实用流式细胞技术及其样品处理

Practical flow cytometry and sample preparation

胡茂志

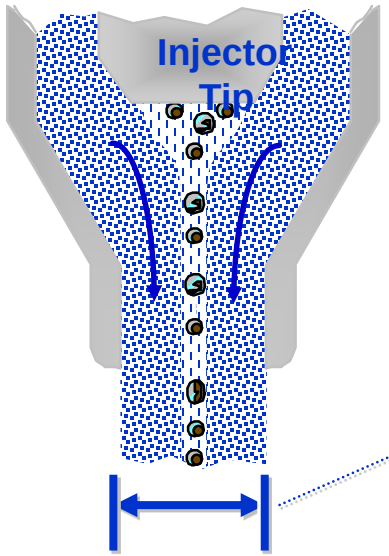
扬州大学测试中心

三、样品及其前处理

总的要求

- 颗粒：细胞
- 单细胞悬液，避免任何细胞沉积
- 荧光标记
- 仪器的限制：激光器、滤光片--荧光素
- 实验的限制：荧光素组合

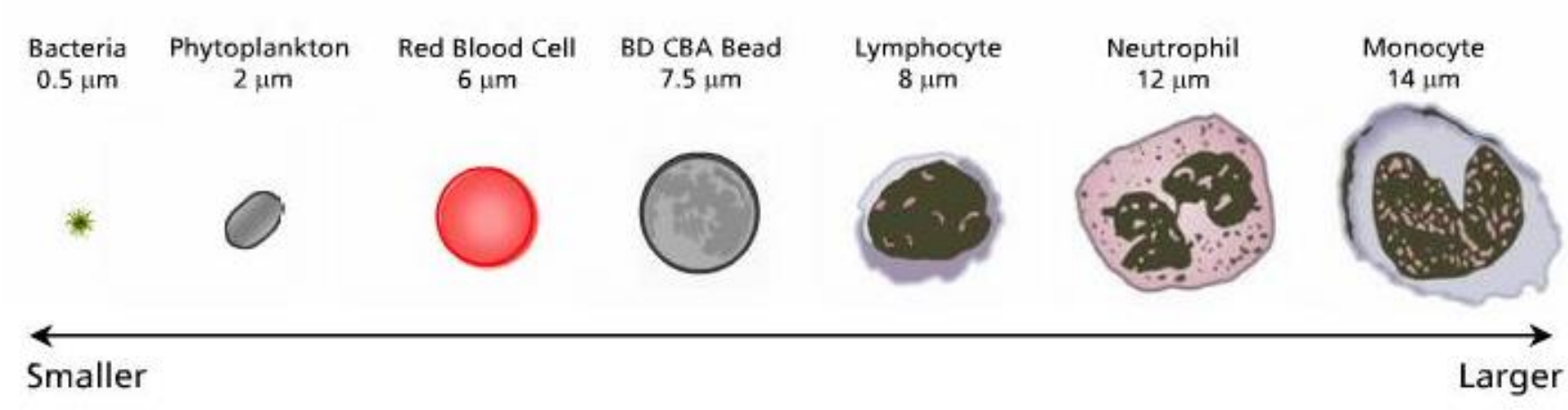
1、细胞大小



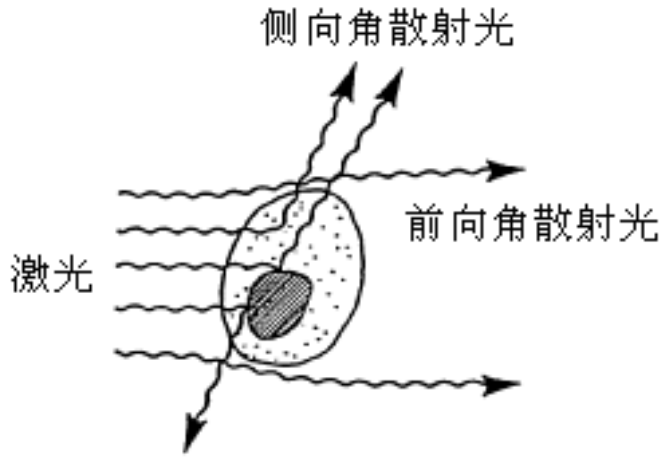
所有的细胞均需要经过过滤：

200（75μm）-300（45μm ）- 400（37μm）目

喷嘴：70和100μm

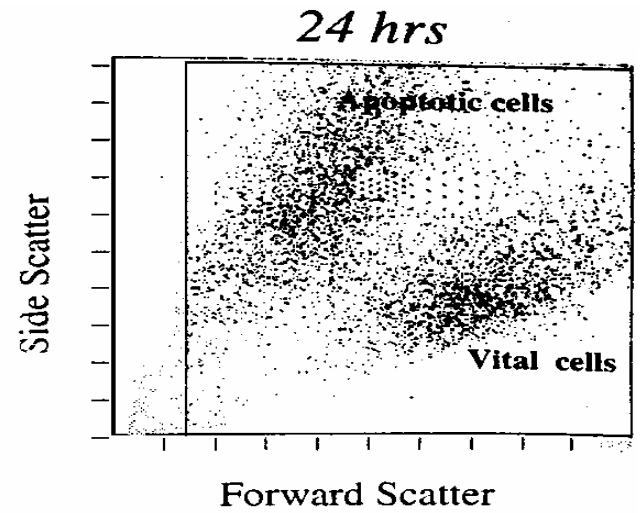


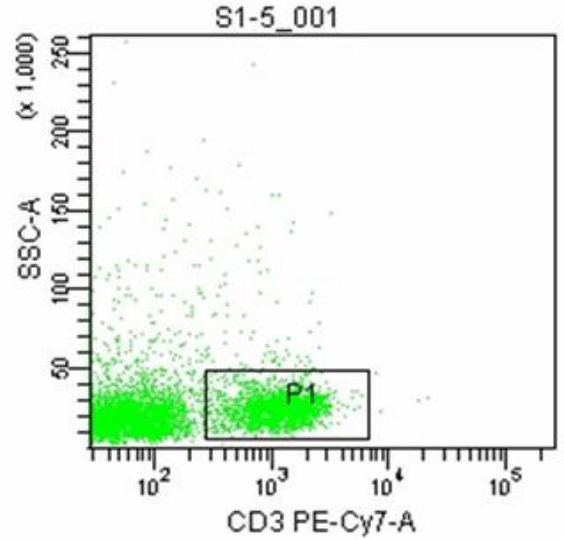
2、细胞物理参数的变化



- 不同的处理和固定方法也可能造成FSC信号的改变。另外，非球形细胞（禽类红细胞）由于其在液流中空间取向不同，也可能导致对同种细胞的FSC信号完全不同。
- 在可能的情况下，尽量用荧光参数来设门。

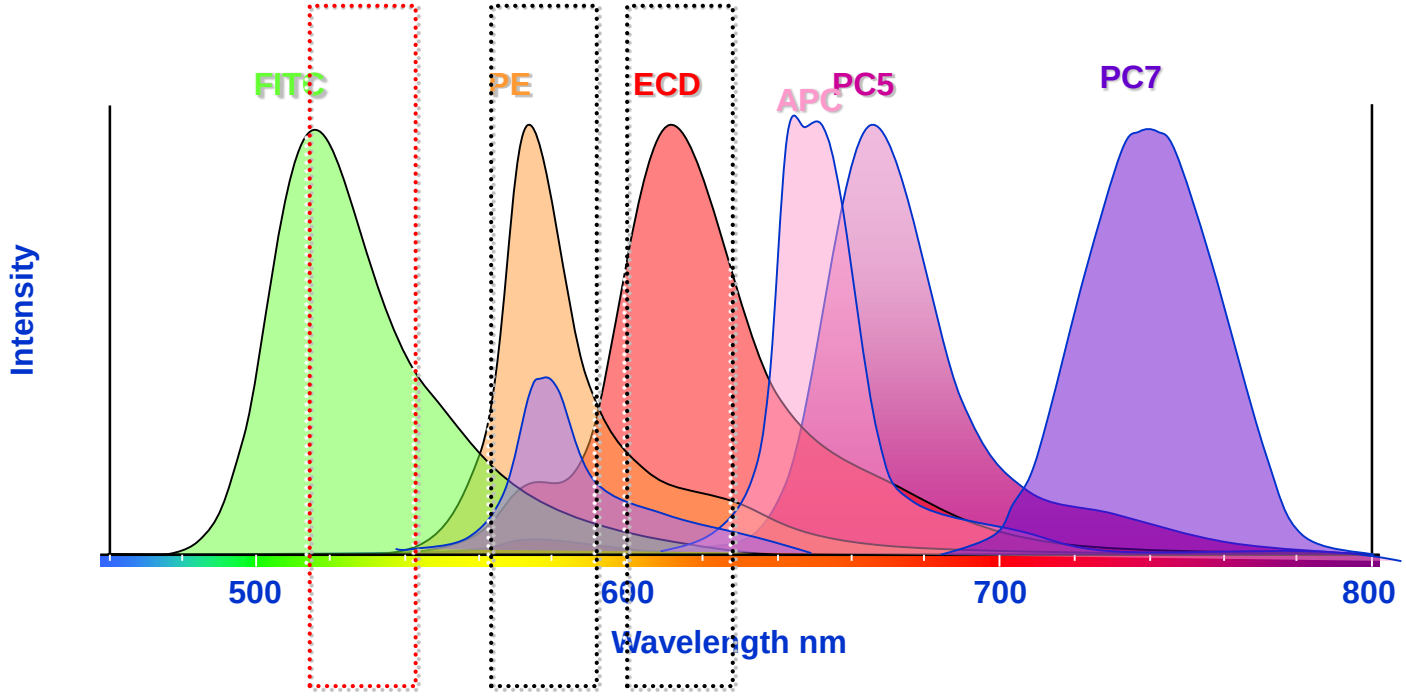
3、设门

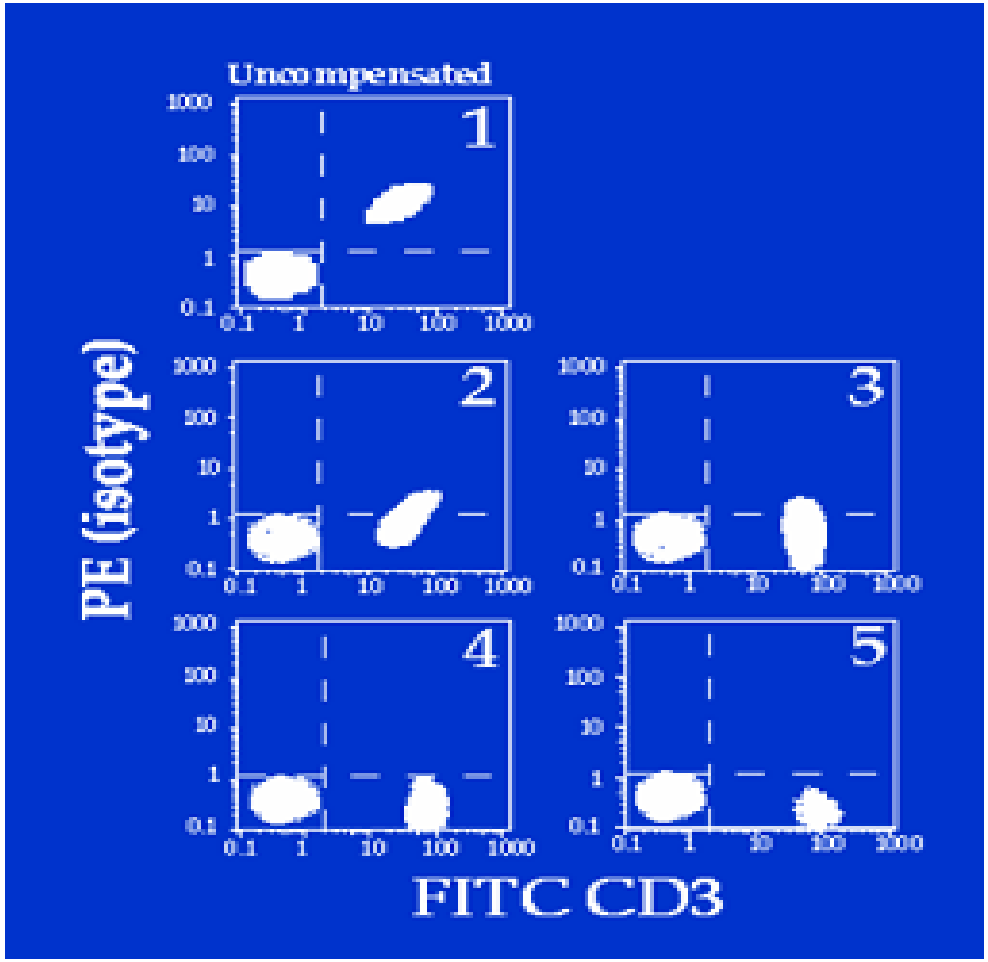




- 散射光设门：注意细胞形态的变化
- 荧光设门：要明显区分阴、阳性细胞

4、荧光补偿


FITC
PE
ECD
APC
PC5
PC7
Intensity
500
600
700
800
Wavelength nm

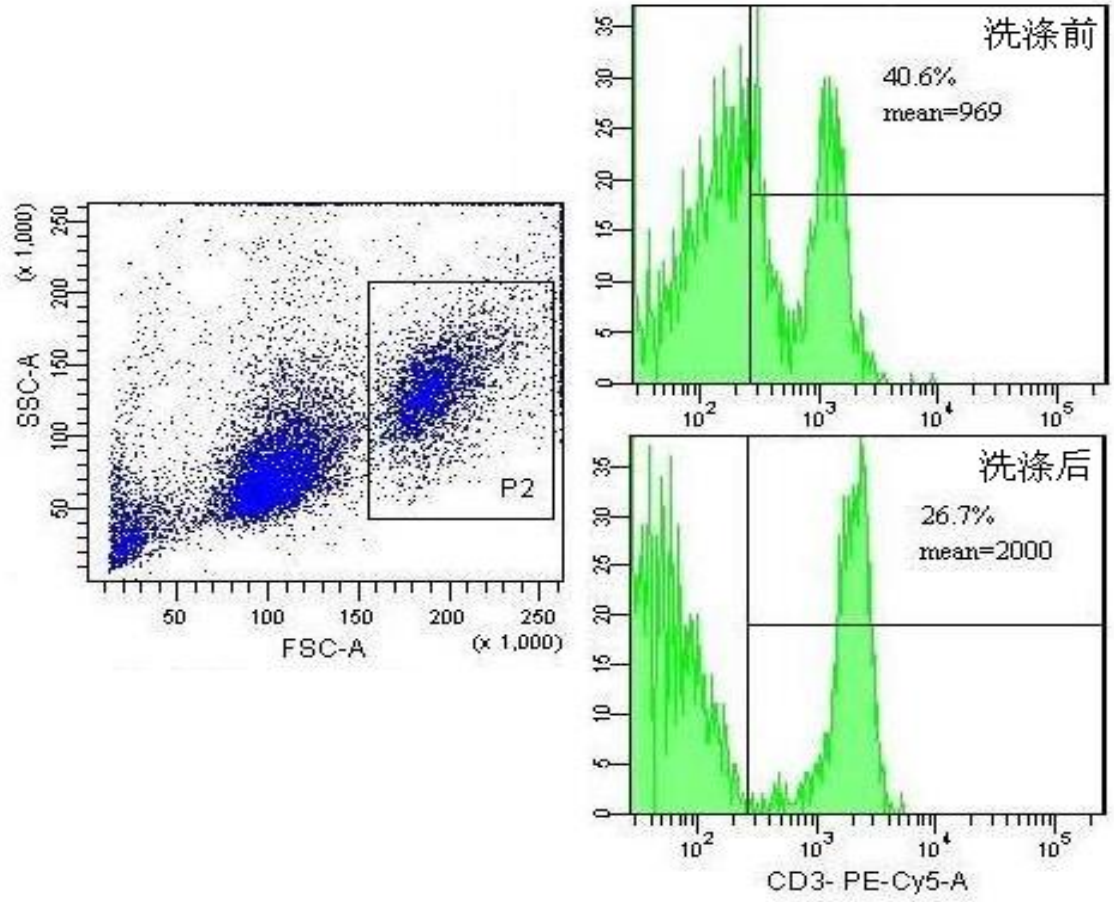


需要用单标样品来调节荧光补偿

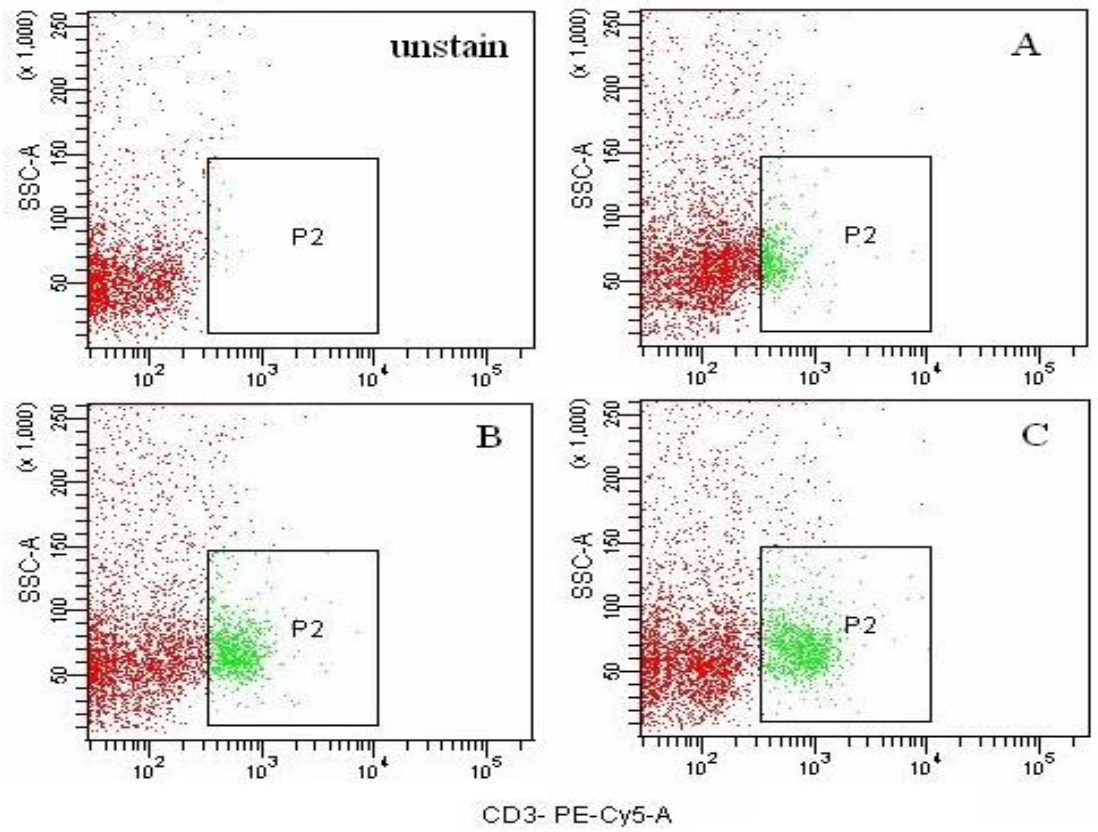
5、红细胞的影响

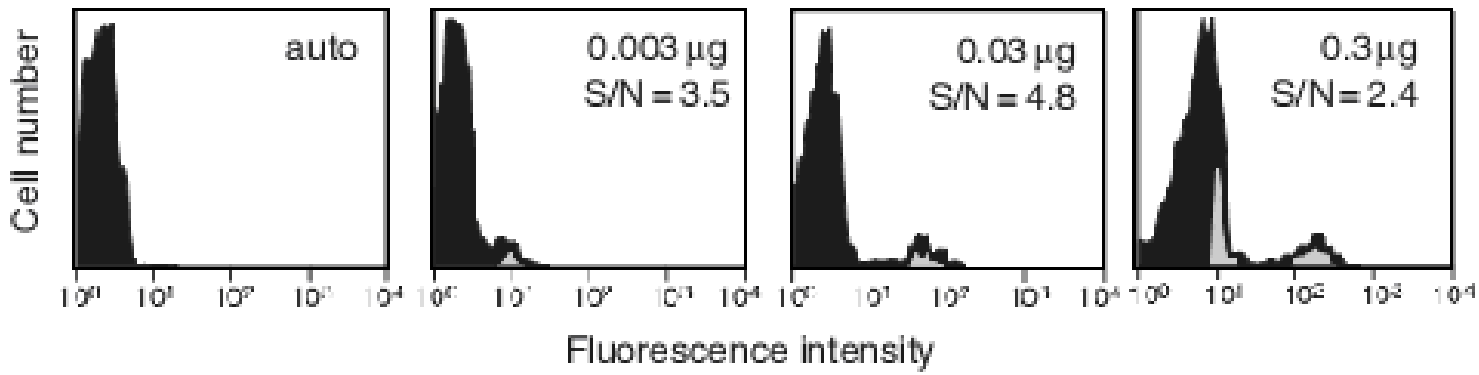
- 溶血：不影响表面抗原的标记，常用标记后溶血

6、洗涤效果

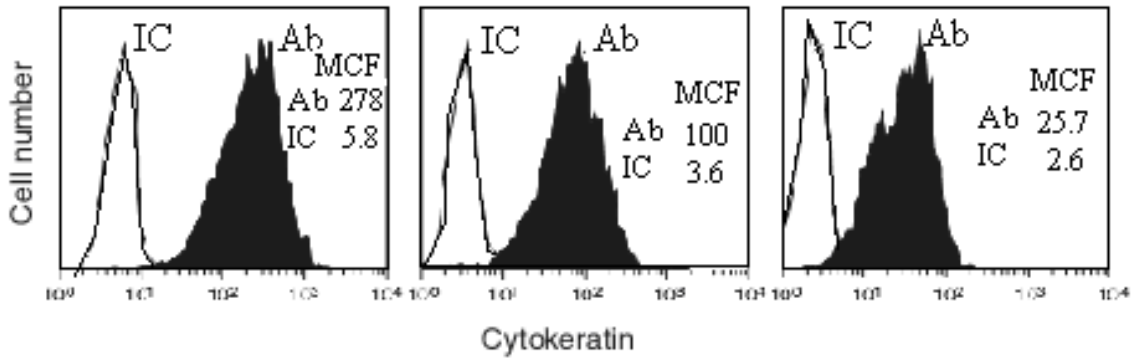

SSC-A
(x 1,000)
FSC-A
(x 1,000)
P2
洗涤前
40.6%
mean=969
洗涤后
26.7%
mean=2000
CD3- PE-Cy5-A

7、标记效果





表面抗原（标记荧光和自发荧光）



IC: isotype control, Ab: antibody

胞内抗原（IC：同型对照）

改变抗体的量是改变浓度而不是体积

less than or equal to 0.5µg per million cells in a 100µl total staining volume

- 避光标记
- 同一实验尽量用同厂家、同批次高质量抗体。
- 按照说明，标记试剂一般不能冻存
- 慎用未经FCM鉴定的抗体
- 首选直标，间标有时效果不好

8、实验对照的设计

- 空白对照
- 阴性对照：常用同型对照

  单色分析：同型对照

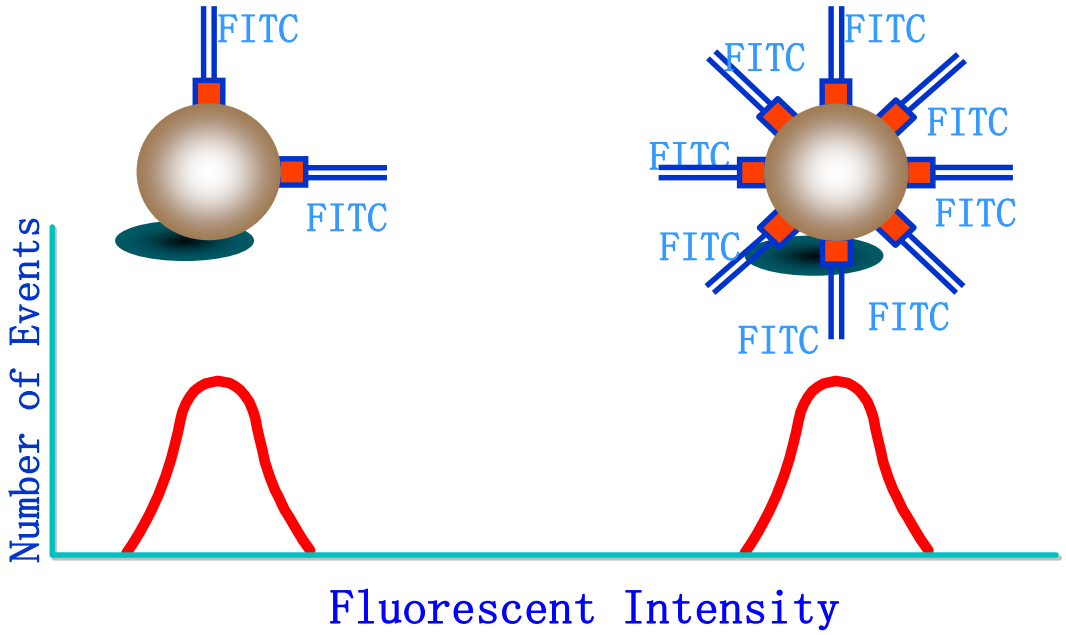
  多色分析：同型对照、单阳性对照

  同型对照：与抗体相同种属来源、相同剂量和相同亚型的免疫球蛋白，用于检测由于抗体非特异性结合而产生的背景染色。
- 阳性对照：检测阴性时
- Fc受体的阻断：与抗体匹配的动物的血清或IgG。

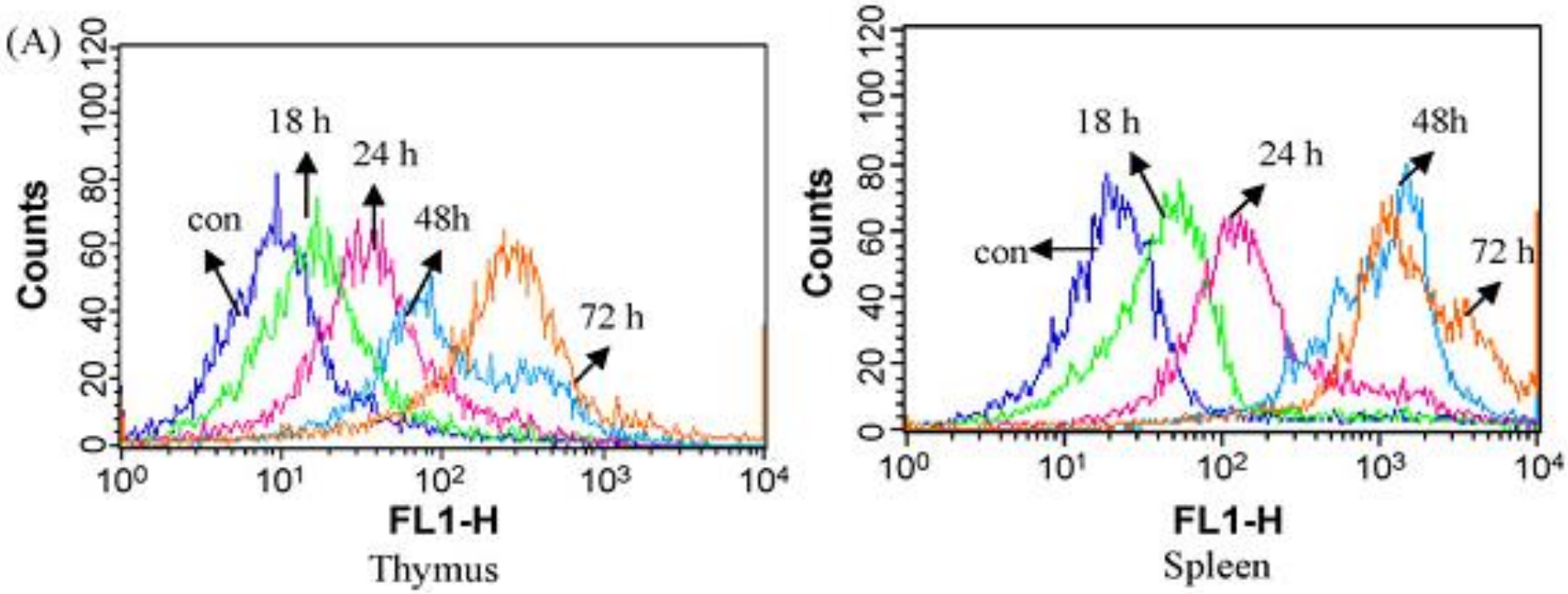
9、细胞数量

- 统计学意义
- 计数：10^6数量级/0.1-0.5ml
- 非常规检测的样品，调节参数需要消耗一些细胞
- 需要分析的细胞至少要大于500个。
- DNA分析的样品要大于10000个。

10、细胞成分的定量

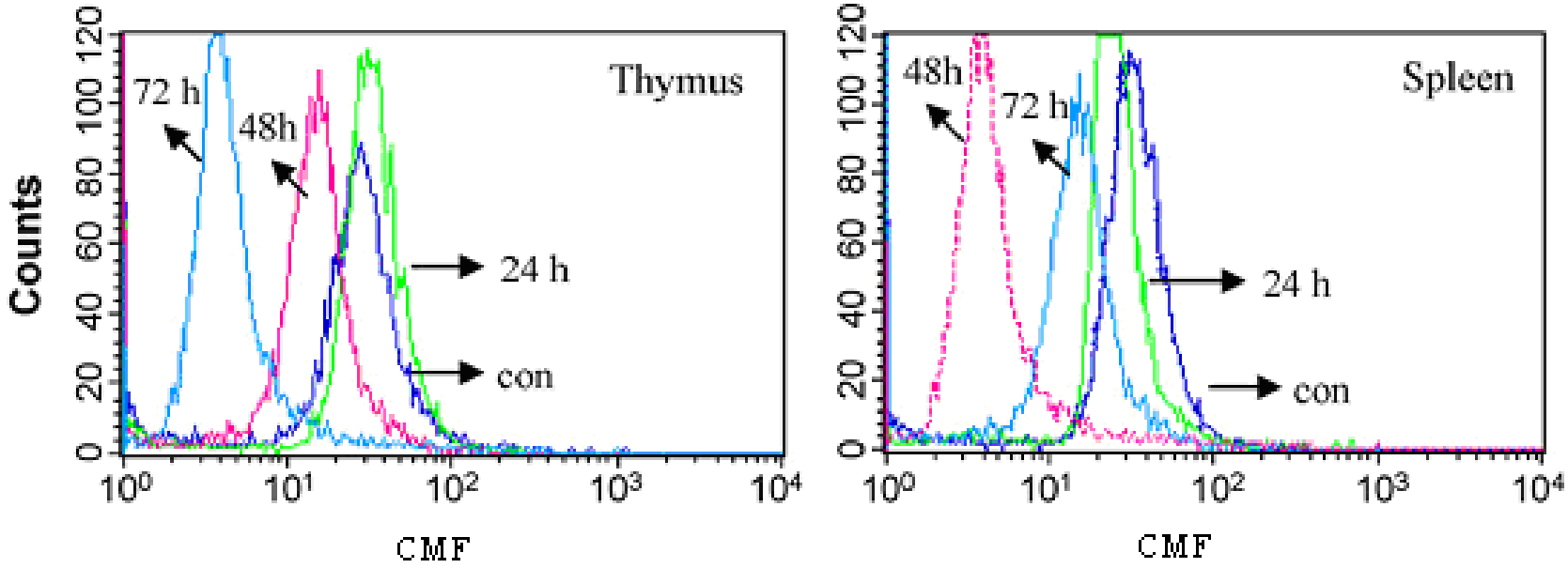


荧光强度与结合位点数量成正比（可用百分数和荧光强度表示）



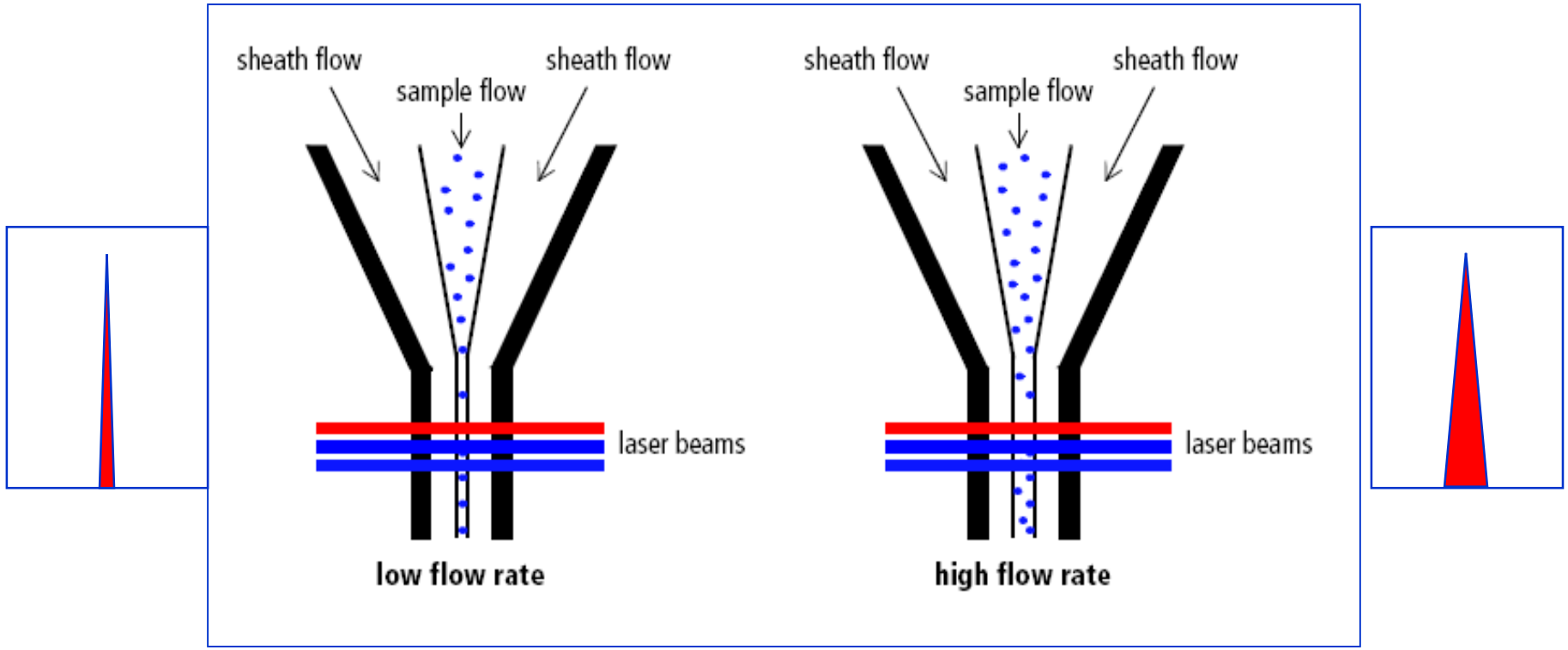
DCFH染色检测活性氧的产生（多用荧光强度表示）

11、仪器每次开机的状态都会有一些差异，每次处理的样品也会有所不同，仅有细微差别的实验要在同一次实验过程中完成。



CMF-DA标记检测细胞内酶的活性

12、检测速度

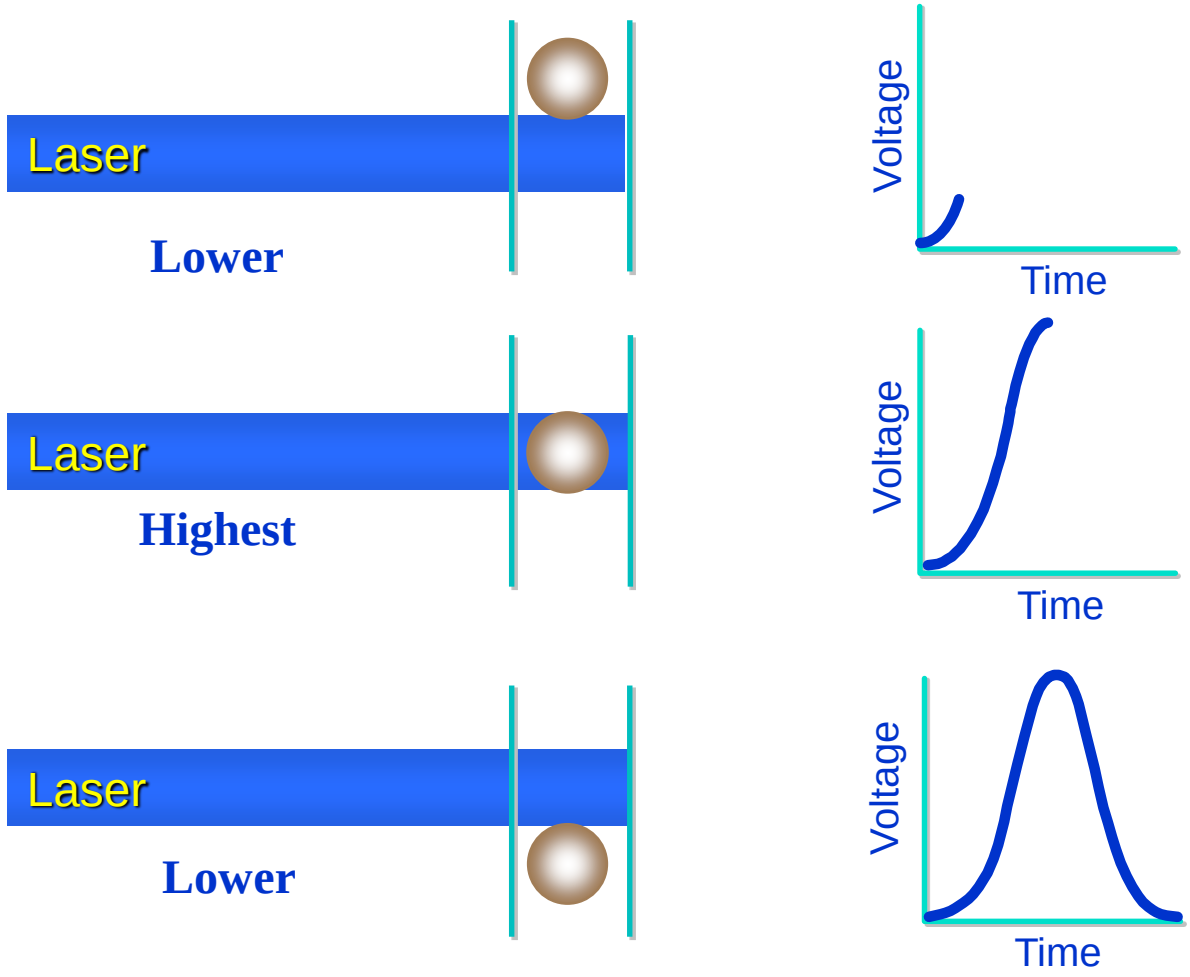


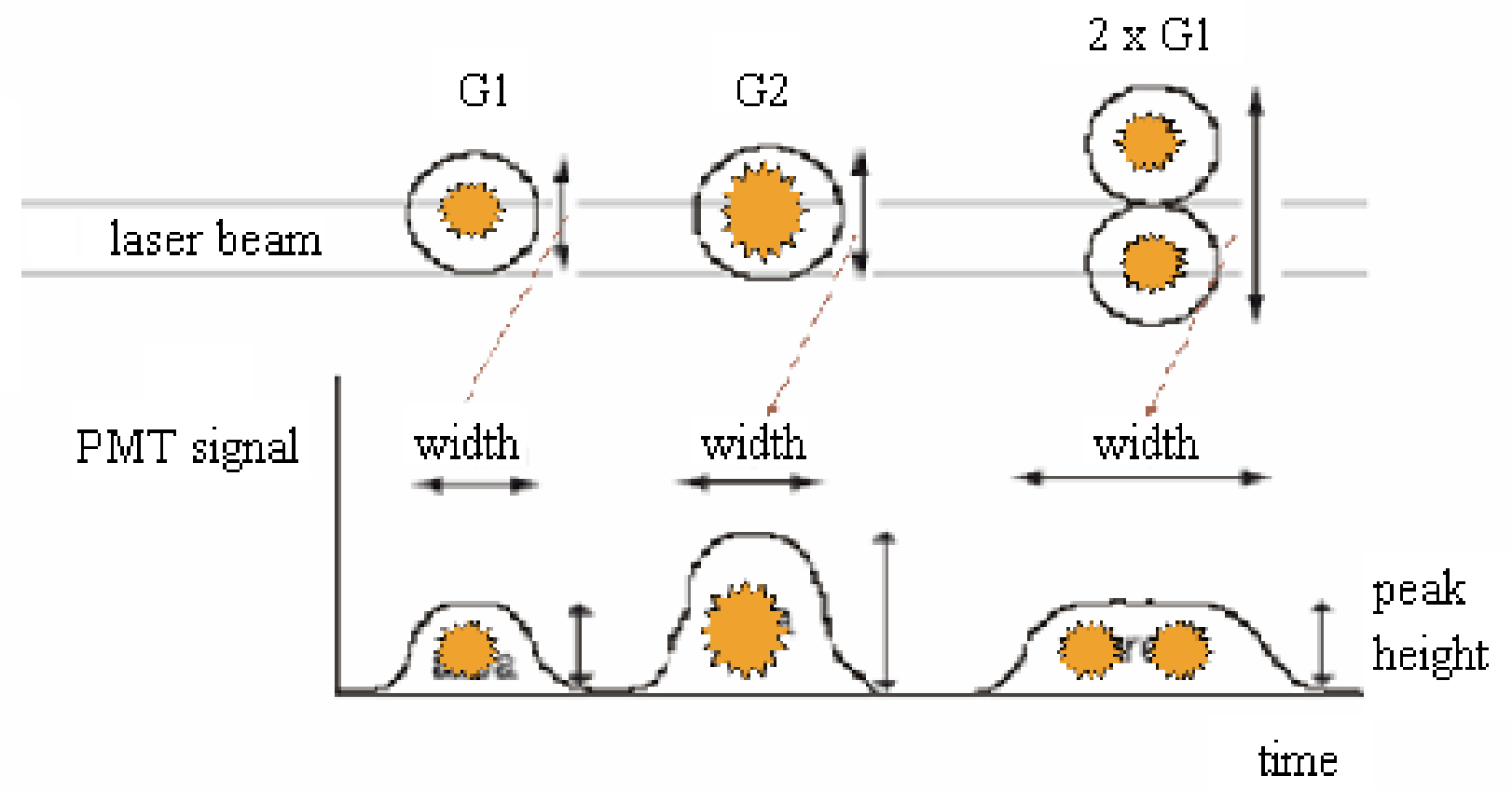
通过改变液流的直径来改变检测速度，液流流速不变。

13、样品中的细胞聚集和碎片要尽量少

- 默认为一个细胞
- 细胞聚集:荧光强度升高
- 对于细微差别的比较，结果影响较大
- DNA样品可用双联体辨别模式（DDM）区分

根据细胞通过激光照射点的时间，将光信号成比例的转变成电信号




2 x G1
G1
G2
laser beam
PMT signal
width
width
width
peak
height
time

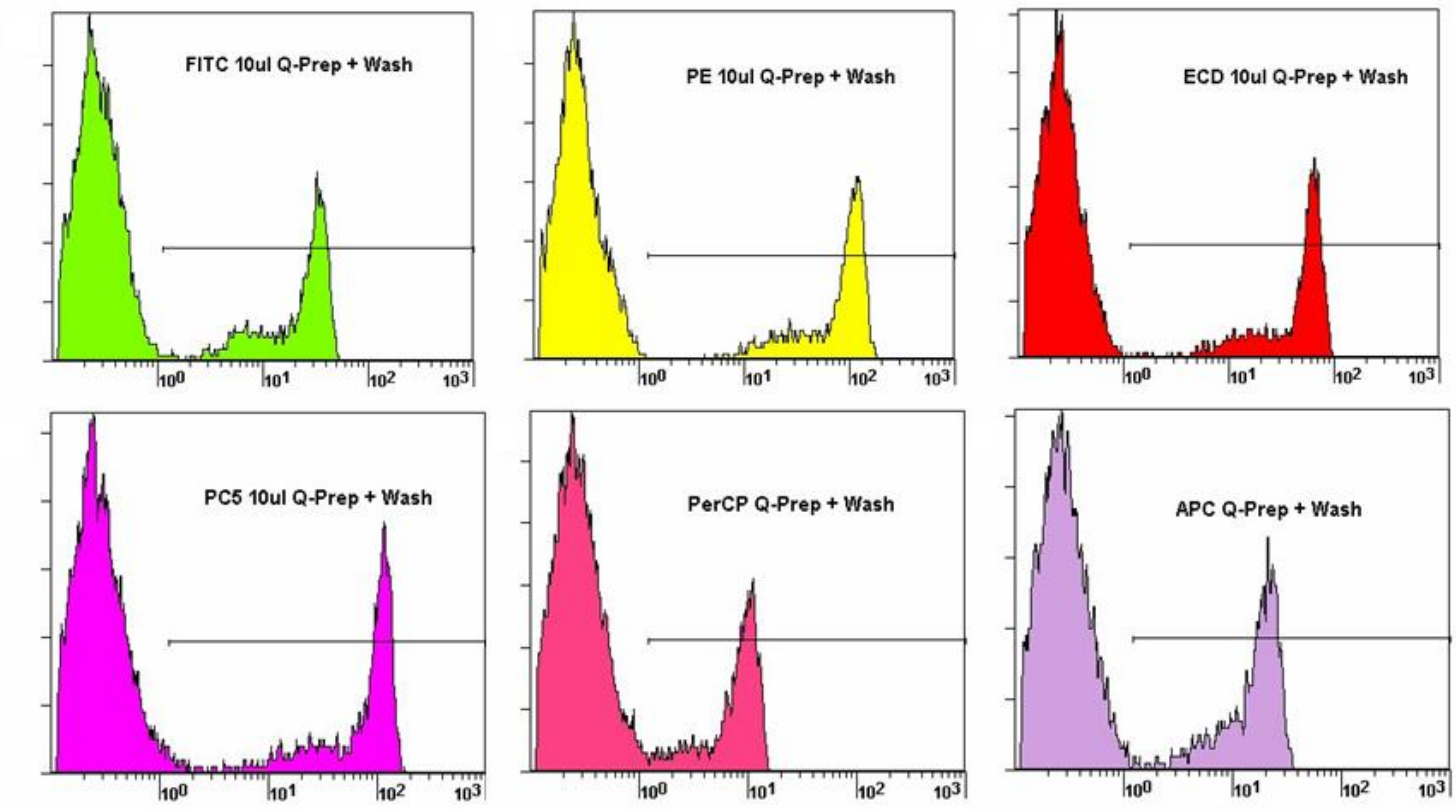
14、细胞的活性

- 抗凝剂：肝素

避免使用络合钙的抗凝剂，如ACD与EDTA，因为它们会限制钙依赖性激活过程。

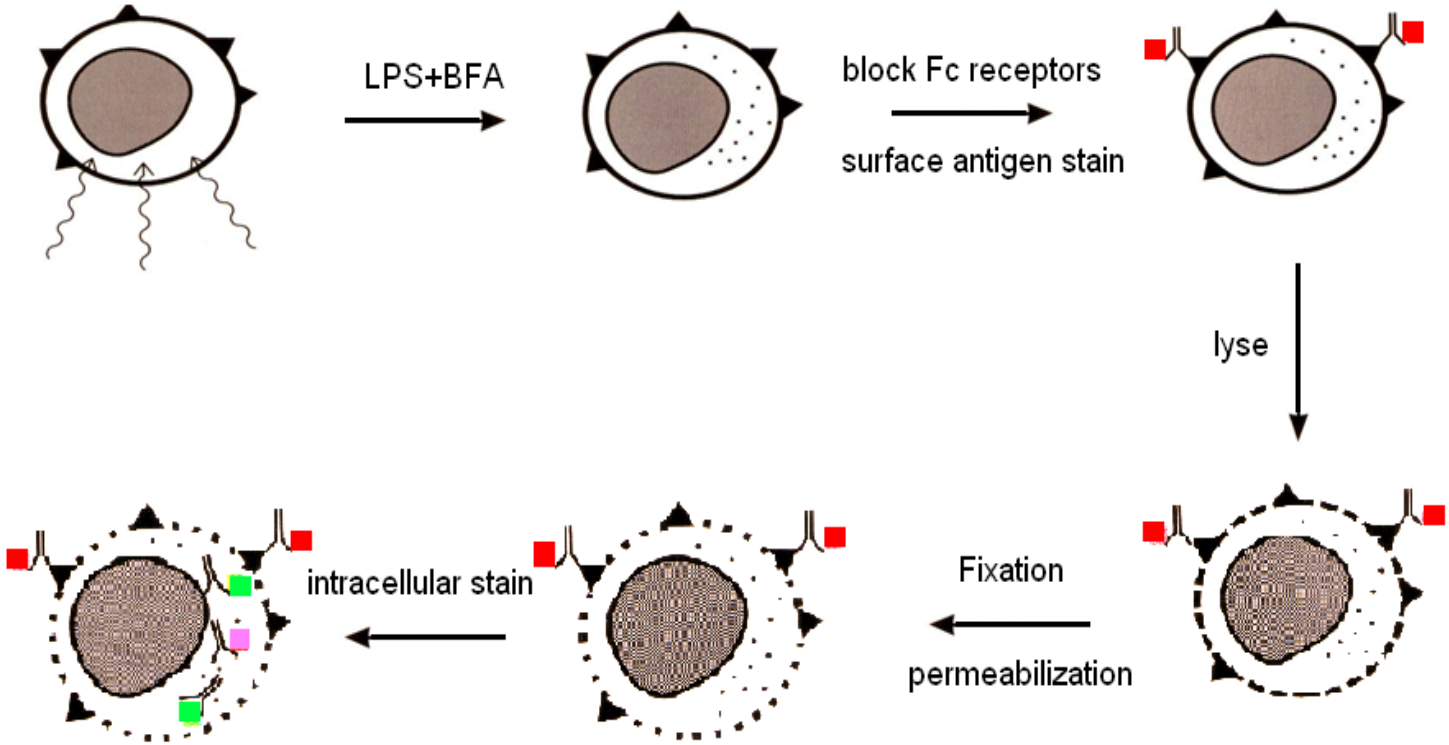
- PI排除死细胞

15、弱表达抗原常选用PE标记



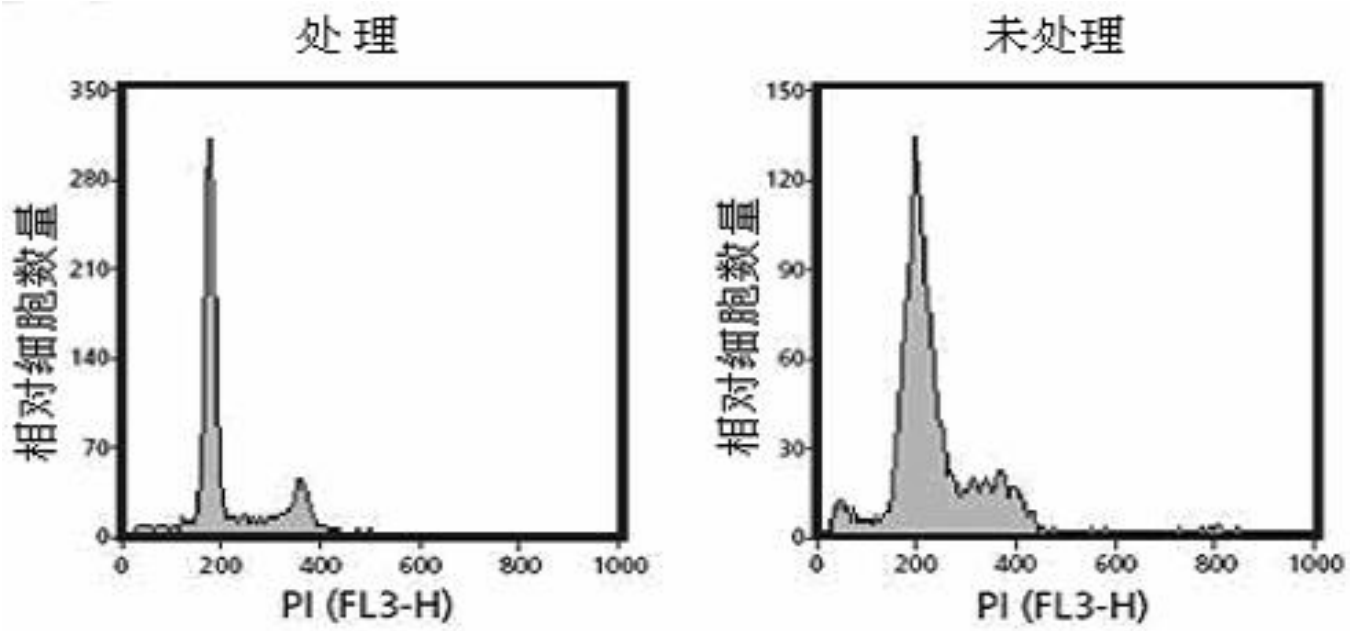
CD8: PerCP < APC < FITC < ECD < PC5 < PE

16、胞内染色


LPS+BFA
block Fc receptors
surface antigen stain
lyse
Fixation
permeabilization
intracellular stain

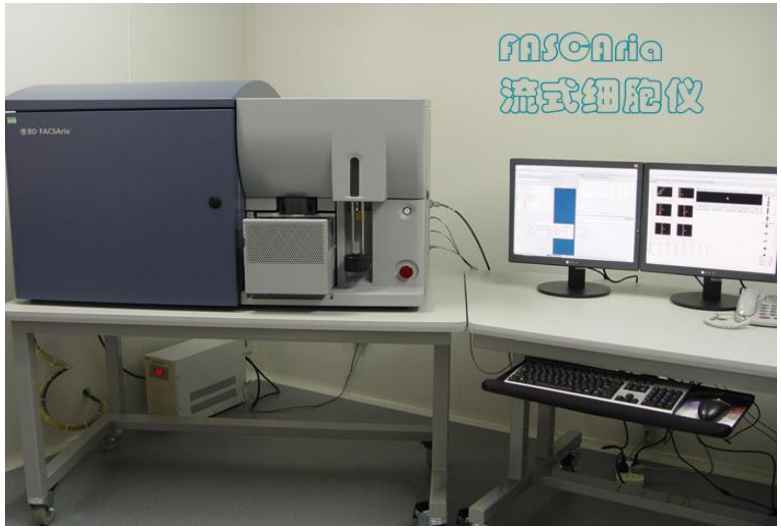
- 胞膜和胞内同时表达的抗原：分别作表面和胞浆内染色。在检测胞浆内抗原时，表面表达必须被控制或视为阴性。
- 固定破膜不能影响抗原属性或抗原抗体结合率。先固定后染色可能会使表面抗原丢失或改变。
- 固定：蛋白的交联和变性。
- 破膜：细胞膜穿孔。1％皂甙
- 同时测定表面、胞内Ag和DNA含量：膜→胞内→DNA。
- 膜抗体荧光素不被破膜剂损坏，对胞内抗体，要保证荧光素分子足够小，能进入胞内。

17、DNA分析



RNA酶处理前后的比较

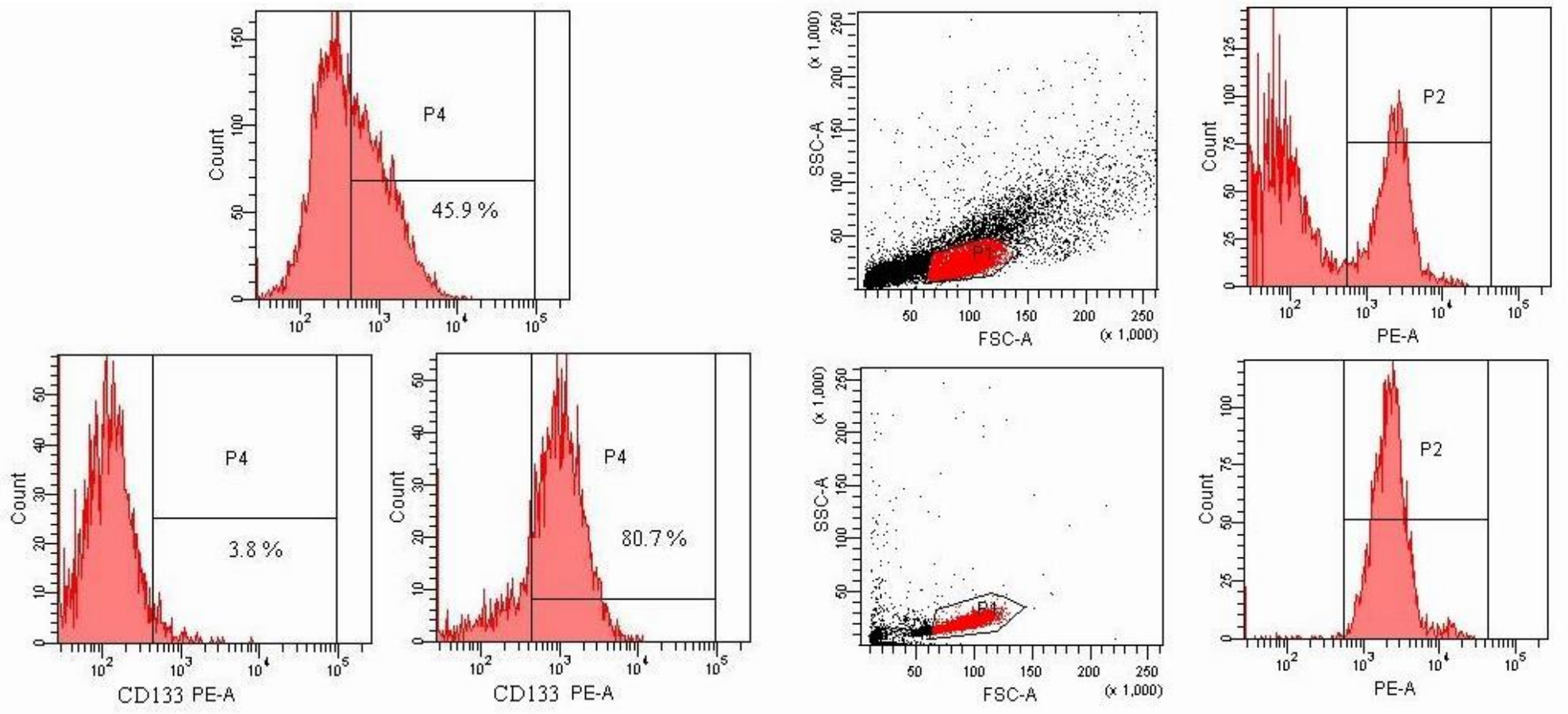
18、细胞分选



- 鞘液的高压蒸汽消毒
- 地面、桌面的清洁消毒
- 室内紫外消毒
- 仪器管道的清洗
- Accudrop beads

影响分选结果的因素

- 仪器状态
- 样品：标记抗原、洗涤、过滤
- 保持细胞活性：　小牛血清



不同的抗原标志可能会影响分选纯度

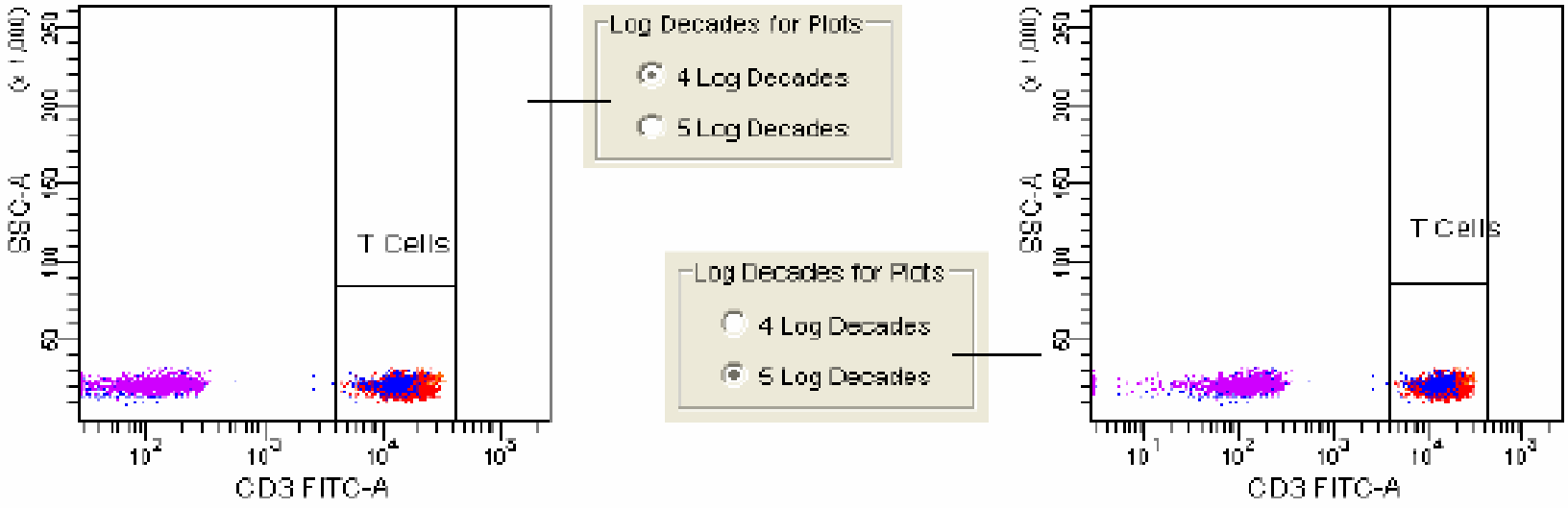
分选后的CD133+细胞多次洗涤后，荧光强度明显下降

检测过程中遇到的几个问题

- 测试目的一定要清楚，特别是代替他人测试时：比如，PI标记分析细胞周期、细胞活性或者细胞凋亡；

- 在检测未染色对照时，需要事先了解多色标记所用的荧光素组合。

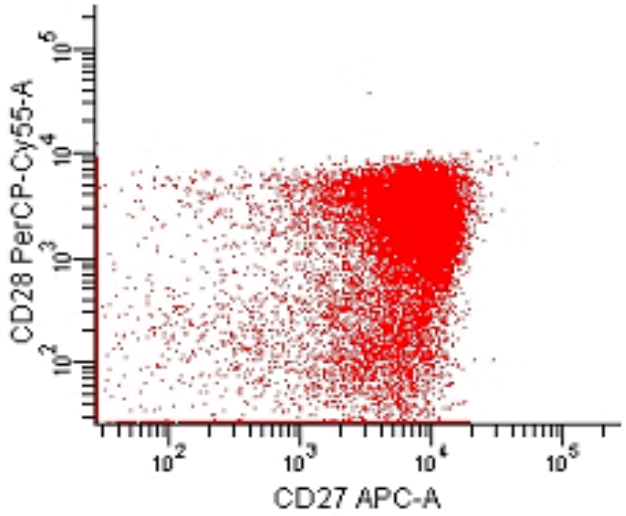
Changing Log Display



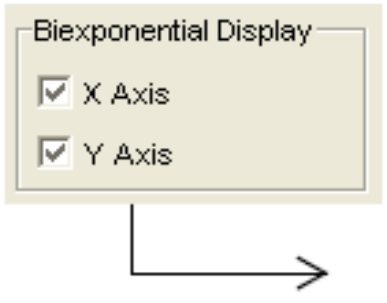
26–262,143

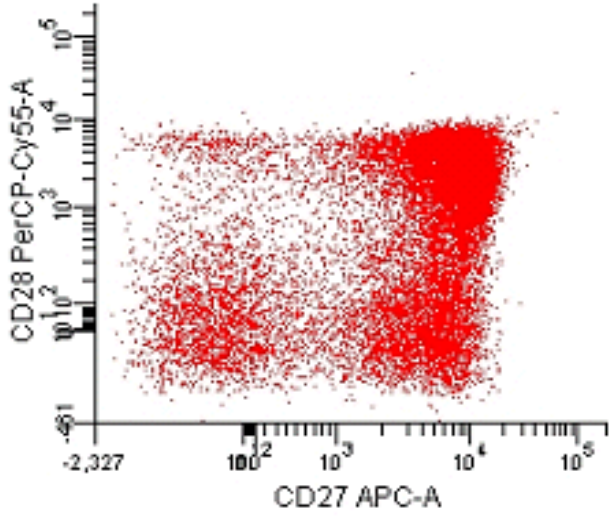
2.6–262,143

Biexponential display is used to show these events on plots and improve resolution between poorly resolved populations.

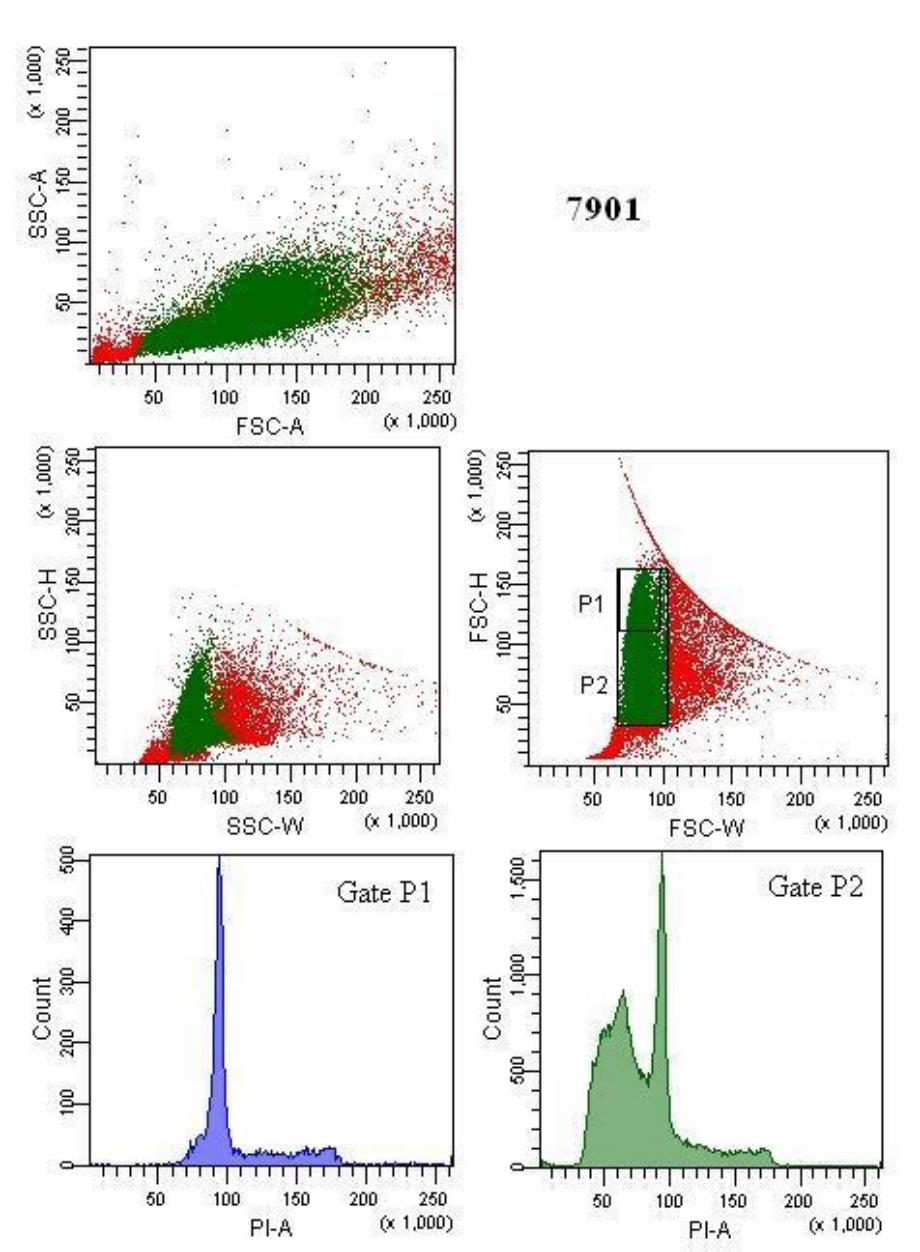


no biexponential scaling

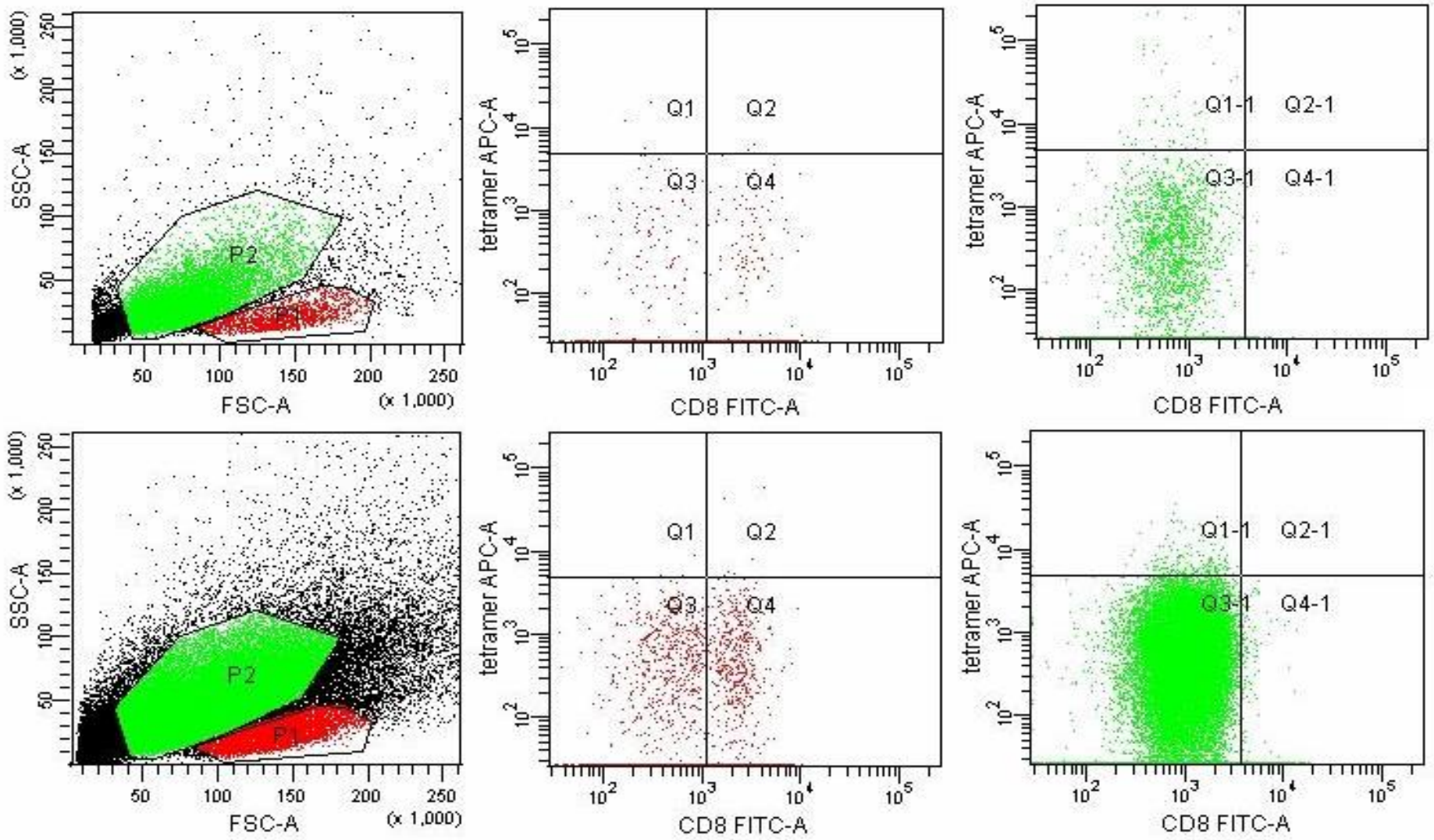


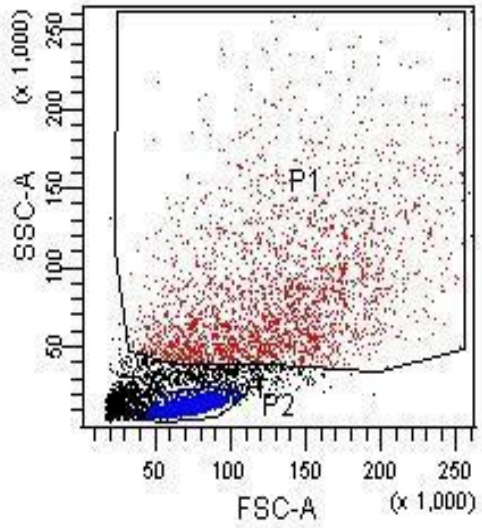


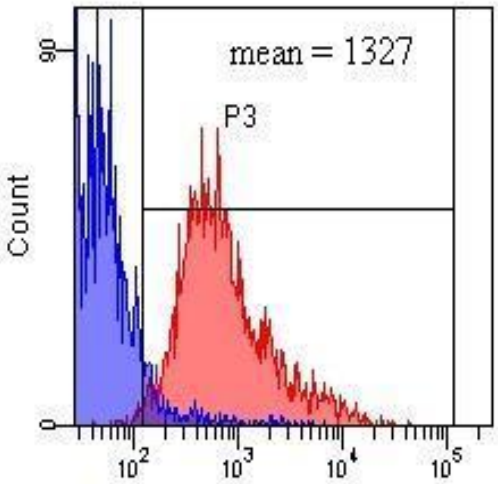
biexponential scaling: both axes

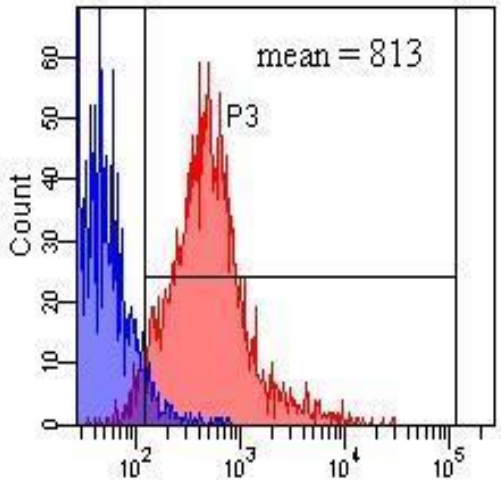

7901
SSC-A
FSC-A
(x 1,000)
SSC-H
SSC-W
FSC-H
FSC-W
P1
P2
Gate P1
Gate P2
Count
PI-A

Tetramer分析


SSC-A
(x 1,000)
FSC-A
(x 1,000)
P2
P1
tetramer APC-A
CD8 FITC-A
Q1
Q2
Q3
Q4
Q1-1
Q2-1
Q3-1
Q4-1



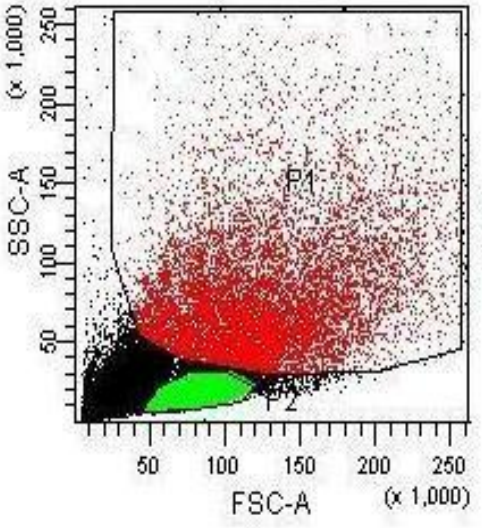




Human

P1: inmature DC

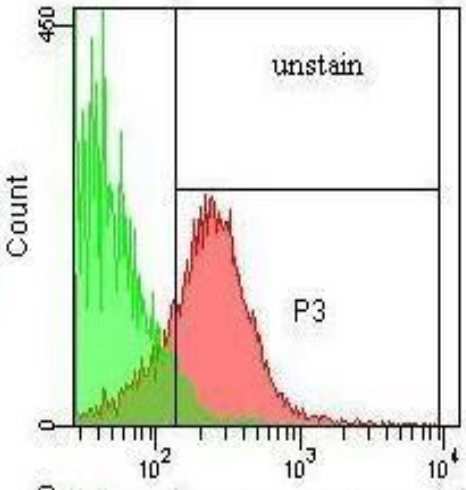
P2: lymphocytes

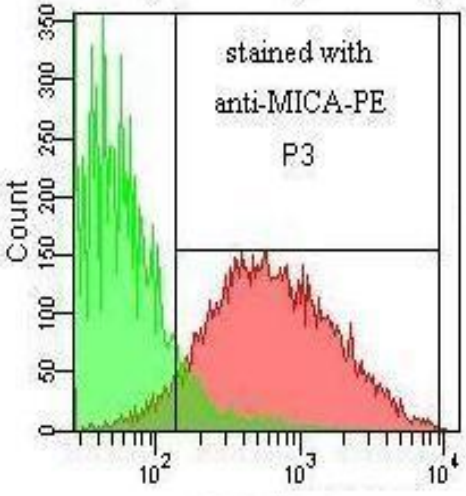


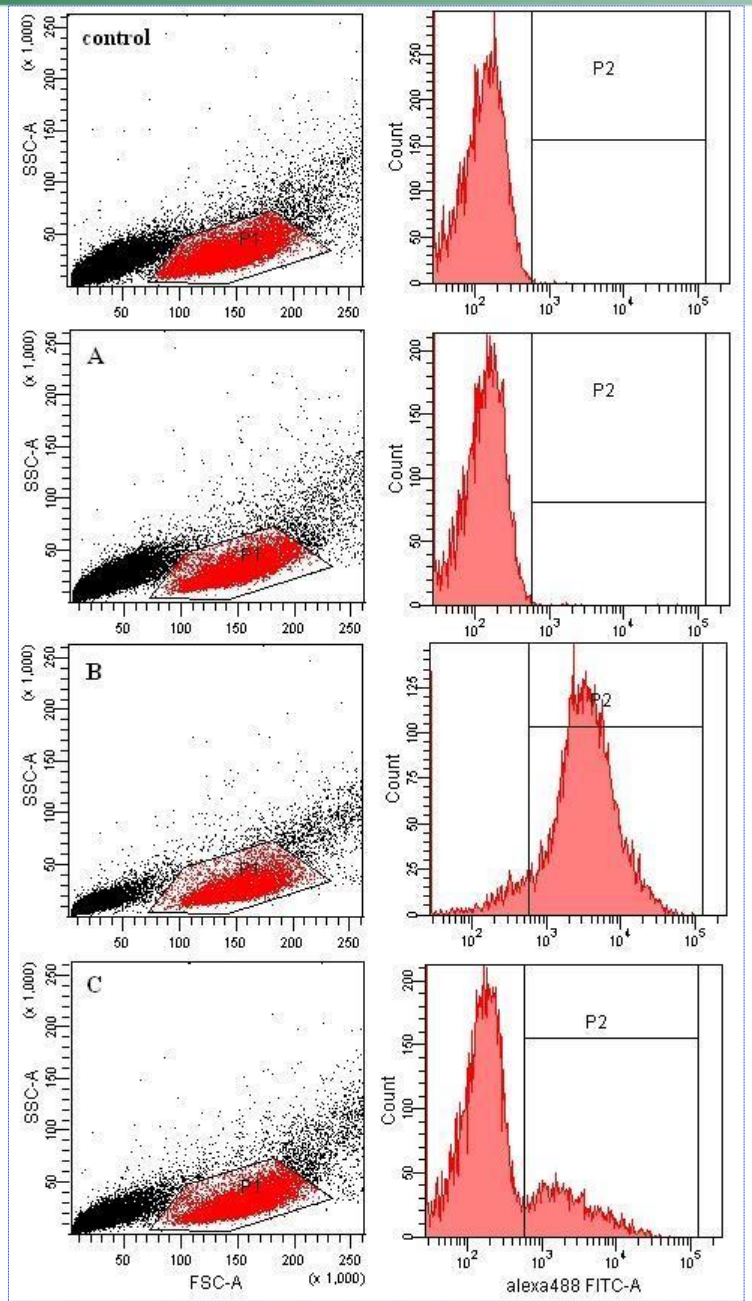
Human

P1: inmature DC

P2: lymphocytes







HLA-A2

0514 – 87979383 –213