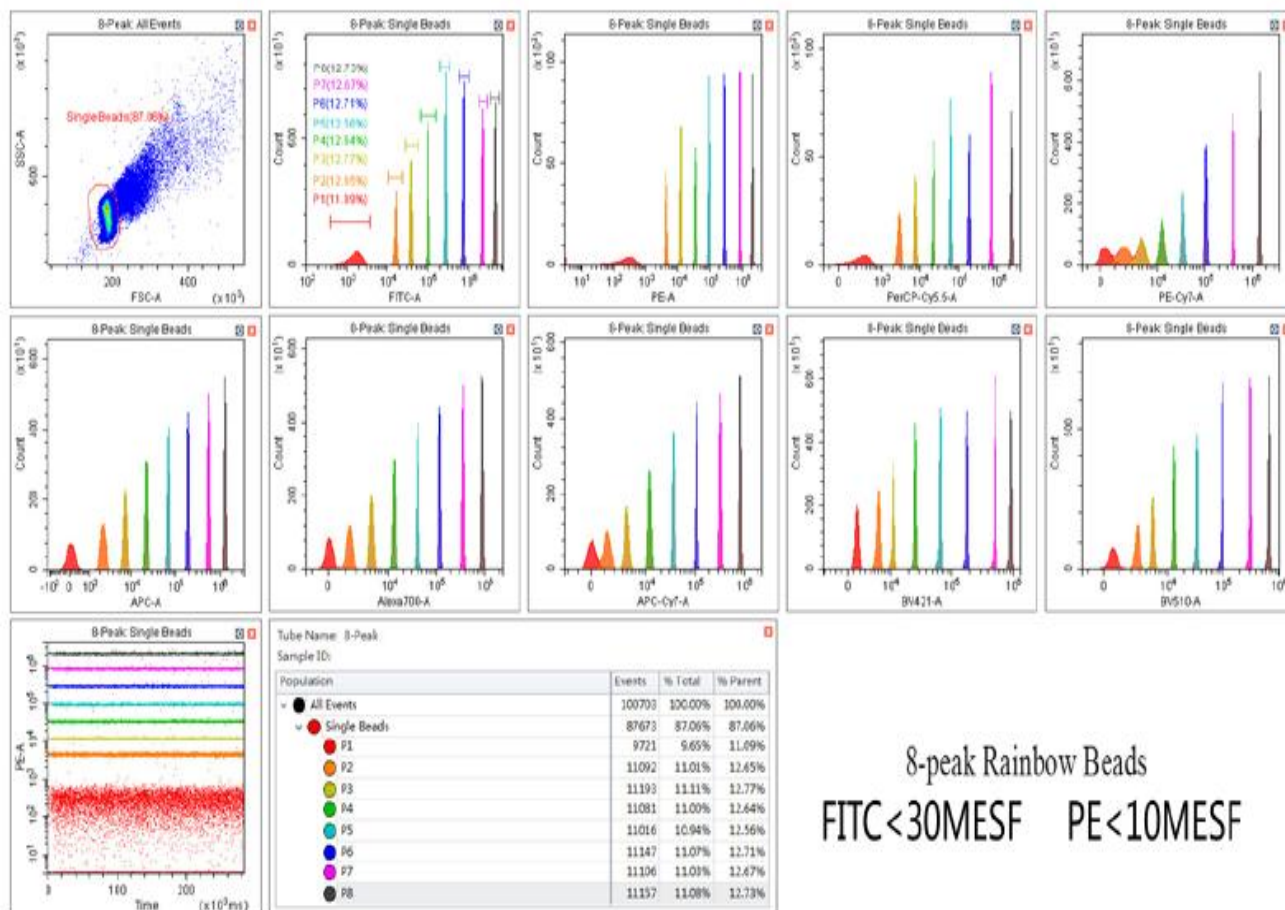


Diagram

➤ □ 高灵敏度

➤ □ VSSC小颗粒检测

➤ □ 免微球绝对计数



灵敏度越高（值越小），越容易检测弱荧光/低表达的细胞

Diagram

➤ □ 高灵敏度

➤ □ **VSSC小颗粒检测**

➤ □ 免微球绝对计数

	外泌体	微囊泡	凋亡小体
大小形状	30-100nm, 规则	100-1000nm, 不规则	50-5000nm, 不规则
标志物	LAMP-1, tetraspanins, Alix, MHC-I/II, HSP70, TSG100	Selectins, integrins, tissues factor and cell- specific markers	组蛋白、细胞器
来源	胞内体 胞吐	细胞膜表面 出泡	凋亡细胞 出泡或胞吐

Diagram

➤ □ 高灵敏度

➤ □ VSSC小颗粒检测

➤ □ 免微球绝对计数

Count Method	FC			VM		
Lyse Method	IP	VL	% difference	IP	VL	% difference
Mean(CD4, 8002)	513	608	18.5%	559	591	5.8%
Mean(CD4, 8004)	629	606	-3.6%	600	585	-2.5%
Mean(CD4, 8008)	635	672	5.9%	577	594	2.9%
Mean(CD4, A003)	639	673	5.4%	558	585	4.8%
Mean(CD4, A006)	643	575	-10.6%	574	600	4.6%
Mean(CD4, overall)	610	627	2.8%	574	591	3.0%

Count Method	FC			VM		
Lyse Method	IP	VL	% difference	IP	VL	% difference
Mean(CD8, 8002)	480	563	17.4%	523	547	4.7%
Mean(CD8, 8004)	585	591	1.0%	559	569	1.9%
Mean(CD8, 8008)	584	653	12.0%	530	578	8.9%
Mean(CD8, A003)	589	630	7.0%	514	547	6.5%
Mean(CD8, A006)	599	545	-9.1%	535	568	6.3%
Mean(CD8, overall)	566	596	5.5%	532	562	5.6%

Count Method	FC			VM		
Lyse Method	IP	VL	% difference	IP	VL	% difference
Mean(CD3, 8002)	1072	1273	18.7%	1168	1237	5.9%
Mean(CD3, 8004)	1283	1273	-0.8%	1224	1227	0.3%
Mean(CD3, 8008)	1316	1413	7.4%	1195	1249	4.5%
Mean(CD3, A003)	1321	1400	6.0%	1154	1216	5.4%
Mean(CD3, A006)	1323	1194	-9.8%	1182	1247	5.5%
Mean(CD3, overall)	1260	1311	4.0%	1185	1235	4.3%

Contents

软件（CytExpert）

1 中英文双语言支持

2 向导式流程

3 全自动仪器调节及QC

4 图形化工具

5 拖拽式操作

6 智能化补偿

7 功能强大

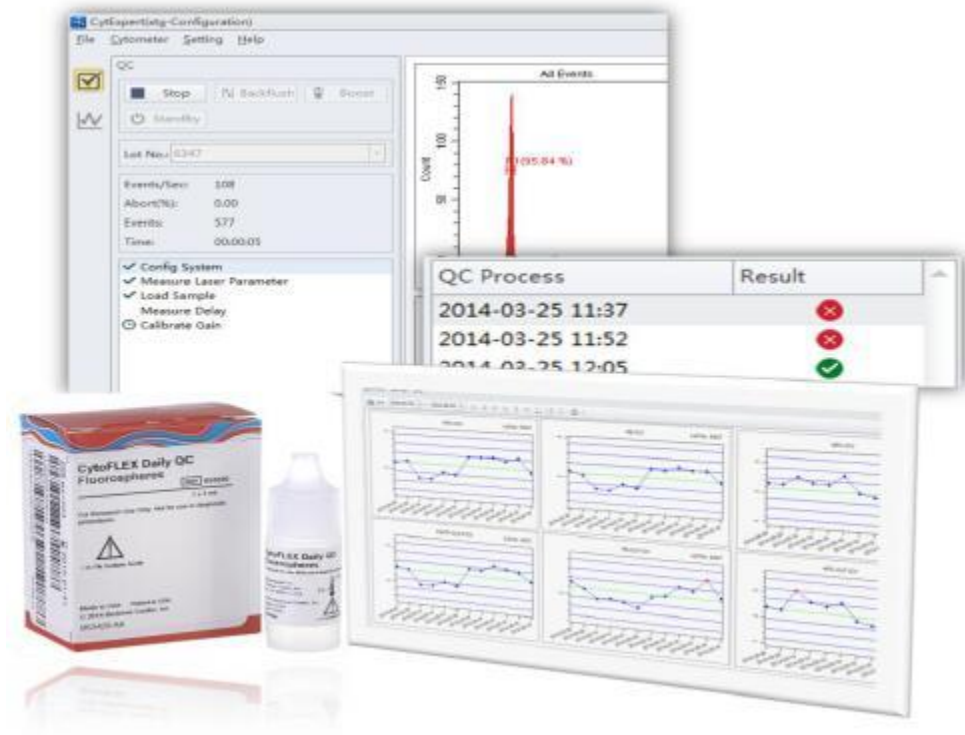
Diagram

➤ 向导式流程



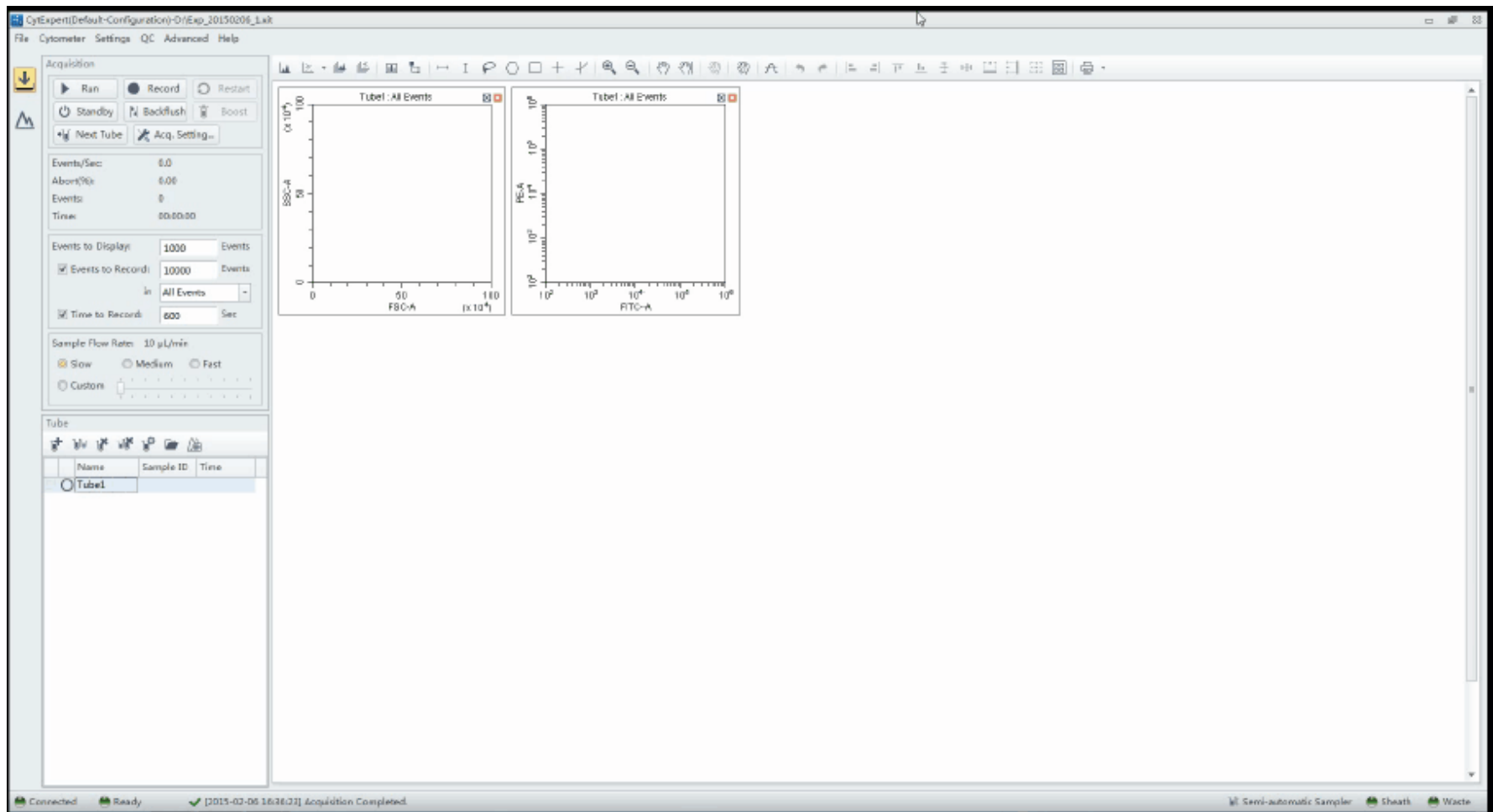
A banner image showing a hand writing on a notepad next to a computer keyboard. The background is a solid blue color with a white curved line at the bottom. The word "Diagram" is written in large white text on the right side. The URL "www.soppt.cn" is visible in the top right corner.

- ◆ □ 仪器配置检测
- ◆ □ 激光功率检测
- ◆ □ Laser Delay计算
- ◆ □ 基础电压调节
- ◆ □ CV检测



Diagram

➤ 拖拽式操作



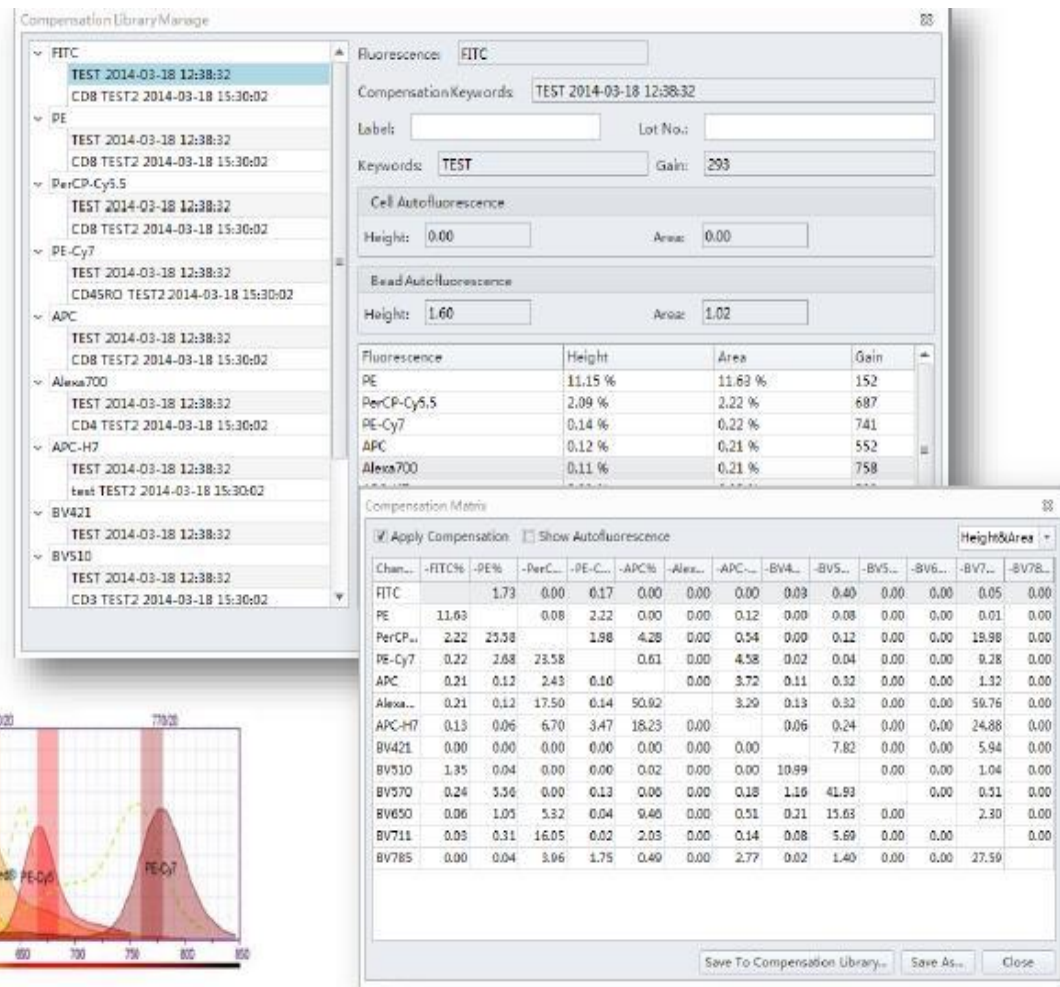
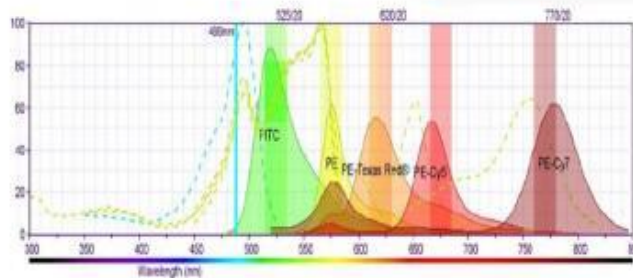
Diagram

智能化补偿

✓ 自动补偿和手动补偿均支持

✓ 独有“补偿库”

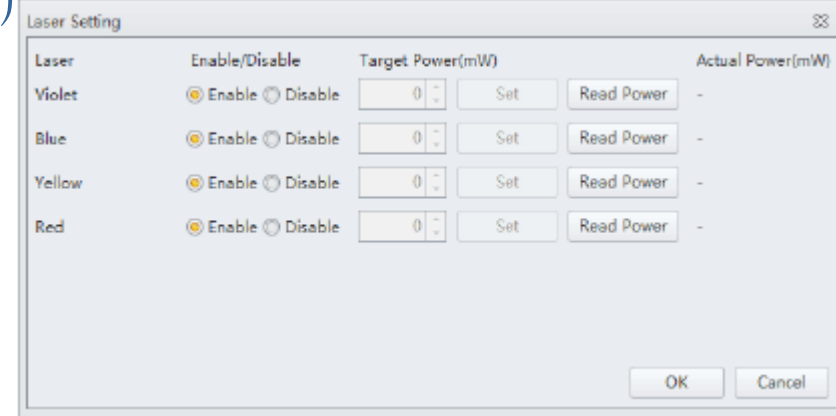
- 可以根据不同试剂组合新的补偿矩阵
- 补偿值可以随增益值自动调整



Diagram

➤ Laser control (激光控制)

- ✓ 用户可以开启及关闭激光（包括488）
- ✓ 减少不使用激光对通道、荧光素产生的影响
- ✓ 延长激光寿命
- ✓ CytoFLEX LX可以调整激光功率



Diagram



各种波长激光应用简介

Diagram

生科院流式细胞仪激光配置

激光器	检测通道	荧光染料（常用）
488nm	FITC-525/40	FITC,Alexa Fluo488,CFSE,Fluo-3, SYBR Green,GFP, DCF
	PE-585/42	PE,PI
	ECD-610/20	ECD,PE-Texas Red, PE-CF594,PI
	PC5.5-690/50	PC5,PC5.5,PerCP,PerCP-Cy5.5,PI,7AAD,叶绿素
	PC7-780/60	PC7
638nm	APC-660/20	APC, Alexa Fluo647, eFluor660
	APC-A700-712/25	APC-Alexa Fluo700, Alexa Fluo700
	APC-A750-780/60	APC-Alexa Fluo750, APC-Cy7,APC-H7, APC-eFluor780
375nm	DAPI-450/45	DAPI, BUV496,Hoechst33258,Hoechst33342, EBFP
	HoechstR-675/30	HoechstR
405nm	PB450-450/45	Pacific Blue,V450,eFluor450,BV421
	KO525-525/40	Krome Orange,AmCyan,V500,BV510
	Violet-610/20	Violet610,BV605,Qdot605

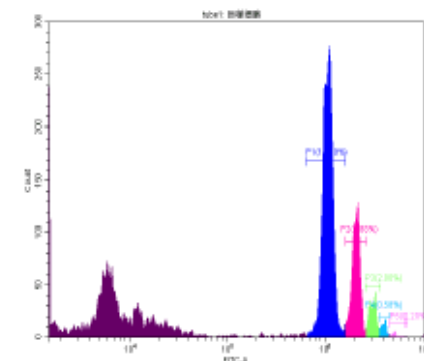
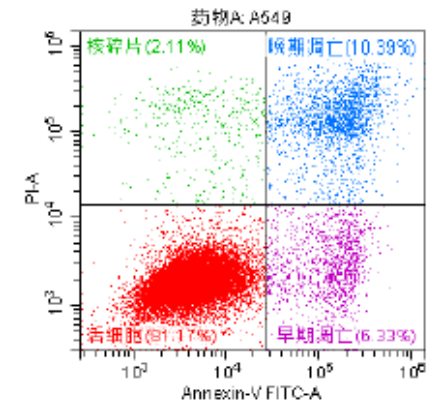
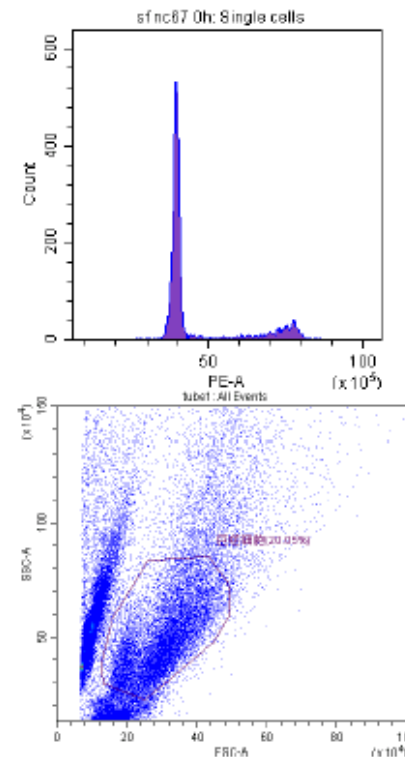
Diagram

➤ 488 nm 激光应用意义

所有流式细胞仪在多激光使用时选择

➤ 488nm激光作为第一触发信号

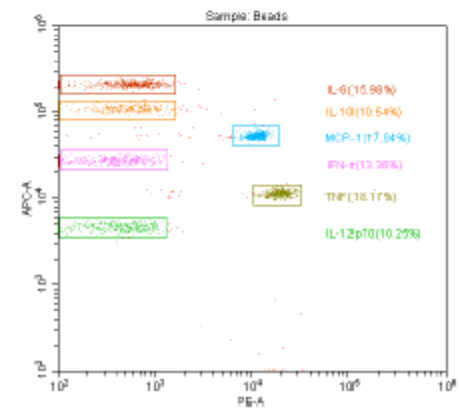
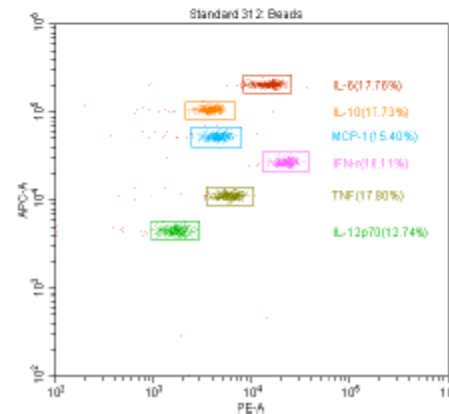
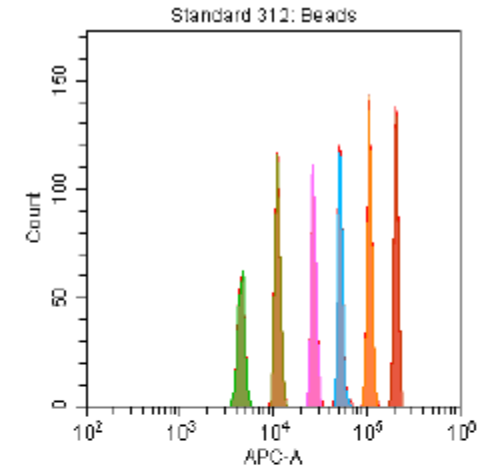
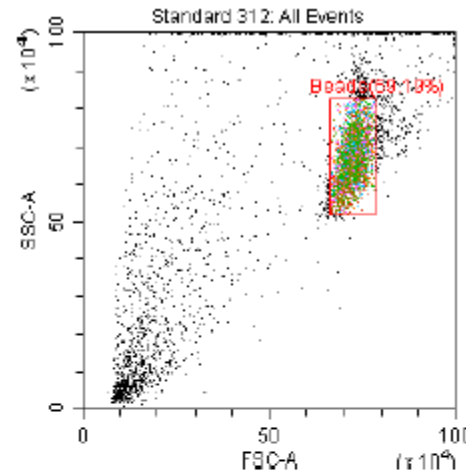
□ 可激发数十种荧光素，可检测常见荧光素种类超过20种（如：FITC, GFP, PE-Texas Red®, PE-Cy5, PE-Cy5.5, ECD, PerCP, PerCP-Cy5.5, EB, PI, 7-AAD, PE-Cy7等广泛应用于临床和基础科研实验中



Diagram

➤ 638 nm 激光应用意义

- 可激发十几种荧光素（如：APC, APC-Cy5, APC-Cy5.5, APC-Cy7, SYTO 59-61, Alexa Fluor® 633, Alexa Fluor® 647 等）
- 与488nm蓝光激光器同时使用可达成8色以上荧光同时检测和分析



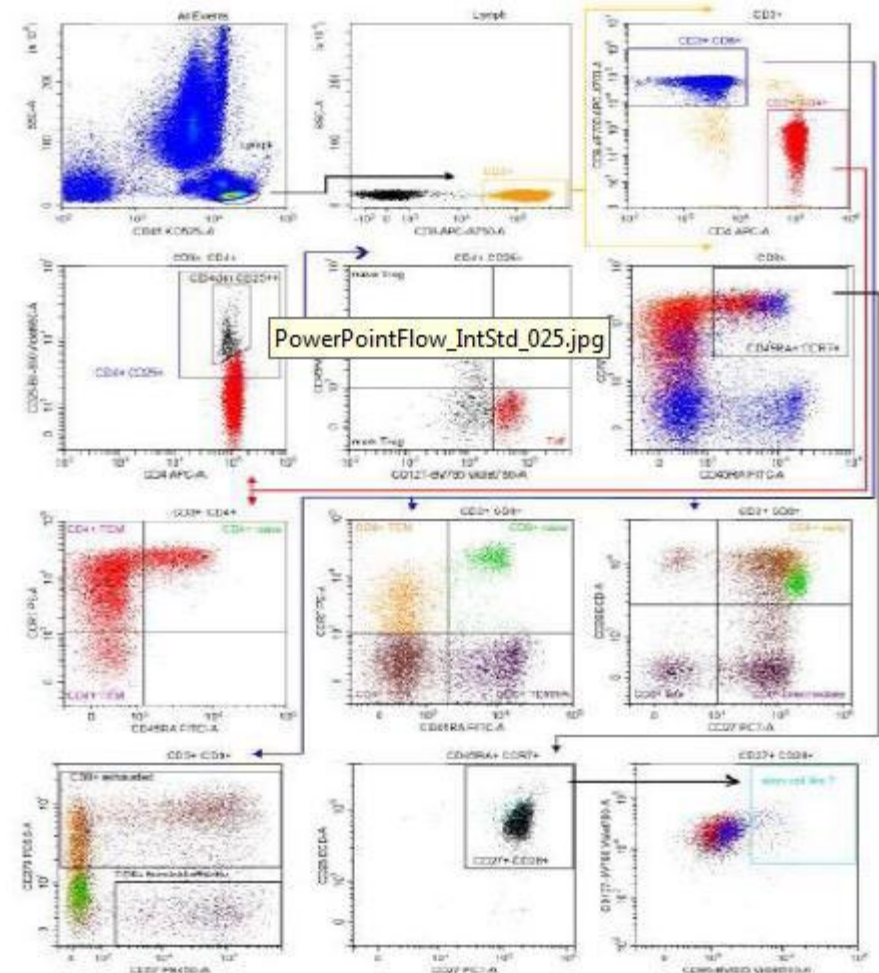
A horizontal banner at the top of the slide. On the left, there is a photograph of a person's hand writing on a yellow sticky note with a pen. A computer keyboard is visible in the background of the photo. The right side of the banner has a solid blue background with the word "Diagram" written in large, white, sans-serif font.

► 405 nm 激光应用意义

□ 可激发如 DAPI, Hoechst33342, Alexa Fluor®405, Pacific Blue, Parificorange, Violet610, violet660, Violet780等

□ 主要用于多色免疫实验，某些细胞自发荧光检测等实验

□ 进行荧光染料选择，减少荧光补偿



Diagram

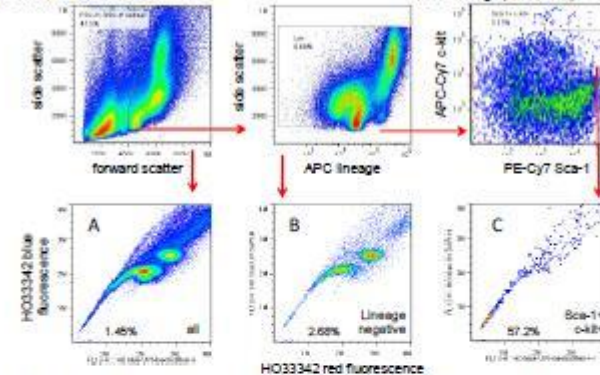
- 更多荧光素染料可供使用：
DAPI、Hochest、BUV、eBFP
- 更多应用：
- 多色免疫更少补偿（BUV）
- 死活细胞、细胞周期不影响其他激光染料使用（DAPI、Hochest）
- 骨髓、肿瘤侧群干细胞（Hochest）
- 荧光蛋白（eBFP）
- 更低成本：相对355 nm 1.45

DC1275 Hoechst 33342 SP on BC CytoFLEX S

3 color sample

129/C57BL/6 mouse bone marrow
Hoechst 33342 at 5 µg/ml (blue = 450/40 nm, red = 675/20 nm)
NUVLD 376 nm excitation

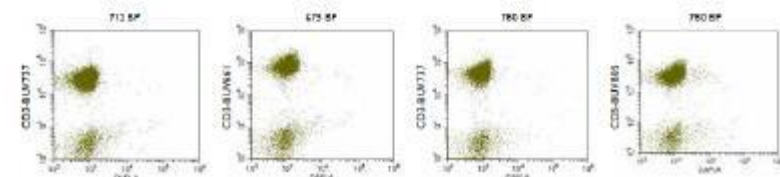
PE-Cy7 anti-mouse Sca-1 (780/60 nm)
APC-Cy7 anti-mouse c-kit (780/60 nm)
APC Lineage (660/20 nm)



Identification of side population from murine bone marrow: utilizing Dye Cycle Violet exclusion (A, all) are lineage negative (B) and lineage negative AND double positive for sca-1 and c-kit (C)

Analysis of Brilliant UV Dye Excitation by Near UV Laser.

Brilliant UV fluorochromes (BUV) can be utilized when designing high complexity cocktails and give additional flexibility in panel design.



Whole blood stained with CD3 antibodies with BUV 441, BUV 737, and BUV 801.

A variety of Brilliant UV dyes were detected using different bandpass filters, as depicted. Excellent separation between positive and negative samples is observed with all of the BUV dyes.

Diagram



流式检测的一般流程

样本检测与分析

1 验证仪器状态

2 设置检测方案

3 上染色标本

4 对照管调节电压，确定目的细胞群体及阴性与阳性的分界

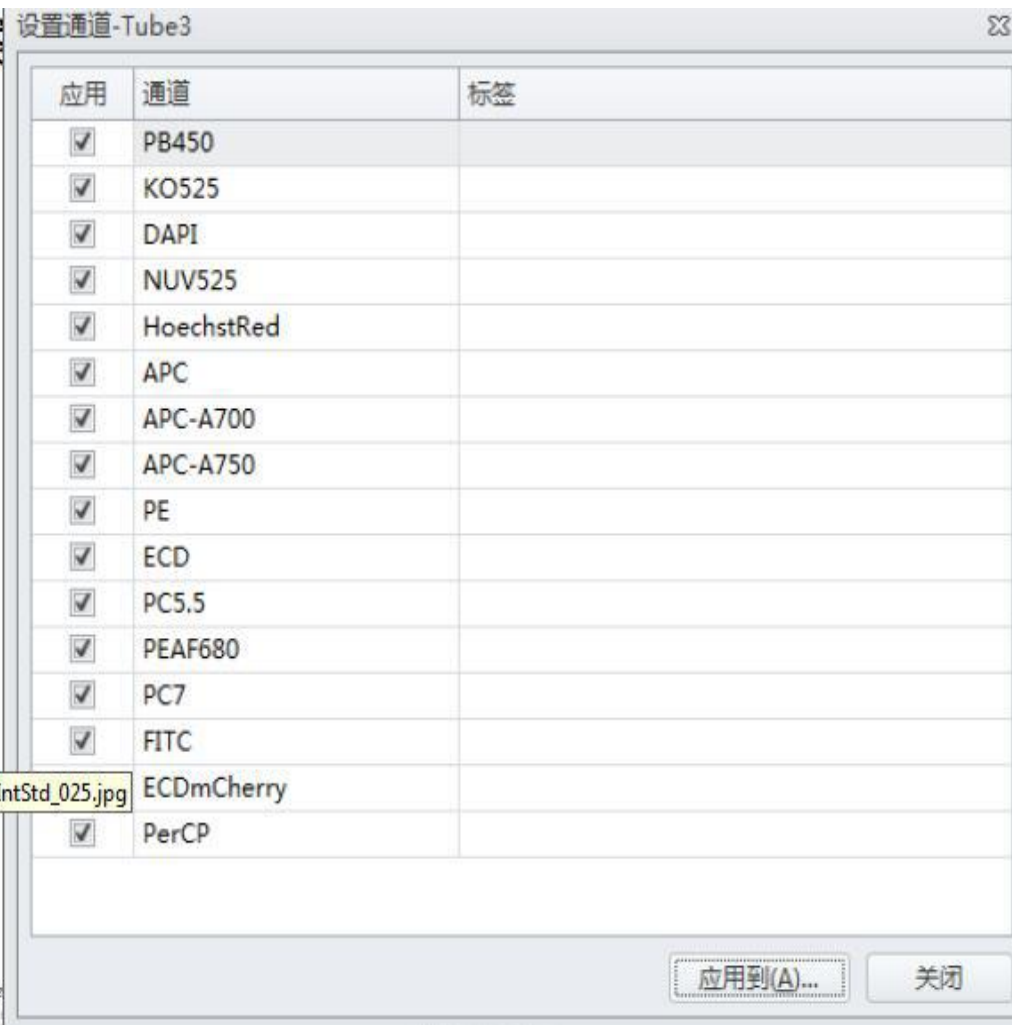
5 固定电压条件，分别用每个单色荧光标记的样本调整颜色补偿，消除不同荧光间的干扰

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

Diagram

2. 设置检测方案

2.1 设置通道及标签



EX	EM	应用
488	620	Phenotyping
495	637	DNA analysis
515	525	Membrane potential
519	534	Reporter molecule
543	712	Nucleated cell detection
546	685	DNA analysis
546	573	Phenotyping
550	565	Phenotyping
560	610	Mitochondrial membrane
596	615	Phenotyping
643	661	DNA analysis
647	667	Phenotyping
647	774	Phenotyping
650	660	Phenotyping

Delivering INNOVATIVE and trusted

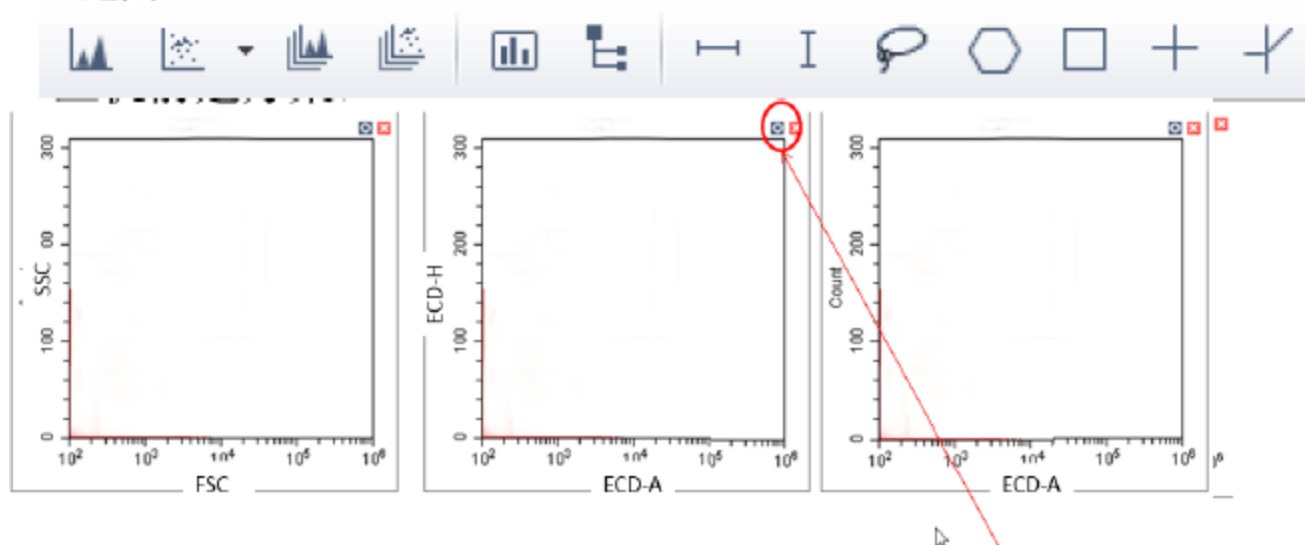
©2019 Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo and any associated marks are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. or its subsidiaries.

BECKMAN COULTER Life Sciences

Diagram

2. 设置检测方案

2.2建图



三张图（如上）：

1. FSC/SSC双参数散点图
2. ECD -A/ ECD-H双参数散点图（除粘连用，点击上图圈处，X、Y轴改成线性放大）
3. ECD直方图（ECD通道-PI的最佳检测通道），可通过“设置”中“编辑标签名称”改名，ECD

Diagram

➤ 上染色标本

上样顺序(一般):

A. 同型对照/阴性管-Blank

B. 补偿管（一种荧光染料不需要）

C. 待测样本(对照组、处理组)

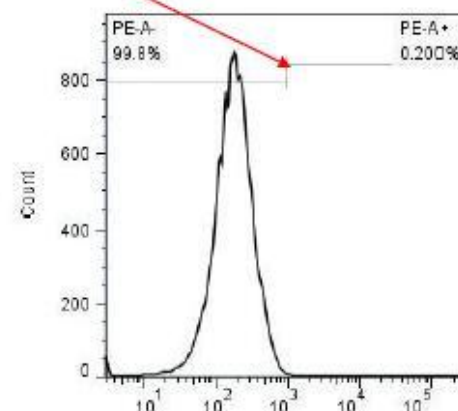
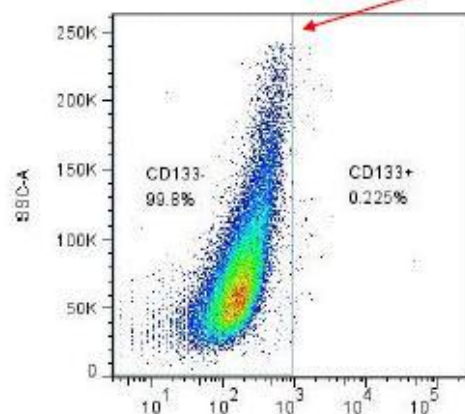
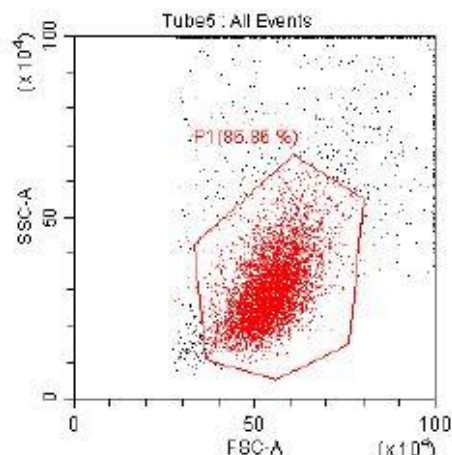
Diagram

4. 电压的调节

电压调节—利用阴性/同型对照 (排除非特异性染色): **设置背景**, 目的就是调节细胞在坐标轴上的位置, 使阴性及阳性细胞都能出来...

★ 电压 /增益 Gain

设定阴性和阳性信号强度的临界点

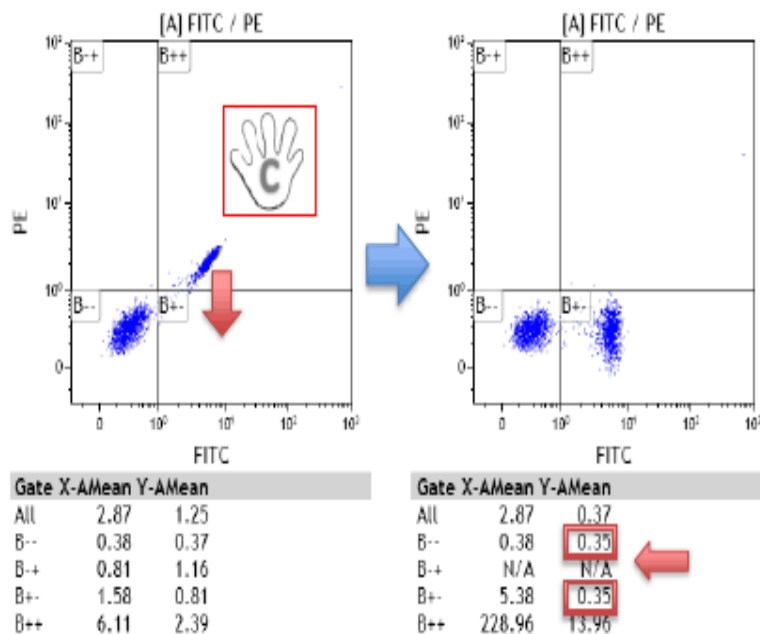


电压调节的原则: 同型对照或阴性对照在阴性区域呈正态分布, 阳性率<2%但不为0

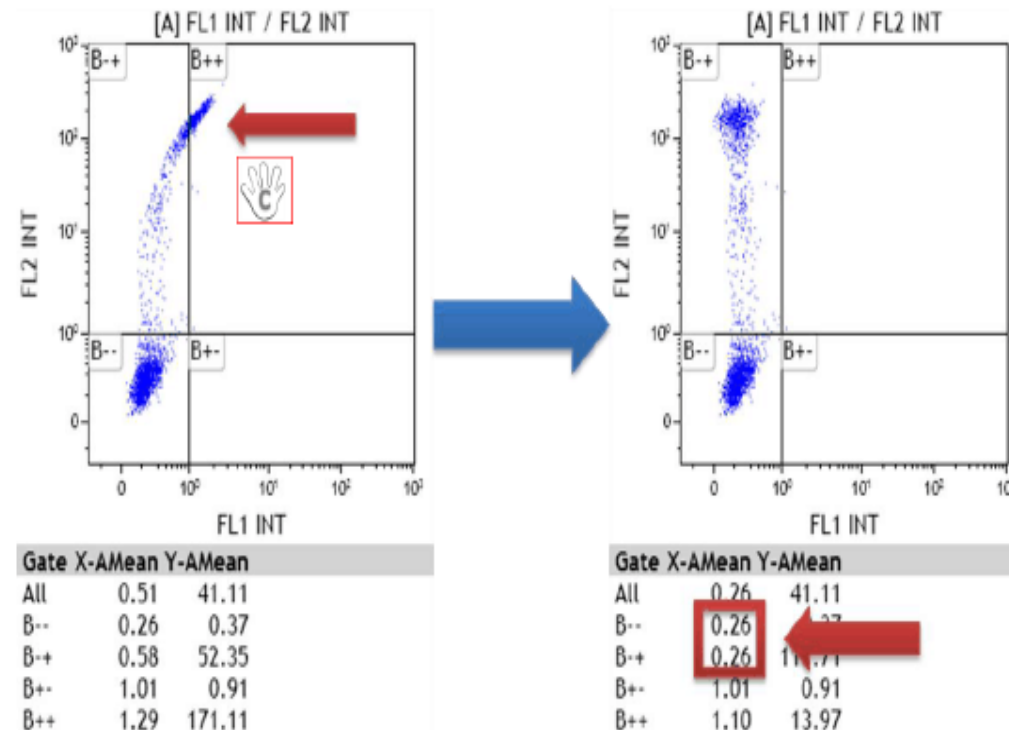
Diagram

5. 调节荧光补偿-以双色 (FITC/PE) 为例

FITC单染



PE单染



Table

Compensation Matrix

☒ Apply Compensation ☐ Show Autofluorescence

Height/Area

	-FITC%	-PE%	-PerC...	-PE-C...	-APC%	-Alex...	-APC...	-BV4...	-BV5...	-BV6...	-BV7...	-BV78...
jpg		1.73	0.00	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.40	0.00	0.00	0.00
PE	11.63		0.08	2.22	0.00	0.00	0.12	0.00	0.08	0.00	0.00	0.01
PerC...	2.32	25.58		1.98	4.28	0.00	0.54	0.00	0.12	0.00	0.00	19.98
PE-Cy7	0.22	2.88	22.58		0.61	0.00	4.58	0.02	0.04	0.00	0.00	9.28
APC	0.21	0.12	2.43	0.18		0.00	3.72	0.11	0.32	0.00	0.00	1.32
Alexa...	0.21	0.12	17.30	0.14	30.92		5.29	0.15	0.52	0.00	0.00	39.78
APC-H7	0.12	0.06	6.70	2.47	18.22	0.00		0.06	0.24	0.00	0.00	24.88
BV421	0.60	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.08		7.82	0.00	0.00	5.94
BV510	1.35	0.04	0.00	0.00	0.02	0.00	0.09	10.99		0.00	0.00	1.04
BV570	0.24	5.56	0.00	0.13	0.06	0.00	0.18	1.16	41.93		0.00	0.51
BV650	0.66	1.05	5.32	0.94	9.46	0.00	0.51	0.21	15.63	0.00		2.30
BV711	0.62	0.31	16.05	0.92	2.03	0.00	0.14	0.08	5.69	0.00	0.00	
BV785	0.60	0.04	3.96	1.75	0.49	0.00	2.77	0.02	1.40	0.00	0.00	27.59

Save To Compensation Library... Save As... Close

多色补偿

多色补偿调节就是在双色补偿调节的基础上，进行多色的两两补偿调节，原理相同，只是增加工作量

自动化补偿

随着软件功能的增强，现在可以实现在线自动化的多色补偿调节。也可以进行实验后的离线调节

Diagram



流式在生命科学领域的应用

Contents



1 基础研究

2 免疫学研究

3 微颗粒研究

Diagram

1

流式检测的基础:

检测的是单个细胞
或颗粒

检测的是光学信号

2

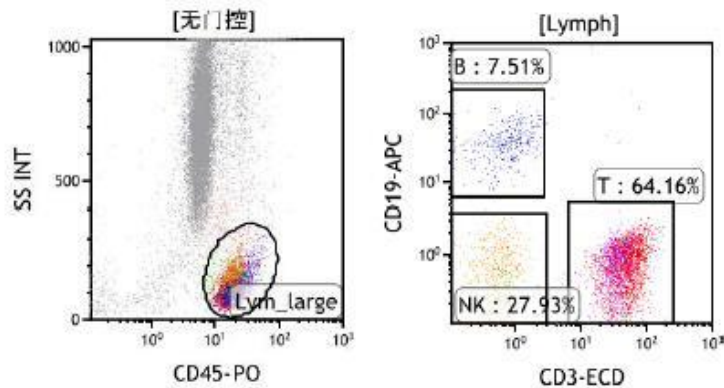
流式应用的范围:

具备荧光: 抗体,
染料, 荧光分子
能制备为单细胞悬
液

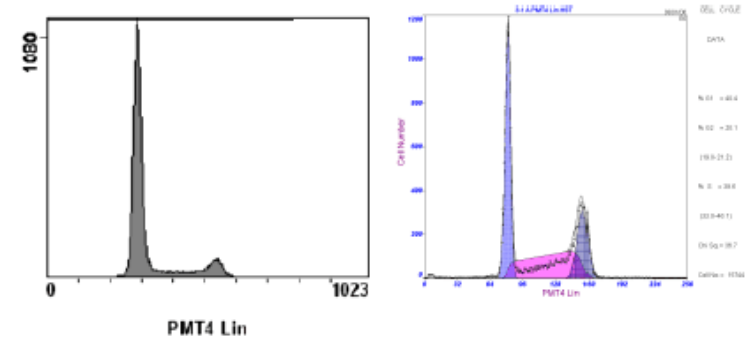
Diagram

流式细胞仪可以干什么？

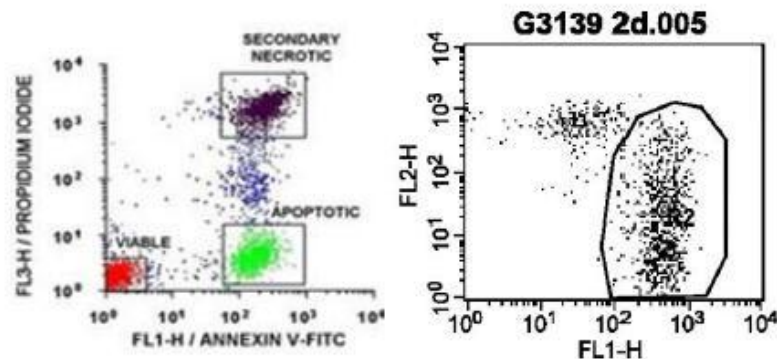
免疫



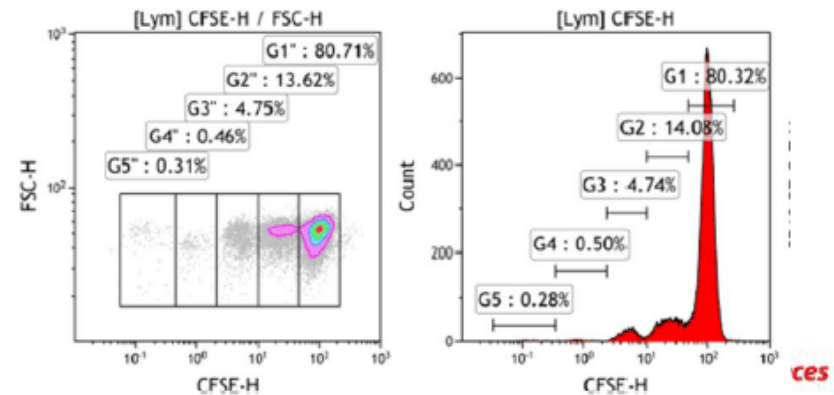
田甘
PowerPointFlow_IntStd_025.jpg



凋亡



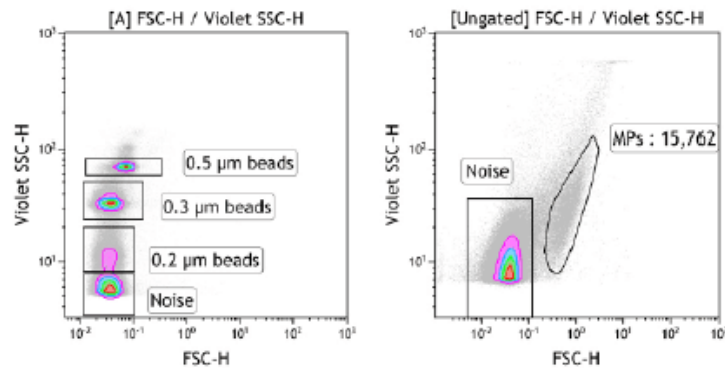
细胞增殖



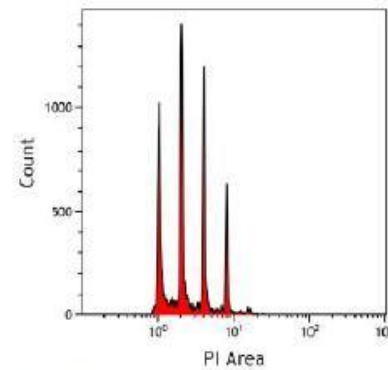
Diagram

流式细胞仪可以干什么？

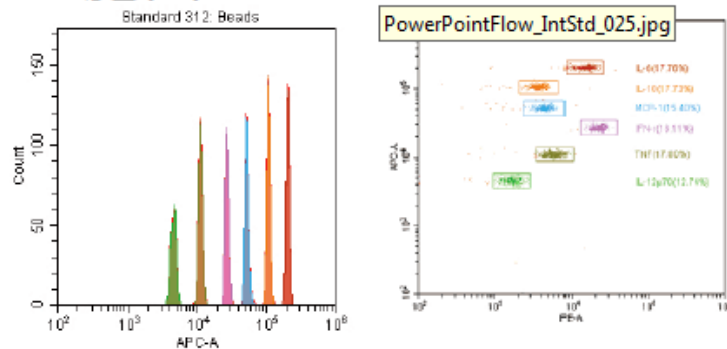
• 纳米材料、血液微颗粒



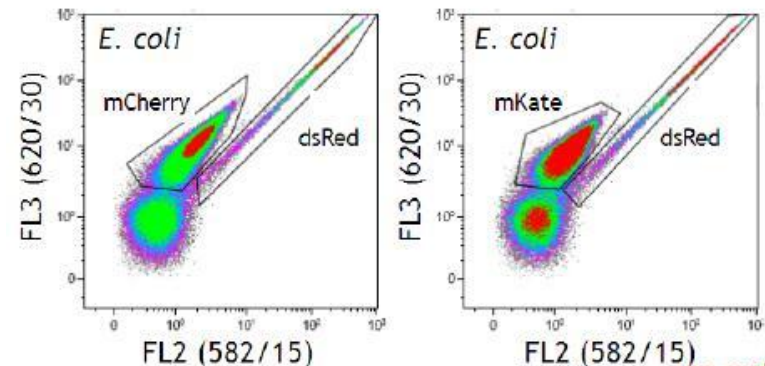
• 植物倍体、C值



• 细胞因子



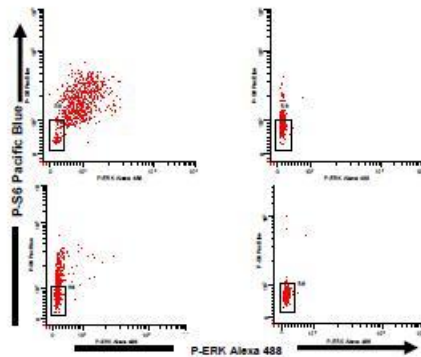
• 转染



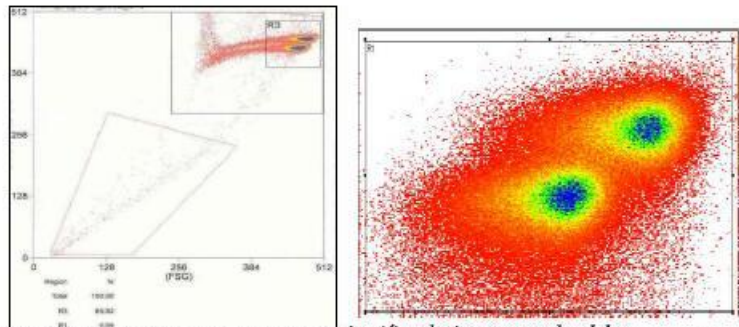
Diagram

流式细胞仪可以干什么？

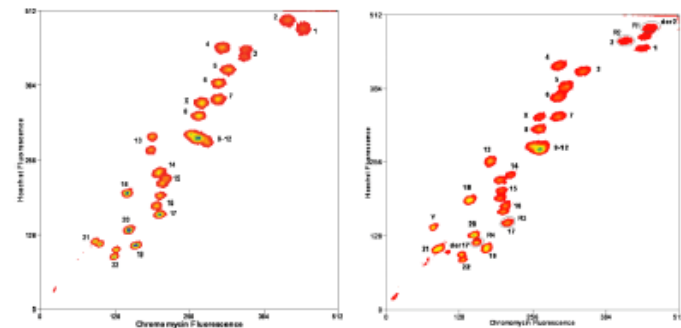
• 磷酸化



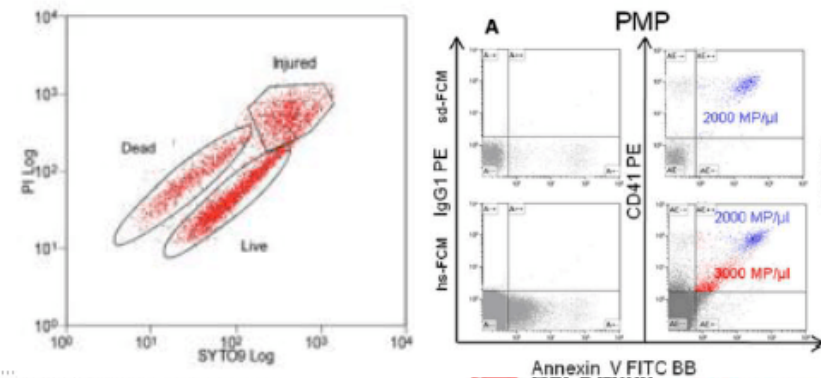
• 精子



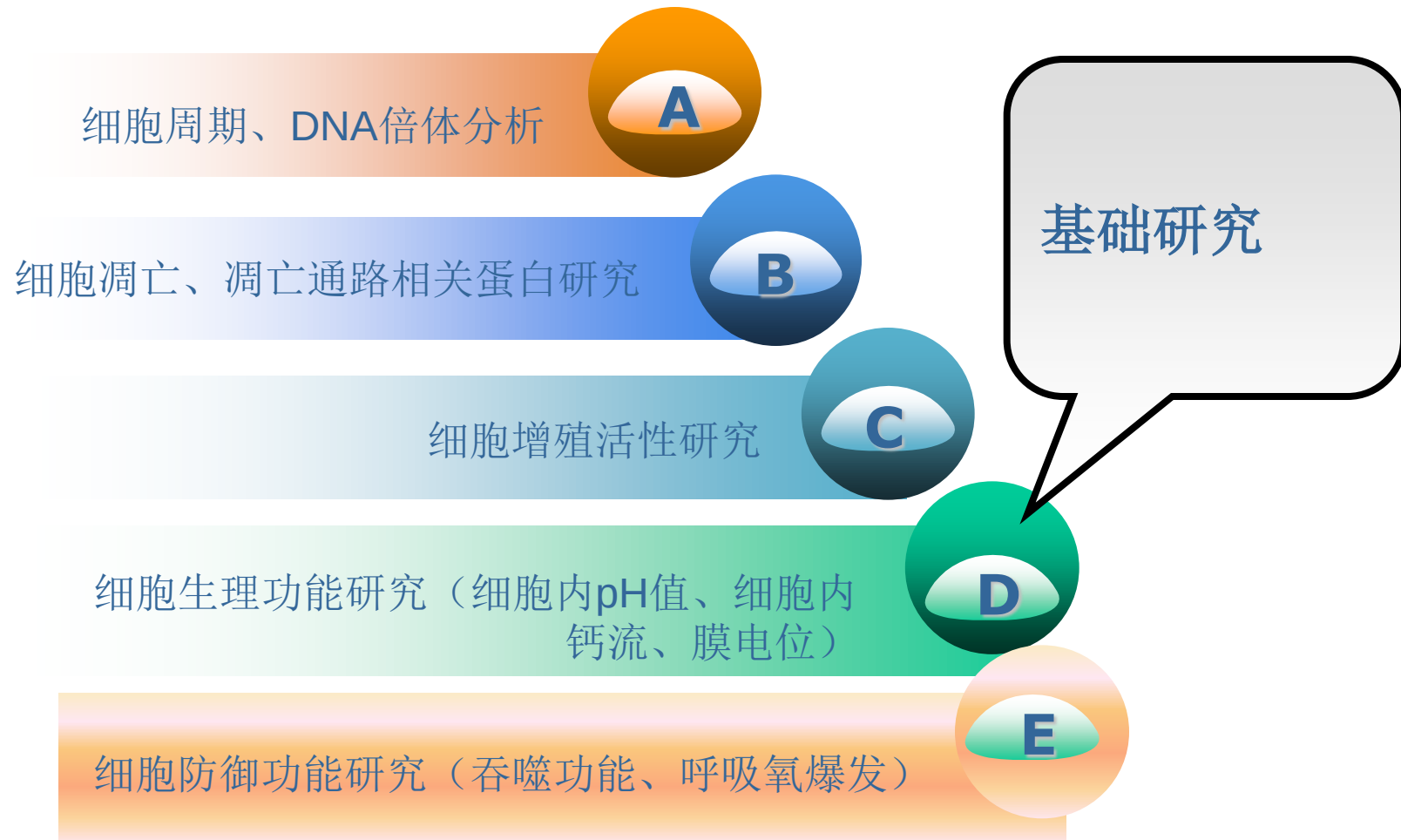
• 染色体



• 微生物、微粒



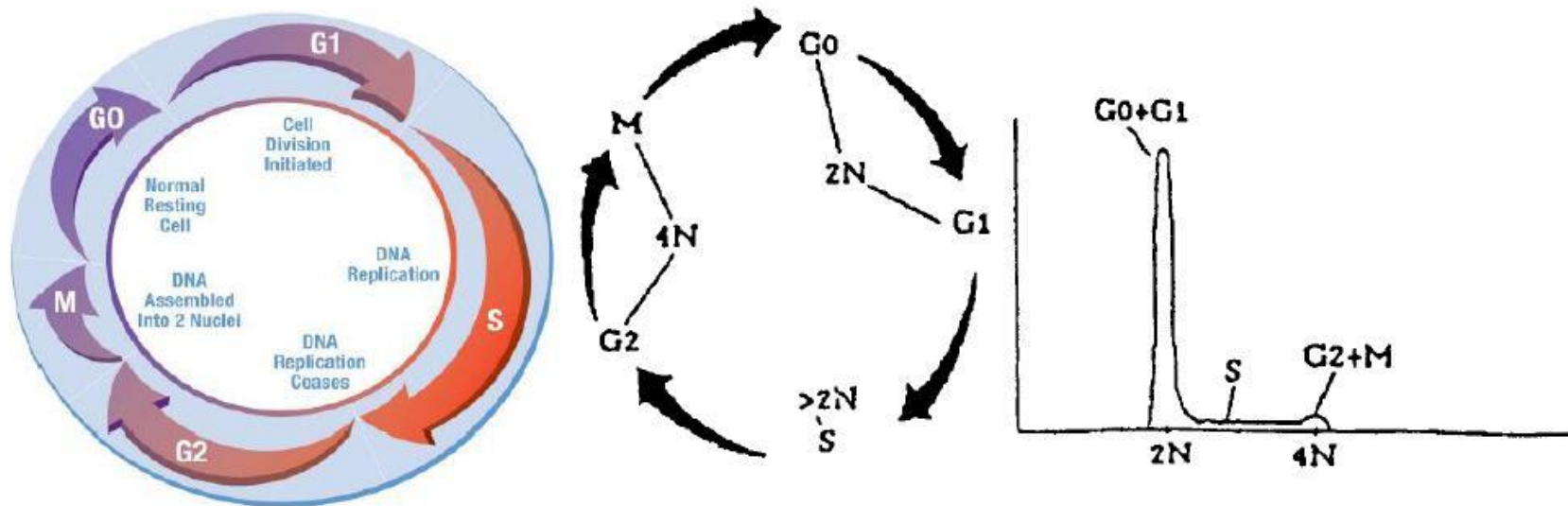
Marketing Diagram



Diagram

细胞周期

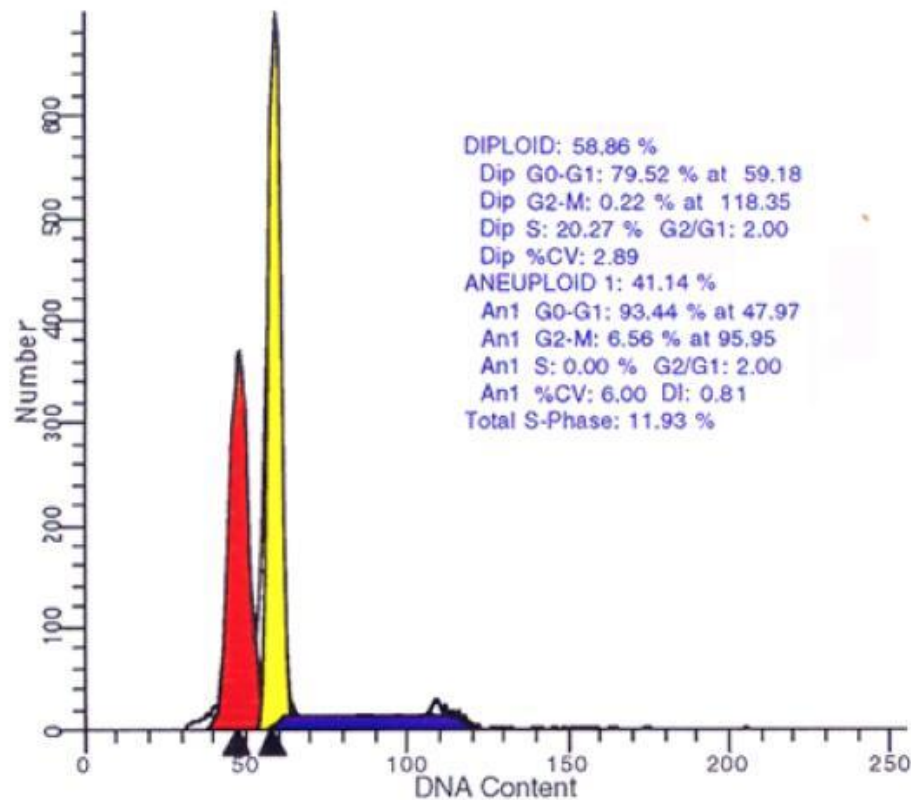
- 利用特殊核酸荧光染料标记DNA，通过流式细胞仪检测荧光染料的激发荧光。荧光强度与DNA的含量成量效关系，即DNA含量多少与PI结合量成正比。因此，FCM分析细胞周期时，将DNA含量直方图分为三部分，即G0/G1、S、G2/M期。



常用染料：PI、DAPI、7-AAD、Hoechst

Diagram

肿瘤细胞非整倍体分析



正常细胞的**DNA**量都相同，而癌变细胞的**DNA**指数发生变化，非整倍体出现概率很高。

Diagram

DNA绝对含量

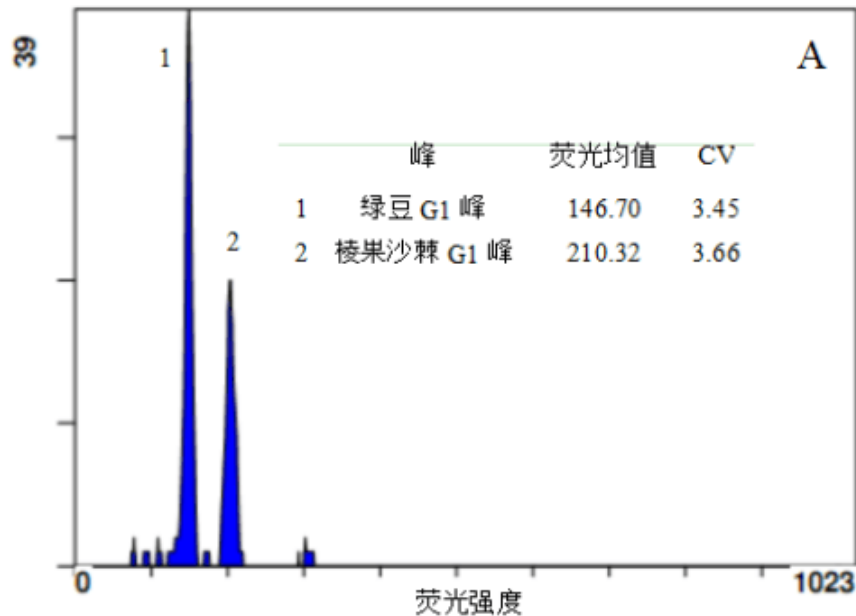


表3 常用参照样本

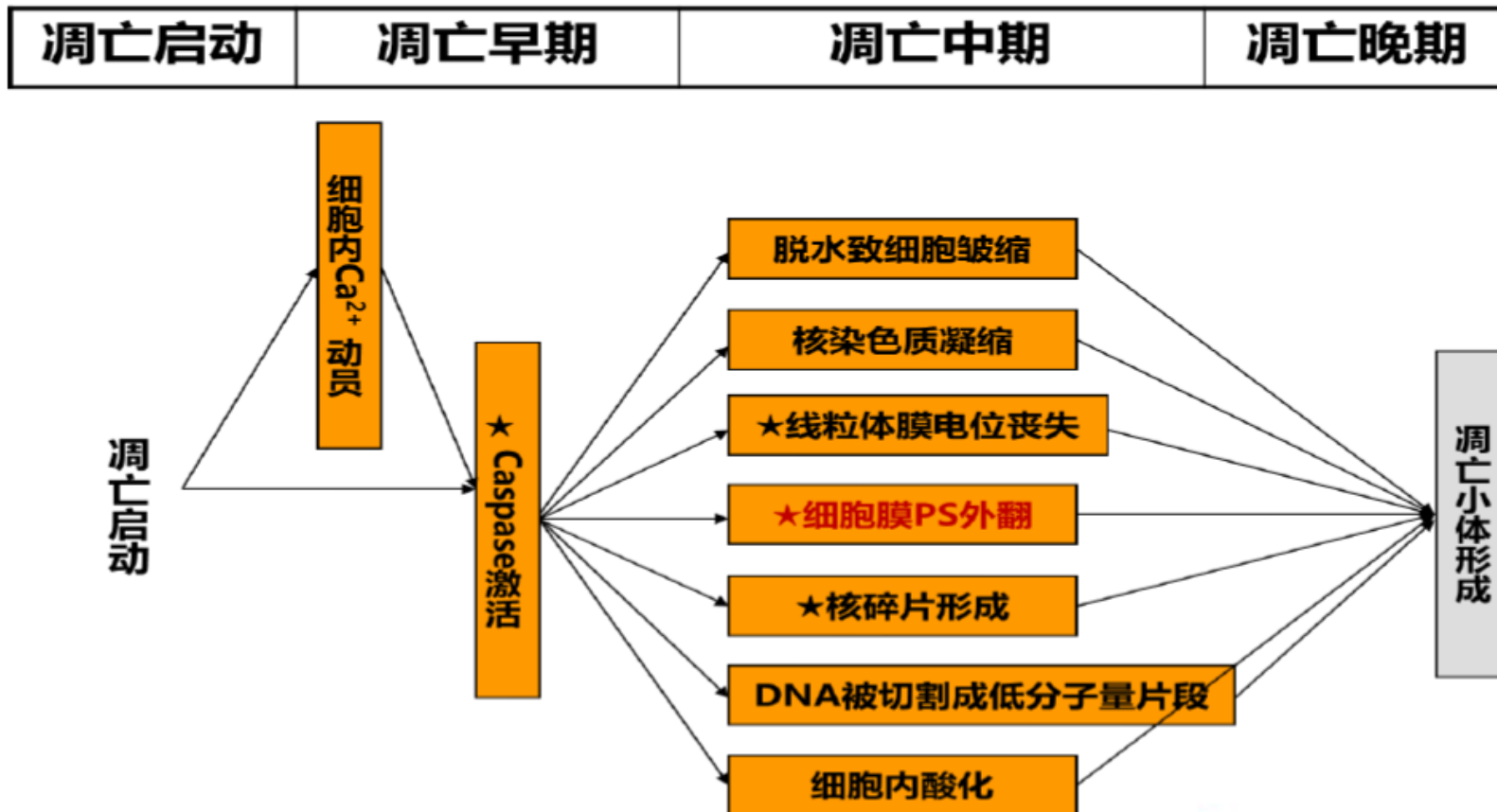
目标样本	参照样本	参照样本倍性	参照样本核 DNA 含量/pg
裸子植物	玉米	2c	10.93
	大麦	2c	11.12
	小麦	2c	34.85
	洋葱	4c	67.00
被子植物	番茄	2c	2.00
	绿豆	2c	2.12
	欧洲千里光	2c	6.33
	豌豆	4c	19.46

绿豆和棱果沙棘的流式图。取新鲜叶片，绿豆(4n)为内标，Otto's解离液游离出完整细胞核后，经PI染色，采集荧光信号，得峰1和峰2。

Diagram

细胞凋亡

- 细胞凋亡与细胞坏死是两个不同的过程

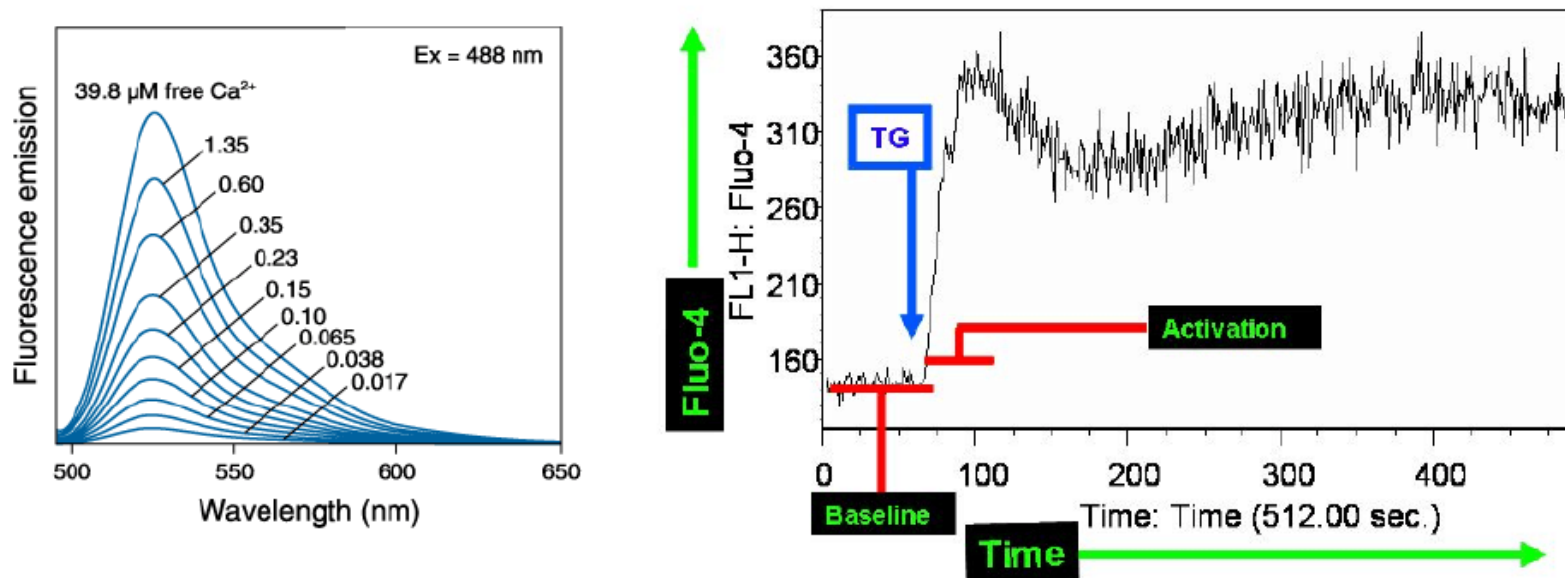


Diagram

生理功能

钙离子水平-Fluo系列染料、Indo-1等

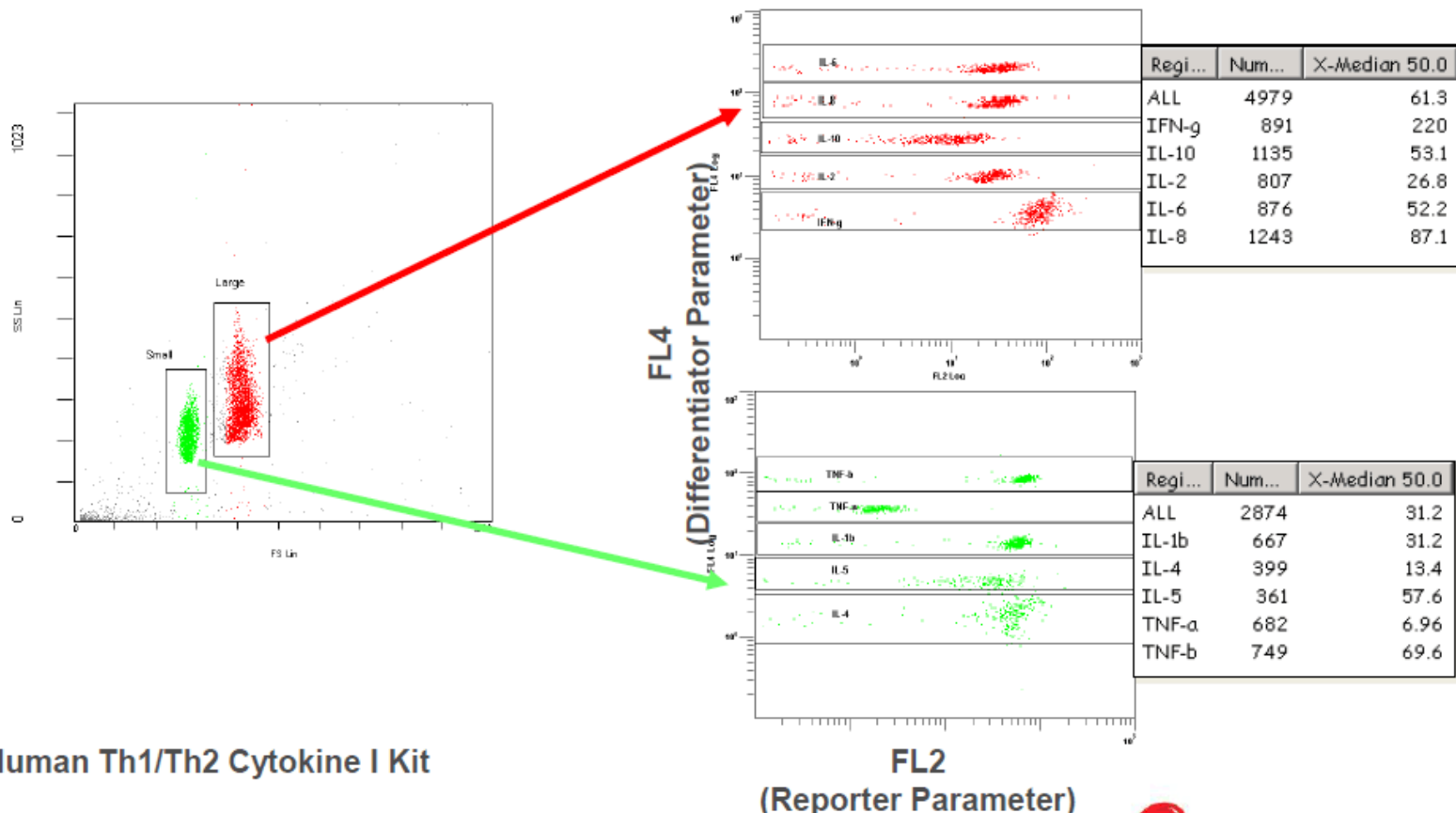
Fluo-4 AM进入细胞后可以被细胞内的酯酶剪切形成Fluo-4，从而被滞留在细胞内。Fluo-4可以和钙离子结合，结合钙离子后可以产生较强的荧光，检测时推荐使用的激发波长为488nm左右，发射波长为515 nm左右。



Diagram

液相微球检测 (Flow cytomic) : 血清

流式细胞仪芯片技术-高通量同时检测10种细胞因子

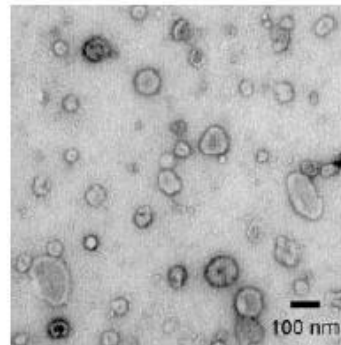


Diagram

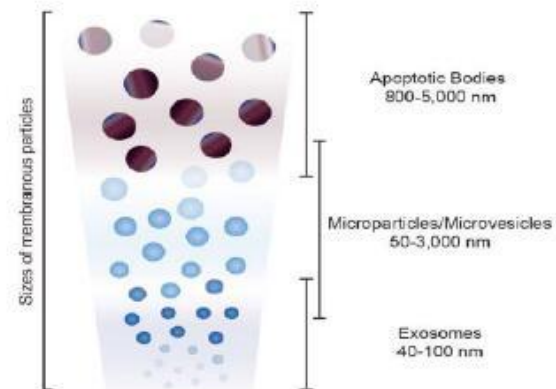
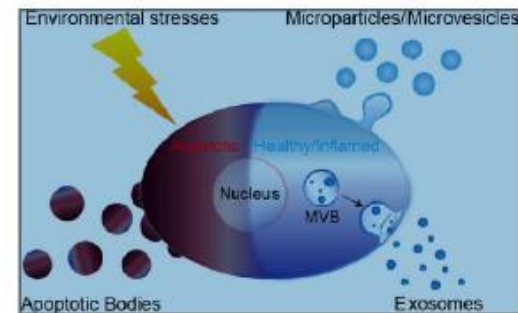
微颗粒研究

细胞在应激或凋亡过程中由细胞膜分泌产生的亚微米级颗粒

- 大小异质性
- 主要来源:
 - 血小板,
 - 红细胞,
 - 白细胞,
 - 内皮细胞,
- 携带原细胞表面标记
- 存在于循环系统中



TEM image of extracellular vesicles from human urine
Edwin van der Pol



A blurred photograph of a woman with long brown hair, seen from the side, looking at a computer monitor. The background is out of focus, showing what appears to be an office environment with other people and equipment.

Thank You !