

流式细胞技术的原理与应用

汪 艳

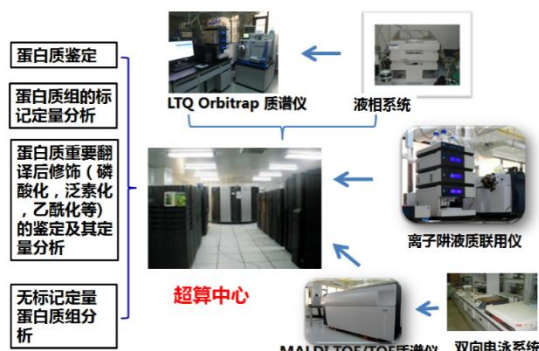


武汉生命科学大型仪器区域中心

---中国科学院水生生物研究所

中科院水生所公共技术研发与服务部 (分析测试中心)

1. 蛋白组学仪器平台



2. 光学和电子成像仪器平台



3. 化学分析和环境仪器平台



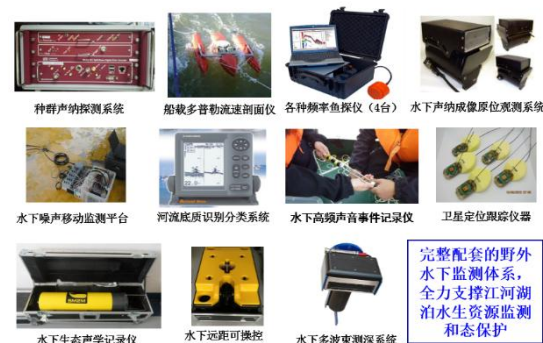
4. 细胞和分子生物学仪器平台



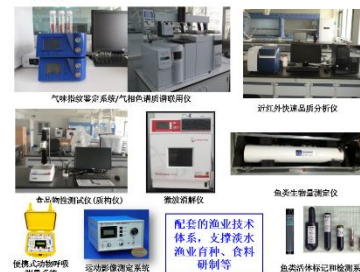
5. 基因组学仪器平台



6. 水生态和渔业资源仪器平台

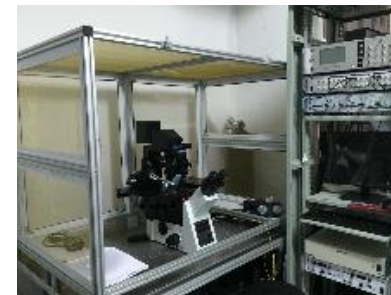


(续)



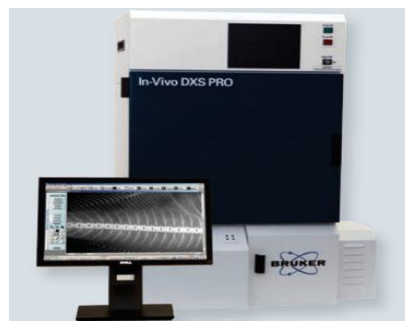
260 台套, 仪器价值1.6 亿

细胞、分子生物学技术平台



小动物活体成像系统

X光生物样本成像系统



- 
- 一、流式细胞仪发展的前景
 - 二、流式细胞仪基本原理
 - 三、如何做好流式实验？
 - 四、流式细胞术的应用与案例分享



一、流式细胞仪发展的前景

具有分选功能流式细胞仪



FACS Cablibur



FACS AriaIII



FACS Jazz



Influx



EPICS ALTRA



MoFlo-XDP
超速流式细胞分析分选系统



MoFlo Astrios EQ
超高速流式分选系统

流式细胞仪介绍（美国BD公司）



高速分选流式细胞仪（AriaIII）特点：

1. 四根激光器：488nm、375nm、633nm、561nm可检测11种荧光和2种散射光参数
2. 分析速度：至少100,000 cell/sec
3. 分选速度：70,000 cell/sec，分选纯度>99%，细胞成活率>80%



分析型流式细胞仪（Verse）特点：

1. 二根激光器（488nm、633nm）可检测6种荧光和2种散射光参数
2. 分析速度：35000细胞/秒
3. 绝对细胞计数



个人型流式细胞仪（Accuri C6）特点：

1. 二根激光器（488nm、633nm）可检测4种荧光和2种散射光参数
2. 样品获取速度： ≥ 10000 个细胞/秒
3. 绝对细胞计数
4. 操作方便，无需方案设置和仪器调节。

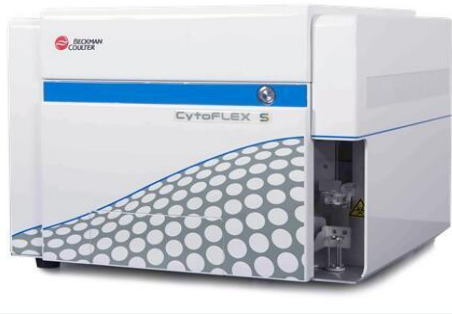
流式细胞仪（美国Beckman公司）



超速流式细选分胞系统（MoFlo-XDP）

应用：可用于植物原生质体/染色体的分选、下游细胞培养、功能测定、动物实验和RNA/DNA/蛋白提取。

1. 4根激光器，激发波长分别为：488nm、640nm、405nm、561nm
2. 分析速度：100,000 细胞/秒，分选速度：70,000个细胞/秒、
3. 分选纯度最高可达99%以上、回收率大于90%，特别是对含量极低（低于1‰）的细胞亚群有很好的分选效果
4. 支持二路、四路分选，支持12x75mm管，15ml管和微量管；单克隆细胞分选装置：可以使用载玻片，微孔板（6孔板，24孔板，48孔板，96孔板，384孔板）



流式细胞仪（CytoFlex S）小型分析型

1. 配置4根激光器，波长分别405nm, 488nm, 561nm, 638nm；可检测13种荧光和2种散射光参数
2. 前向角散射光SSC最低检测300 nm的颗粒；侧向角散射光VSSC最低检测200 nm的颗粒；
3. 检测速度：达到30000events/s；
4. 绝对细胞计数：无需借助绝对计数管可实现绝对计数；
5. 上样系统：可用12 x 75-mm的流式管和1.5ml、2ml的EP管上样；并配备自动化96孔板上样系统；

质谱流式细胞仪

---开启流式细胞技术的“后荧光时代”

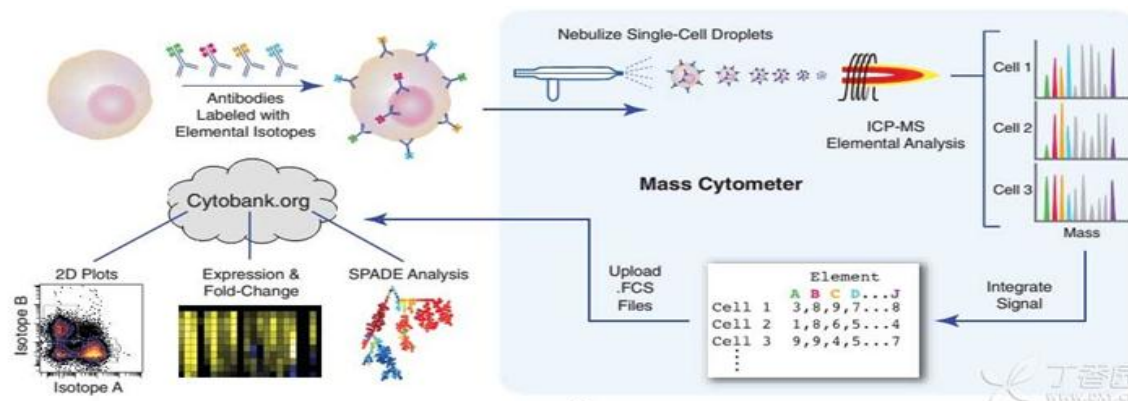
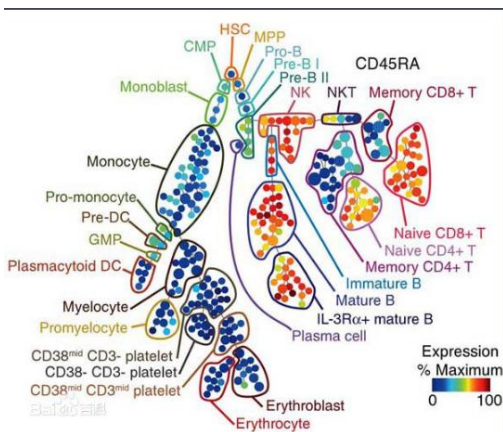


质谱流式细胞技术（Mass Cytometry）是利用质谱原理对单细胞进行多参数检测的流式技术。它继承了传统流式细胞仪的高速分析的特点，又具有质谱检测的高分辨能力，是流式细胞技术一个新的发展方向。

使用金属元素作为流式抗体的标签，ICP质谱装置作为检测手段。在检测通道数量和信号质量有质飞跃。实现细胞表型更精准的观察和分类，细胞内信号传导网络全面的分析

解决荧光补偿问题-无串色

传统的流式技术主要基于对荧光发射光谱的检测，但是荧光基团发射光谱一般比较宽，其间往往会发生重叠。一方面限制了检测通道的数量（<20个）；另一方面，它会带来严重的串色问题，很多通道的信号需要复杂的补偿计算。



人骨髓细胞的精细免疫分型

多维全景流式细胞仪（量化成像分析流式细胞仪）

传统的流式细胞术基础之上，结合了荧光显微成像技术，它具有多个检测通道，可以对通过流动室中的每个细胞进行成像，实现了对细胞图像进行多参数量化分析，获得全新的细胞形态统计学数据。

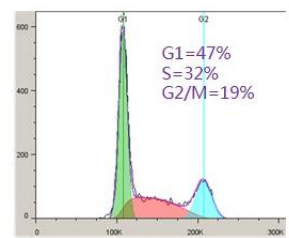


图 1. 传统流式细胞仪的细胞周期分布图



图 2. 成像流式细胞仪可以根据 M 期细胞的前期、中期、后期和末期的形态不同对细胞进行区分并计算其比例

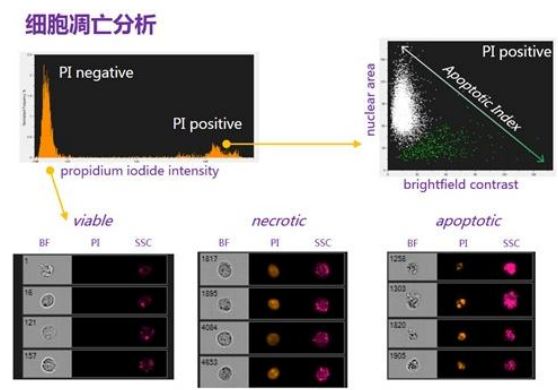


图 3. 成像流式细胞仪根据 PI 染色即可区分活细胞、坏死细胞和凋亡细胞。



微流控流式细胞仪

SONY

分选原来如此简单

SH800S Flow Cell Sorter

创新微流体芯片技术

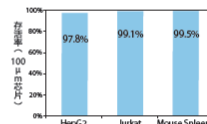
新一代智能化全自动流式细胞分选仪



细胞分选是一个复杂的流程，包括样本制备、加压进样、注入流动室、激光激发、信号接收、加电振荡、液滴形成、延迟计算、侧液流校正等，其中每一个步骤都直接关乎最终分选结果的优劣。传统流式细胞分选平台，上述参数设置及仪器调试很大程度上依赖于操作者的经验，这既限制了流式细胞分选技术的广泛应用，又不可避免的由于主观因素造成分选结果的差异。除了分选纯度（Purity），分选细胞存活率（Viability）与活性（Vitality）是至关重要的性能指标。最完美的分选性能，无疑来自于从气压、电压、液流速度、振荡频率、到液流落点及角度等的最完美的设计，SH800S恰恰是关注了每一个细节，为研究者提供了细胞分选的不二之选。

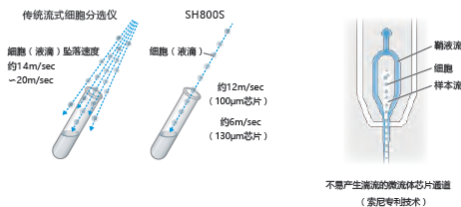
■ 专利化设计实现高活性分选

细胞的活性关乎着分选的成败，而其中影响活性的因素包括有：细胞（液滴）坠落速度、细胞（液滴）进入收集装置中央部位的精准度以及液流的剪切力等。传统的流式细胞仪细胞（液滴）坠落速度过快、细胞（液滴）进入收集装置中央部位的精准度偏差较大以及液流的剪切力过大，这些因素都大大降低了分选后细胞的活性。智能化的SH800S因专利的分选芯片与喷嘴一体化设计降低了细胞（液滴）的坠落速度，减小了液流剪切力，同时由于CoreFinder™技术的应用使得分选细胞（液滴）精准定位于分选装置中心位置，从而最大程度上了保证了分选细胞的活性。



SH800S高存活率的三大原因

	传统流式细胞分选仪	SH800S		
	100μm喷嘴	100μm芯片	130μm芯片	索尼的创新技术
1. 细胞（液滴）进入收集装置中央的精准度	低	高	高	CoreFinder™技术保证细胞（液滴）精准定位分选于收集装置的中心位置
2. 细胞（液滴）坠落速度	大 (14m/sec~20m/sec)	小 (12m/sec)	定更小 (6m/sec)	索尼采用专利的微流体芯片技术，细胞（液滴）坠落时速度较慢，离液流受到的冲击力较小。
3. 液流剪切力	大	小	小	高精度加工确保了极为光滑的液流通道，杜绝了湍流的产生，最大程度减小了液流剪切力



Easy To Use — 操作简便

SH800S搭载了创新的分选芯片技术，配合索尼的“蓝光”技术，完全摒弃了传统流式细胞分选仪的繁杂的人工调试流程，使得所有复杂的调试过程全部由仪器在15分钟内自动完成。

分选芯片的插入如图所示，如同插入一张DVD光碟。



分选芯片自动装载

Advanced Sorting — 创新的分选技术

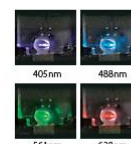
SH800S平台支持12 x 75mm的试管进行细胞分选收集，同时也可选配各种规格的微孔板作为收集装置，支持单细胞分选，从而将纯化的细胞用于进一步的生物学研究。



96孔板

Flexible Design — 灵活的设计

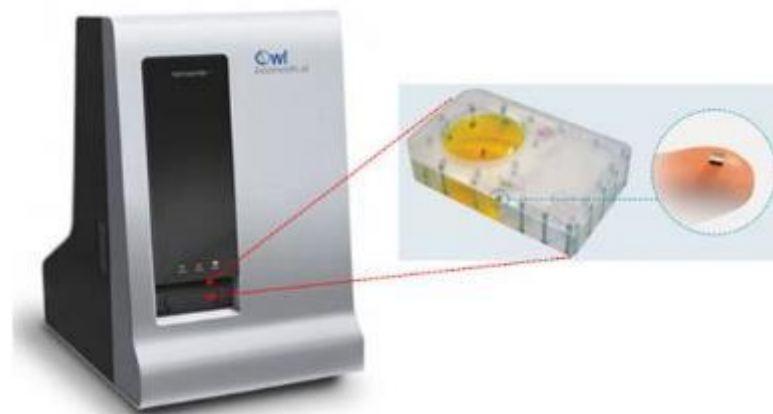
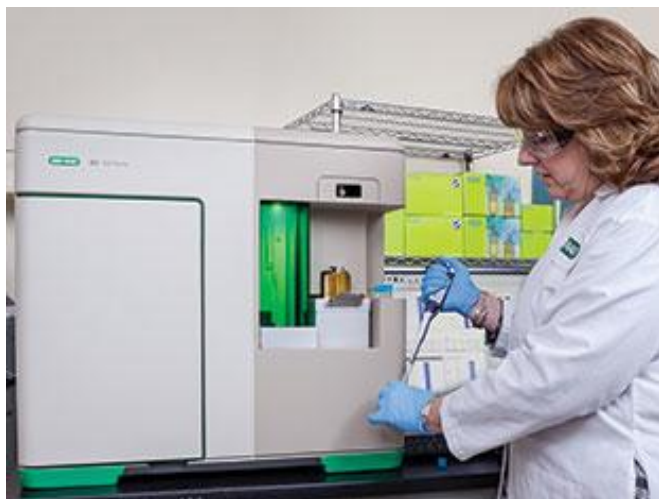
灵活的光路设计为研究者配备4根激光器（激发波长分别为488nm、405nm、561nm和638nm）和6个荧光检测器。基于不同的滤光片选择，6个独立的PMT实现了从单个或多个激光器激发的6色荧光信号检测。



SH800S为实验者提供不同规格尺寸的分选芯片（70μm、100μm、130μm），操作者可根据待测细胞的类型及大小而选择不同的分选芯片。相比传统流式细胞分选仪，SH800S搭载可更换的分选芯片使得完全无菌洁净的分选成为可能。

流式细胞分选仪发展趋势

- 流式细胞分选仪小型化
- 流式细胞分选仪简单易学化
- 流式细胞分选仪普及化

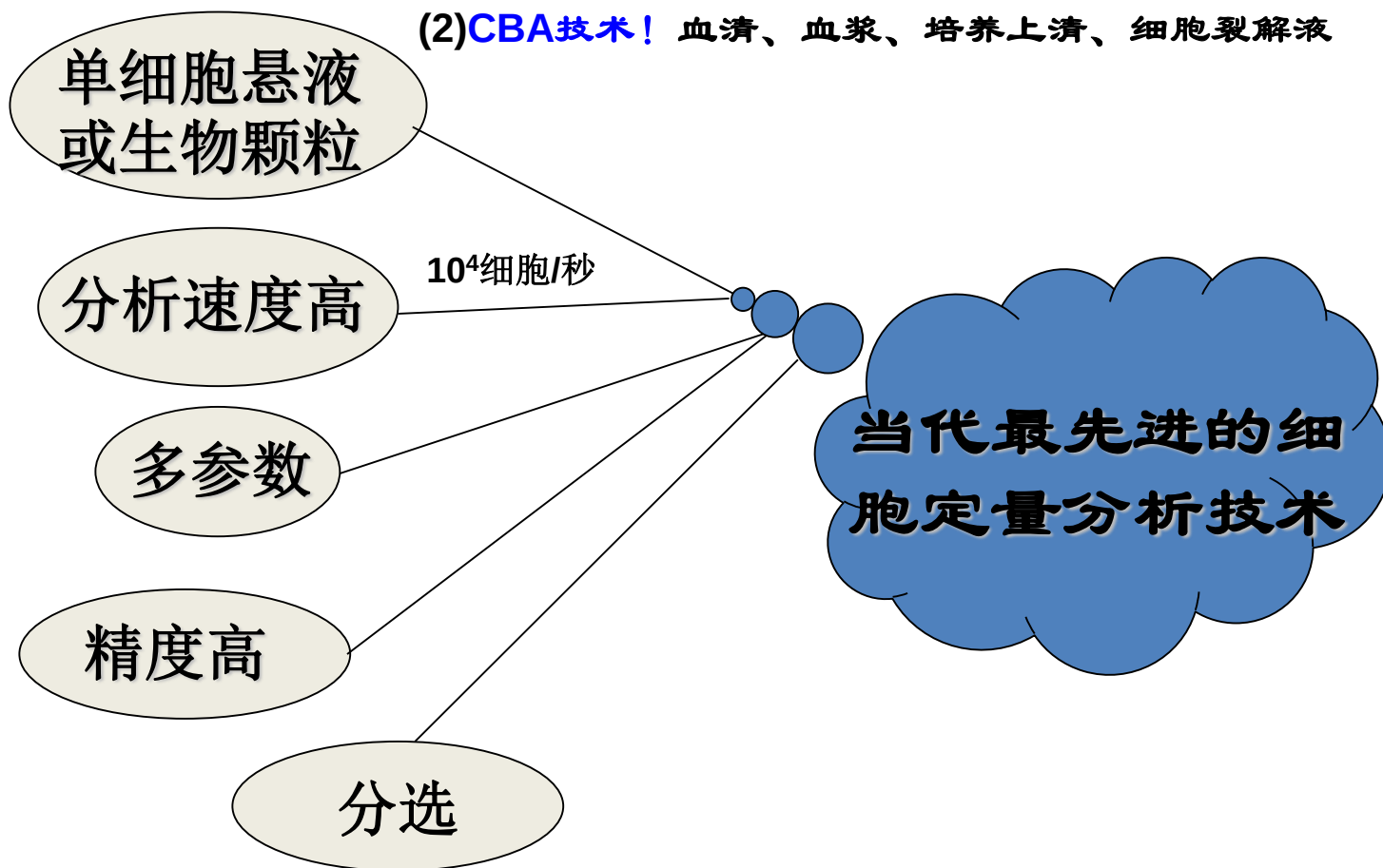


MACSQuant® Tyto采用全封闭的无鞘液设计，全部液流系统位于一个样本盒中，样本盒中最关键的部件是一个**微芯片控制的阀门**，通过阀门的开合控制细胞的分选。该样本盒采用卡槽式的设计，不同的细胞样本可以更换样本盒，避免样本间交叉污染的风险，而且全封闭的设计保证细胞处于无菌状态。

流式细胞仪特点

(1)外周血，骨髓，细针穿刺，洗脱液，实体组织，培养细胞

(2)**CBA技术!** 血清、血浆、培养上清、细胞裂解液





二、流式细胞仪基本原理



What Is Flow Cytometry?

- **Flow ~ cells in motion**
- **Cyto ~ cell**
- **Metry ~ measure**
- **Measuring properties of cells while
in a fluid stream**

流式细胞术 (FLOW CYTOMETRY)

流式细胞仪 (Flow Cytometer, FCM) 是一种集激光技术、电子物理技术、光电测量技术、电子计算机以及细胞荧光化学技术、单克隆抗体技术为一体的新型高科技仪器。

流式细胞术 (Flow Cytometry) 是对于处在快速直线流动状态中标记荧光和染料的细胞或生物颗粒进行多参数、快速、高通量的定量分析和分选的技术。

流式细胞仪的结构

流路

- 流动室
- 鞘液SHEATH
- 样本流SAMPLE 单细胞悬液 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个/ml

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

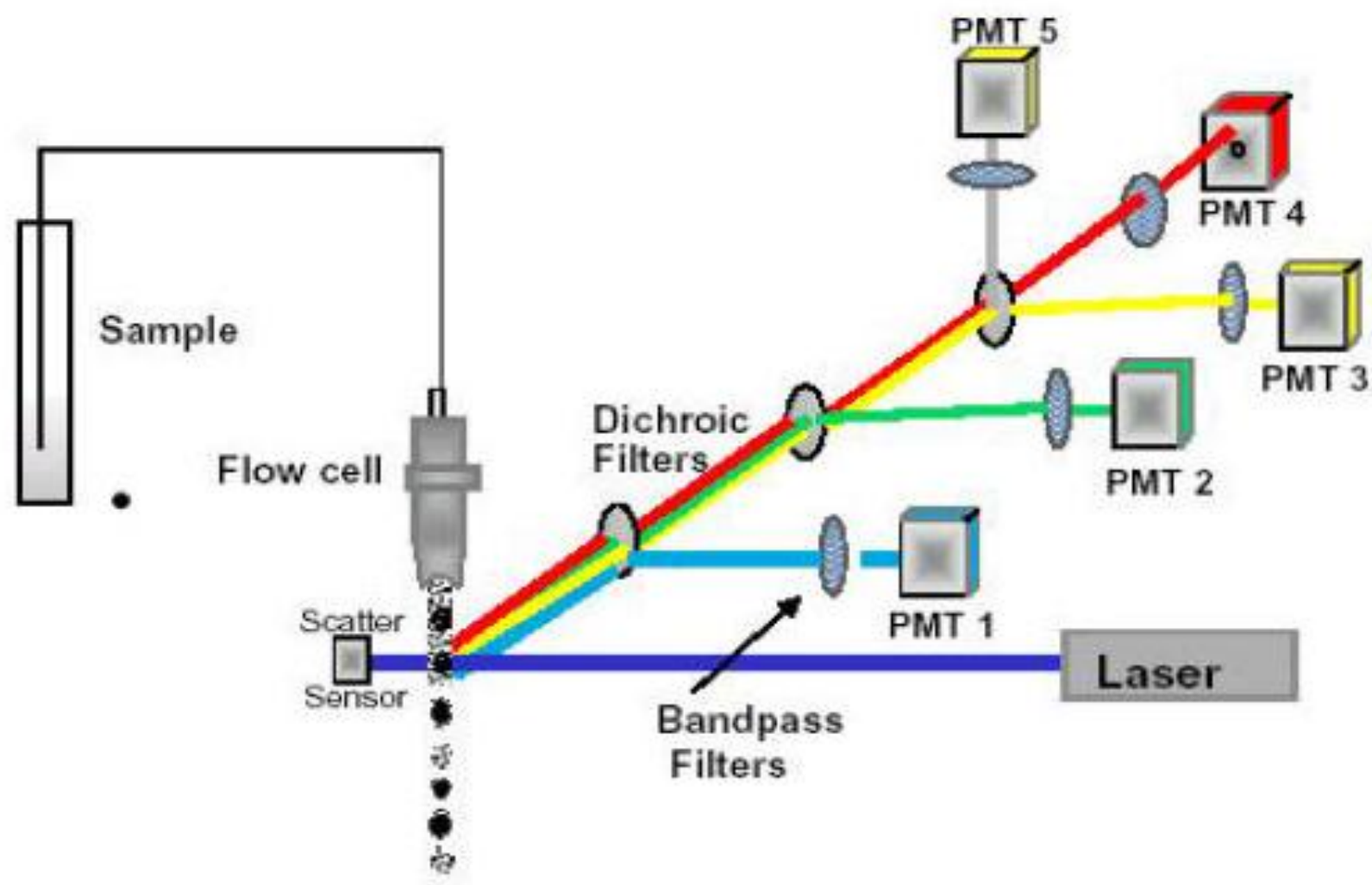
统计

- * 计算机

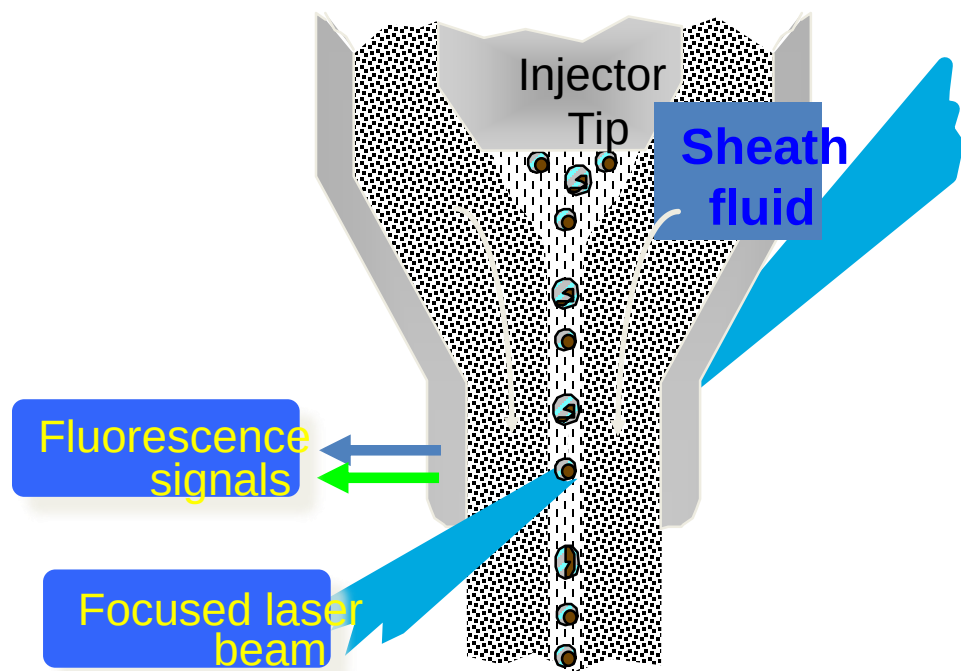
分选

- * 超声压电晶体
高压偏转板

流式细胞仪原理及构造



流式细胞仪流动室



- 单细胞悬液
- 大多数仪器是在**50-300 μm** 大小的孔径中,将细胞悬液注射进入鞘液中
- 这一过程,成为流体力学聚焦

光 路

光源：激光相干光源
(水冷氩离子激光)

检测信号：
散射光信号

前向角散射光(Forward Scatter, FS)：细胞大小

侧向角散射光(Side Scatter, SS)：细胞颗粒性(90度散射光)

荧光信号：

荧光染料/荧光探针 光学滤片

FL2 – FITC *fluorescein isothiocyanate*(异硫氰酸)

FL3 – PE *phycoerythrin (RD1)*(藻红蛋白)

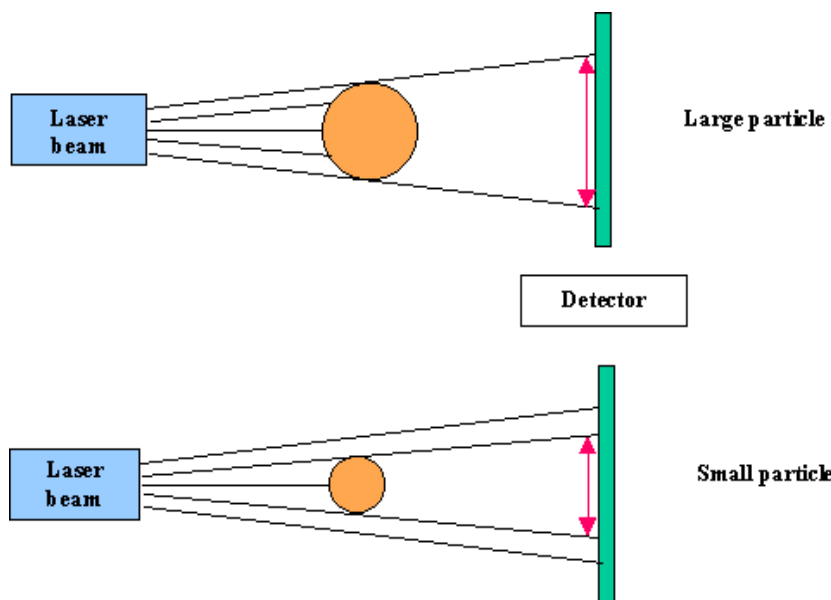
FL4 – ECD *energy coupled dye*(藻红蛋白-德州红)

FL4 – PI *propidium iodide*(碘化丙啶)

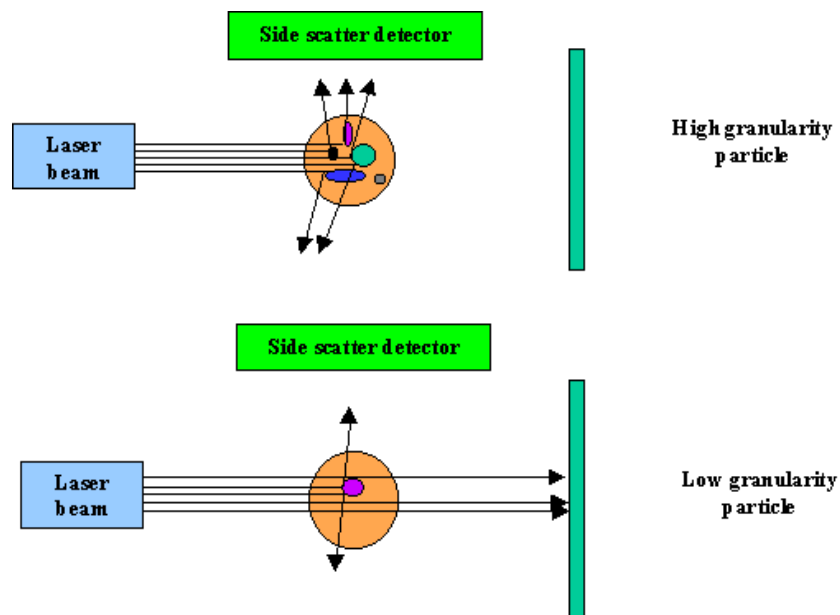
FL5– PC5 *phycoerythrin cyanin 5 (PeCy5)*(藻红蛋白-花青苷5)

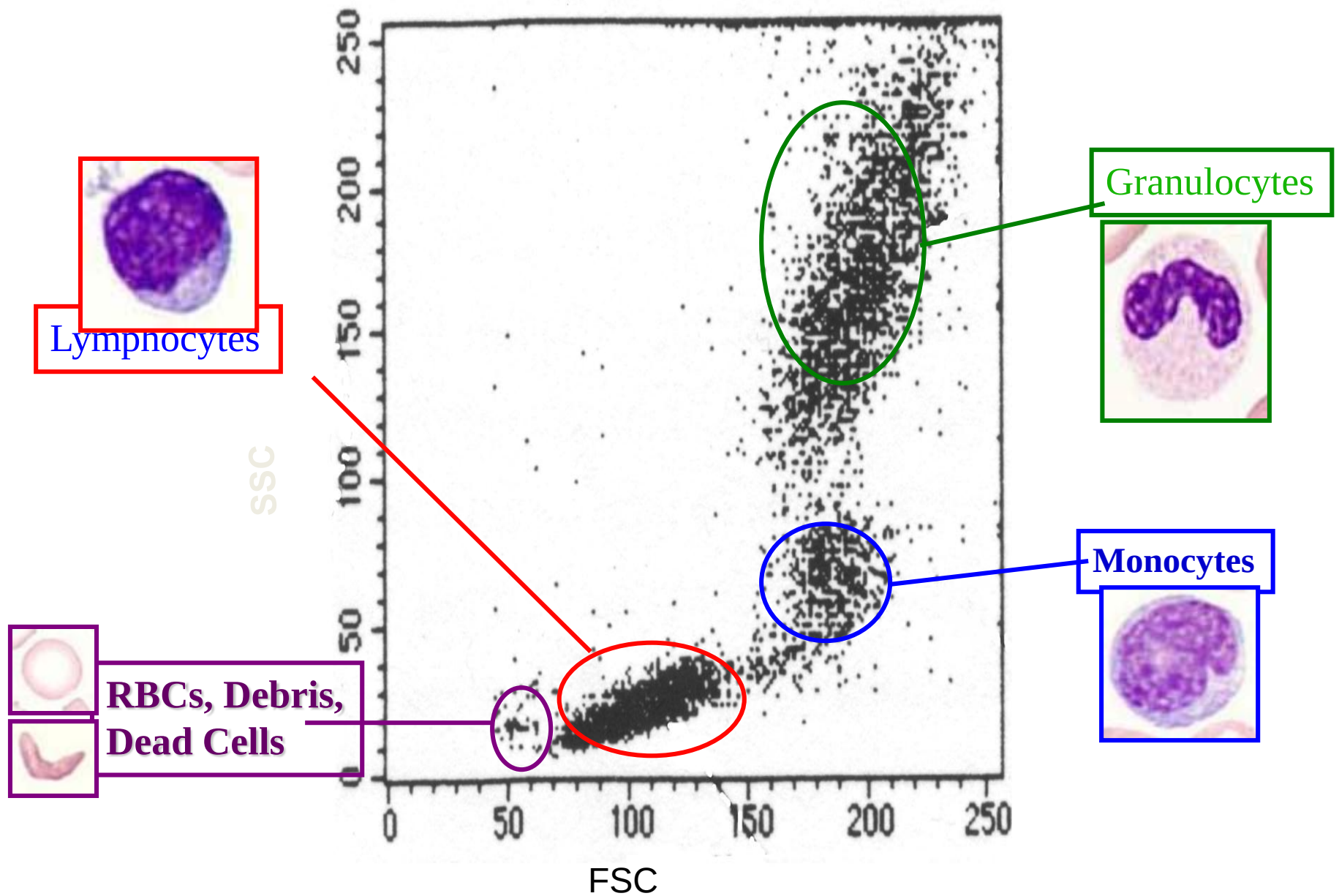
散射光信号 —— 细胞大小及颗粒性

FS



SS





检测信号

散射光信号

■ 前向角散射光(Forward Scatter, FS): 细胞大小

侧向角散射光(Side Scatter, SS): 细胞颗粒性(90度散射光)

荧光信号:

■ 荧光染料/荧光探针 光学滤片

FL2 – FITC fluorescein isothiocyanate(异硫氰酸)

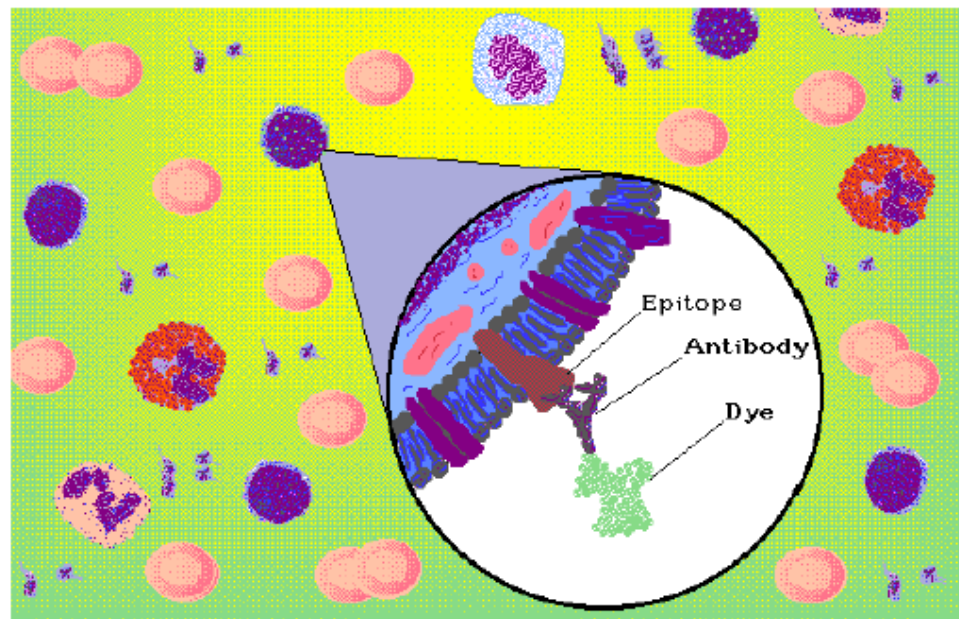
FL3 – PE phycoerythrin (RD1)(藻红蛋白)

FL4 – ECD energy coupled dye(藻红蛋白-德州红)

FL4 – PI propidium iodide(碘化丙啶)

FL5– PC5 phycoerythrin cyanin 5 (PeCy5)(藻红蛋白-花青苷5)

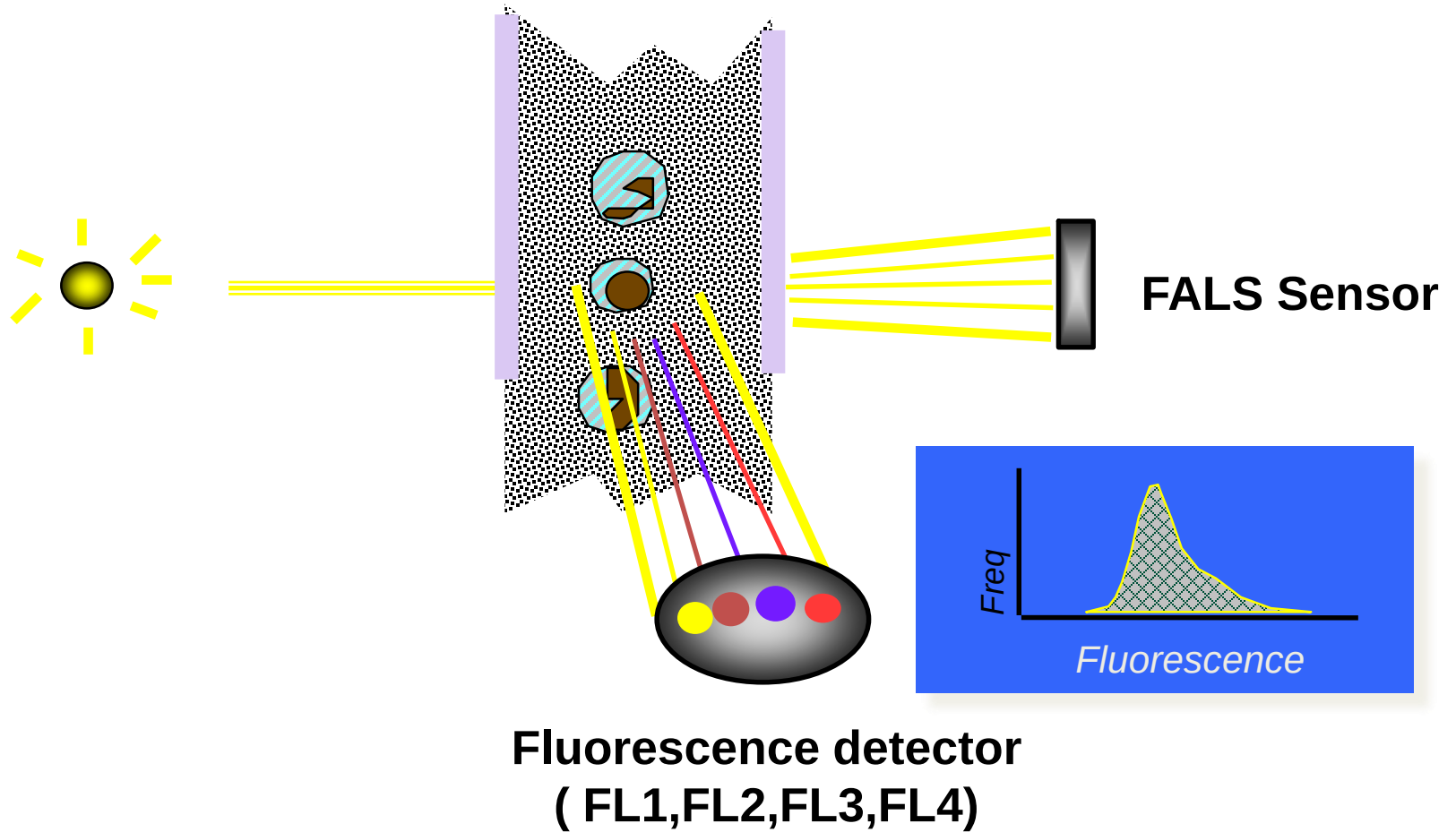
荧光信号



原理：

细胞表面的抗原(或细胞膜受体)与相关的荧光抗体结合，形成带有荧光的抗原抗体复合物。

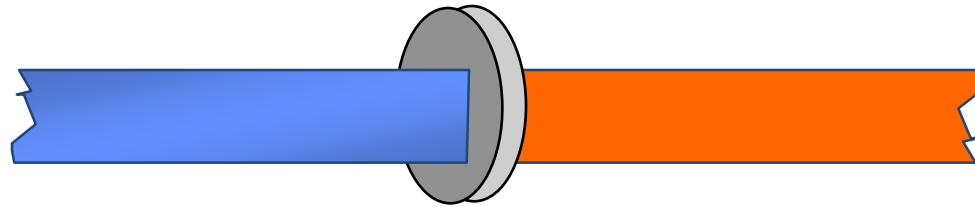
通过流式细胞仪测定其荧光量，即可得到细胞群的不同抗原位点表达情况。



光路—滤片特性

White Light Source

630 nm BandPass Filter



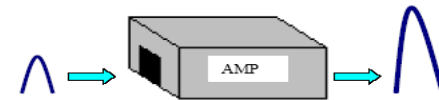
- 长通滤片 (**long-pass filter, LP**) - 允许长于设定波长的光通过
- 短通滤片 (**short-pass filter, SP**) - 允许短于设定波长的光通过
- 带通滤片 (**band-pass filter, BP**) - 允许一定带宽的波长通过
- 当以 **45°** 角放置滤片时,该滤片可以通过一定波长的光,同时也可以阻断并折射该波长以下的光, 这种方式的滤片称为二向色性滤片 (**dichroic filter, DF**)

信号放大及阈值

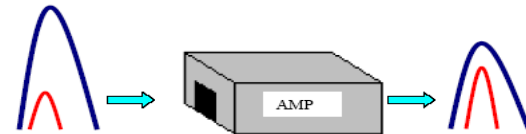
- 信号放大方式

- 线性放大 Lin : 散射光信号 FS、SS, 检测细胞DNA含量、RNA含量、总蛋白质含量
- 对数放大 Log 荧光信号 (FL1, FL2, FL3, FL4), 细胞膜表面抗原检测

线性放大(Lin):



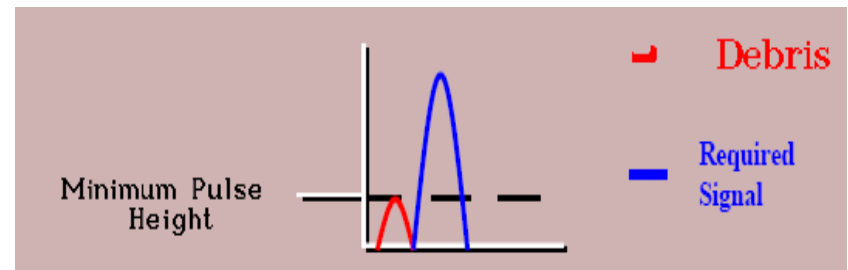
对数放大(Log)



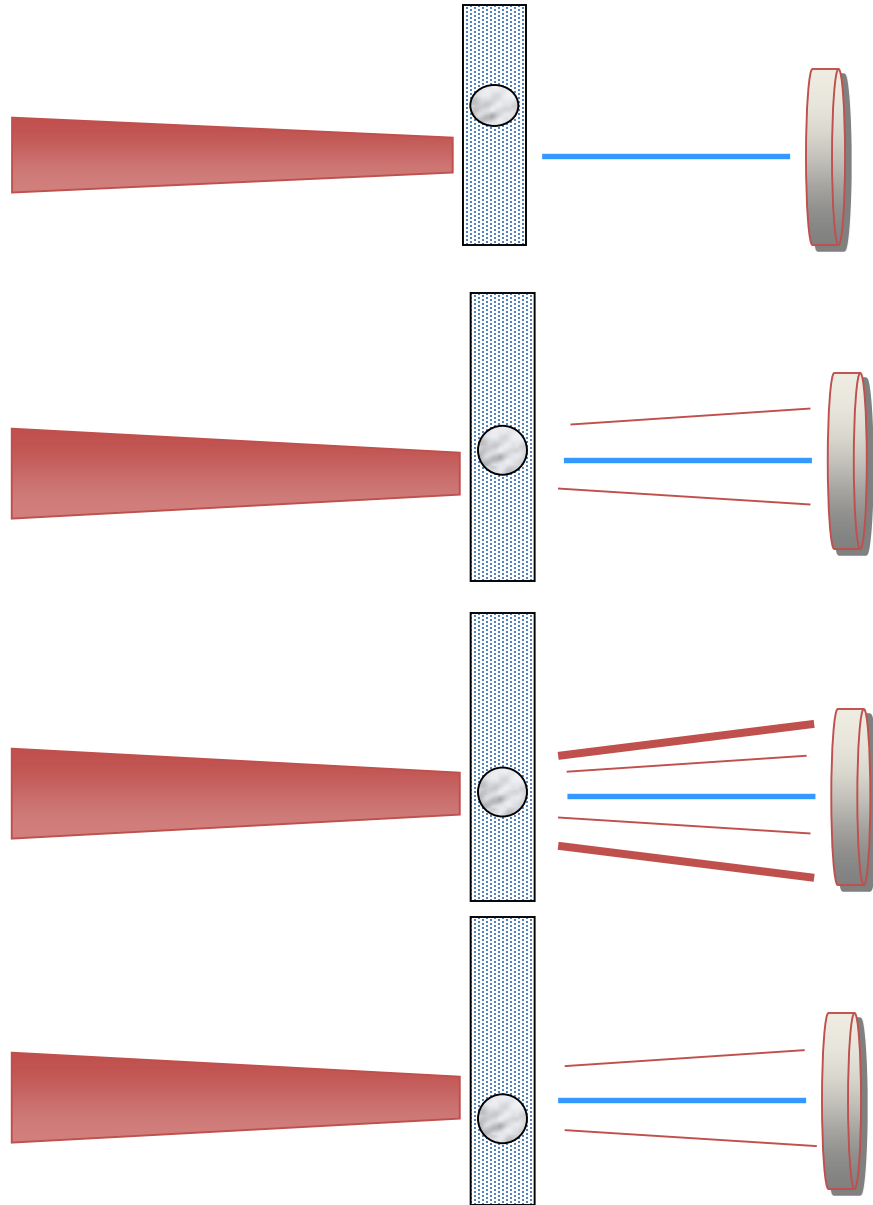
- 阈值 (去噪声干扰)

-FS = 100

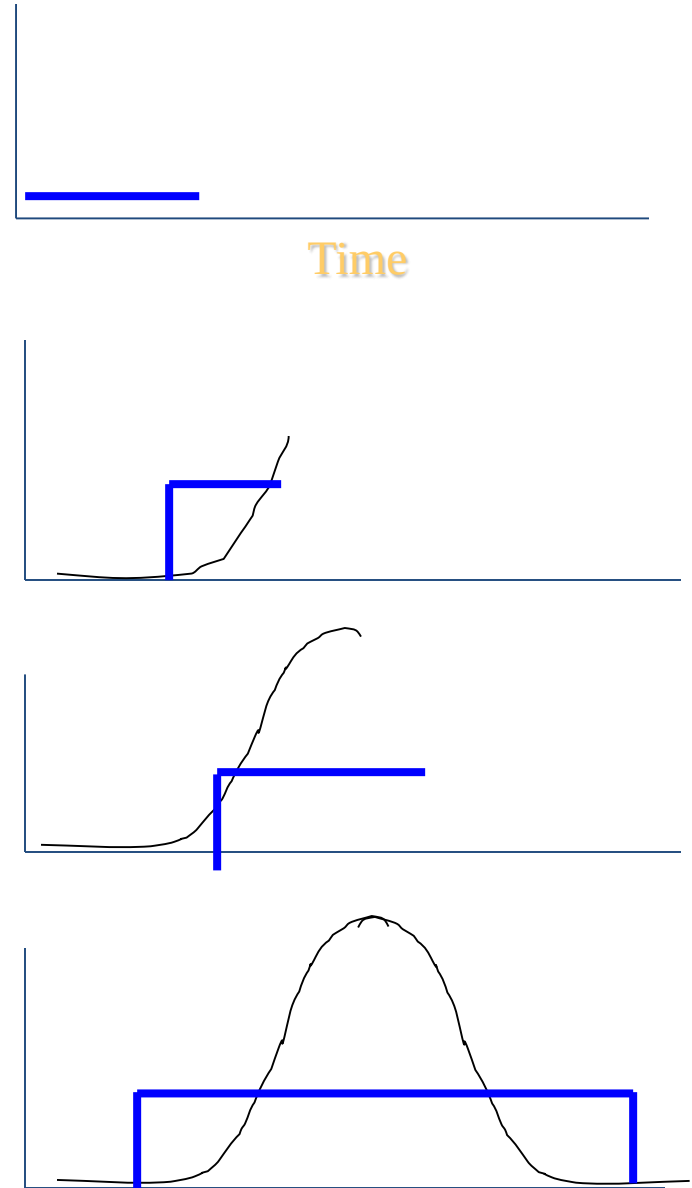
-FL3PEAK = 40



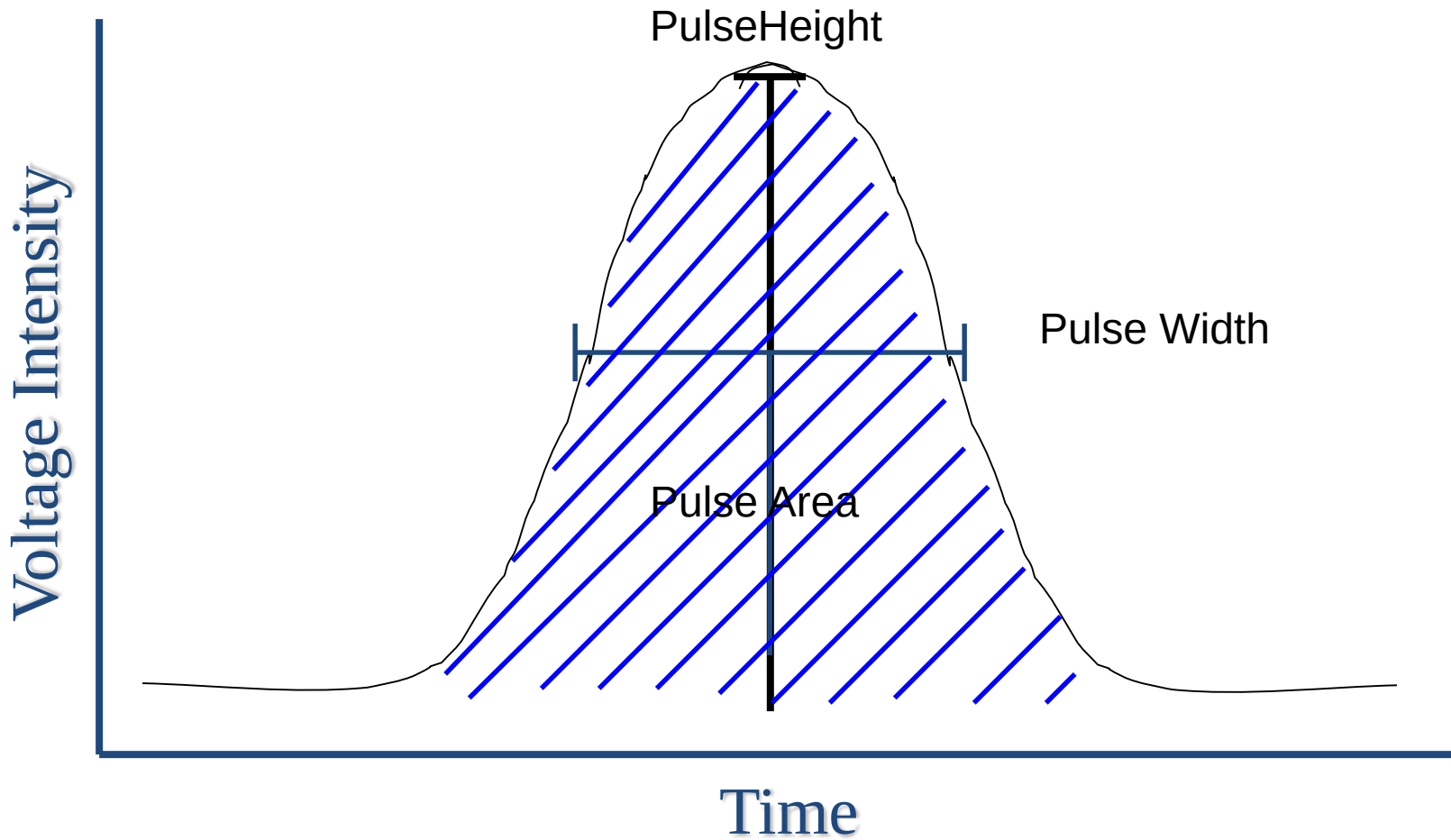
The Pulse



α Photons/Detector (V)

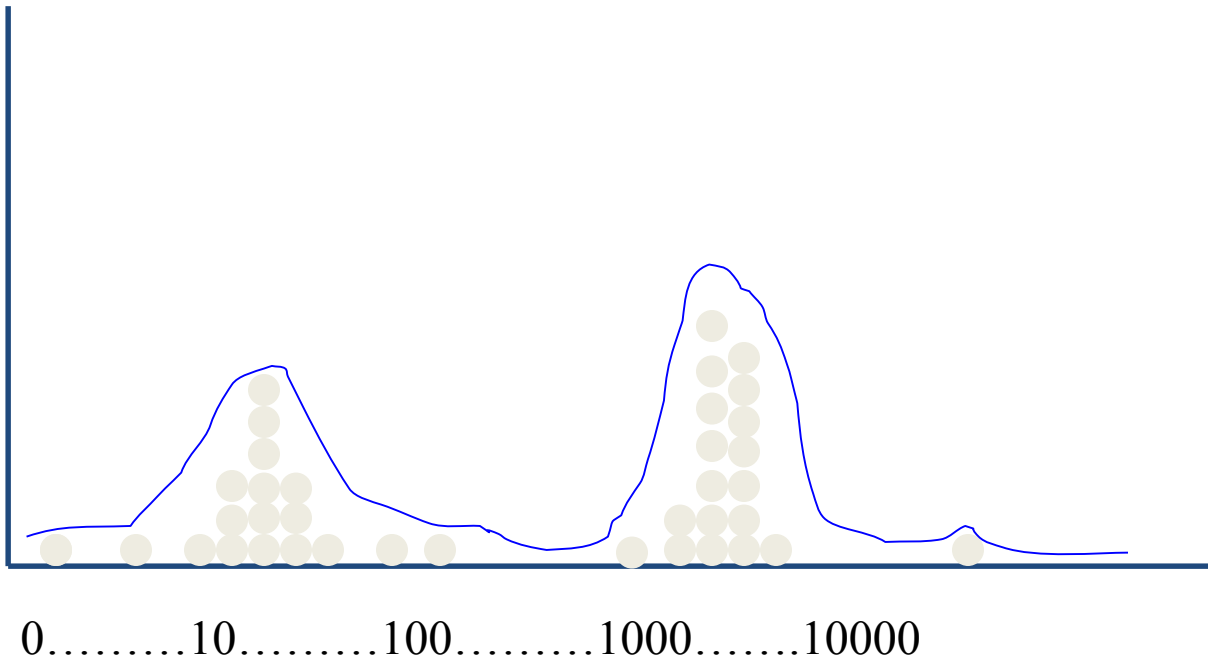


Measurements of the Pulse



Creation of a Histogram

Event #	Param 1 FSC	Param 2 SSC	Param 3 FITC	Param 4 PE	Param 5 APC
1	100	500	10	650	4
2	110	505	700	700	6
3	90	480	720	670	10
4	95	490	15	720	15



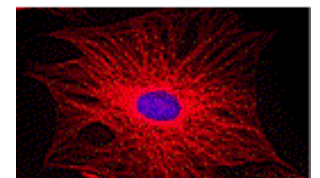
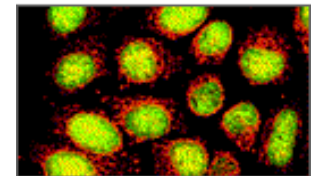
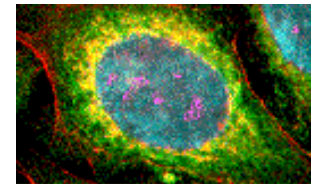
检测器

- 流式细胞仪两种主流的检测器
 - 光电二极管
 - 用来检测强信号，如FSC等
 - 光电倍增管 (PMT)
 - 比光电二极管更敏感，PMT用来检测荧光素发出的微弱荧光
- 通常光检测器前面放置一个带通滤片，仅允许特定波长范围的光通过

五光十色的荧光素

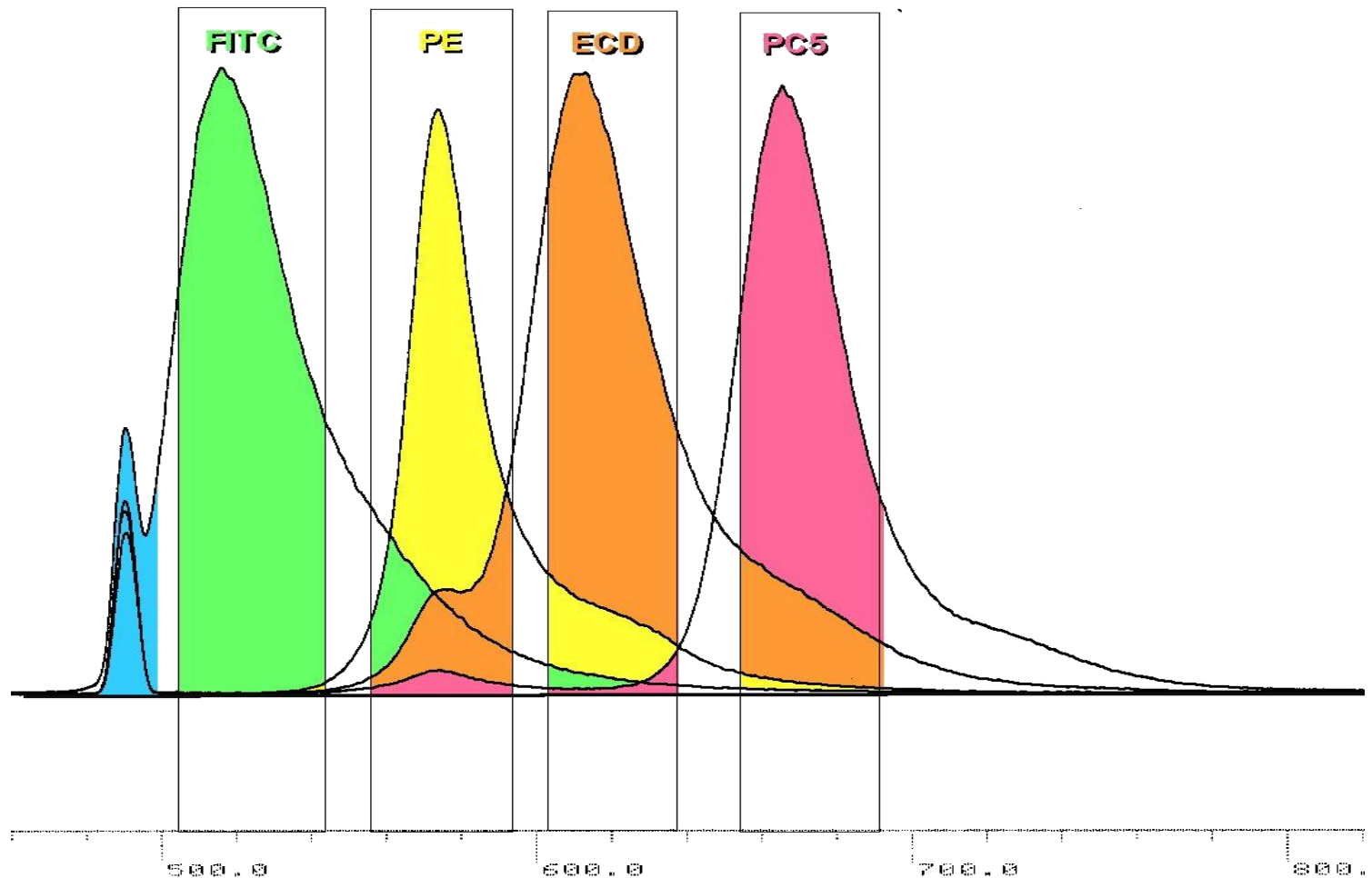
- 单分子荧光素
- 耦合的复合荧光素分子
- 新型的荧光素样荧光物质—Qdots

Fluorochrome	Excitation Laser (nm)	Fluorescent Emission Maximum (nm)	FL Channel
Alexa Fluo 488 ¹	488	519	Green
FITC (Fluorescein)	488	525	Green
PE (R-PE, R-Phycoerythrin)	488	575	Yellow
PE-Cy5 ²	488	670	Red
PE-Cy5.5 ²	488	690	Red
PE-Cy7 ²	488	774	Infra-Red
APC (Allophycocyanin)	633, 635	660	Red
Alexa Fluo 647 ¹	633, 635	668	Red
APC-Cy5.5 ²	633, 635	690	Red
APC-Cy7 ²	633, 635	774	Infra-Red

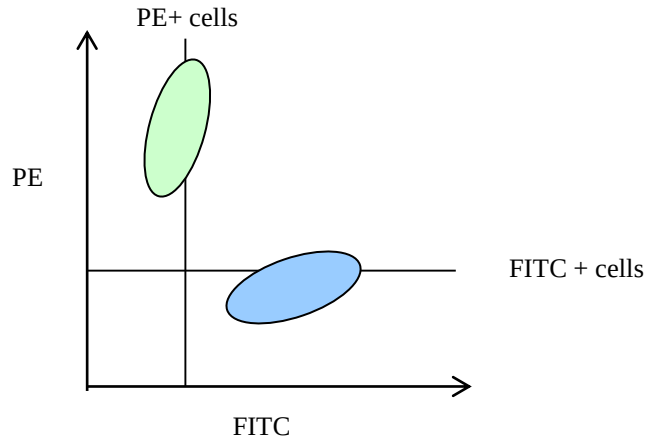


4 Color Single Laser (488nm)

FITC/PE/ECD/PC5



补偿-消除荧光的干扰



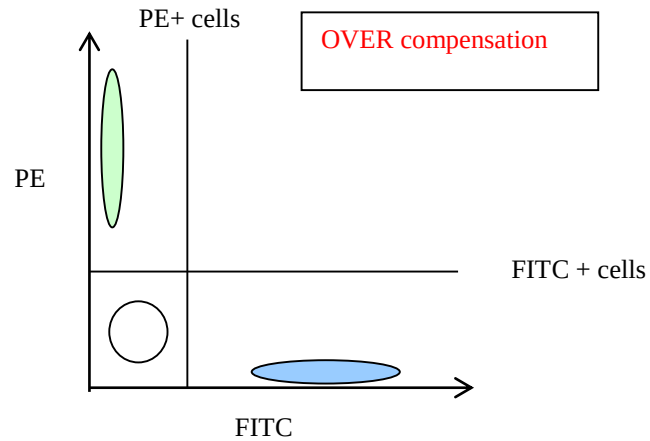
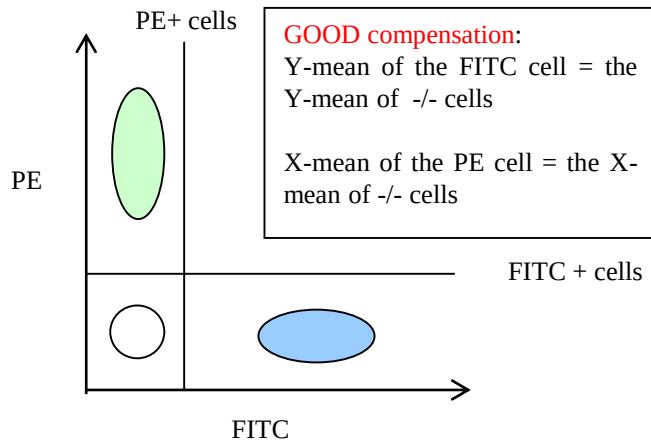
To do colour compensation:

For Pure FITC+ cells,
= PE signal - % FITC signal

For Pure PE+ cells,
= FITC signal - % PE signal



After
compensation



自动补偿，一劳永逸！

➤ 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。

➤ 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。

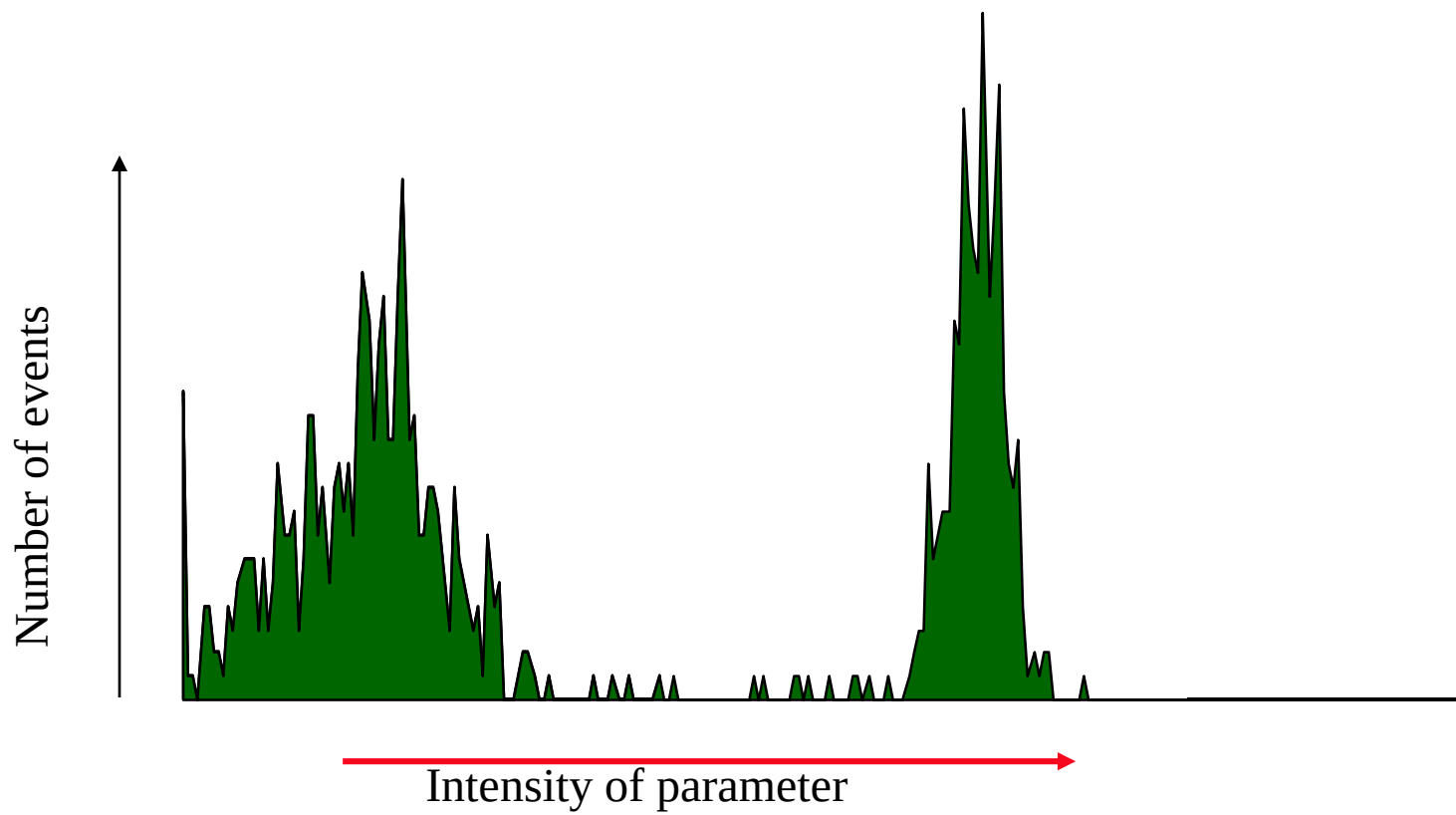
➤ 一次补偿，一劳永逸！

CytoFlex不依赖微球的自动补偿实验，生成补偿矩阵，补偿可随电压的调节而发生相应的变动，

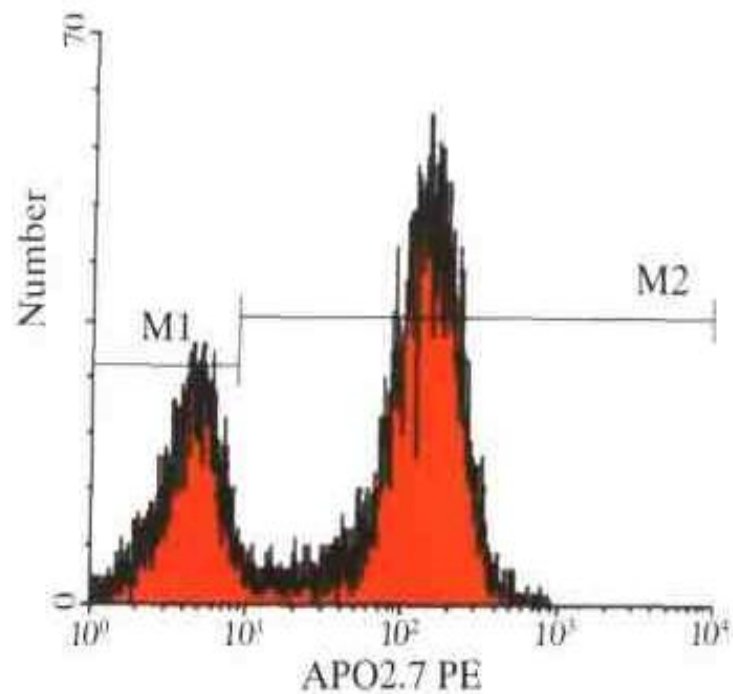
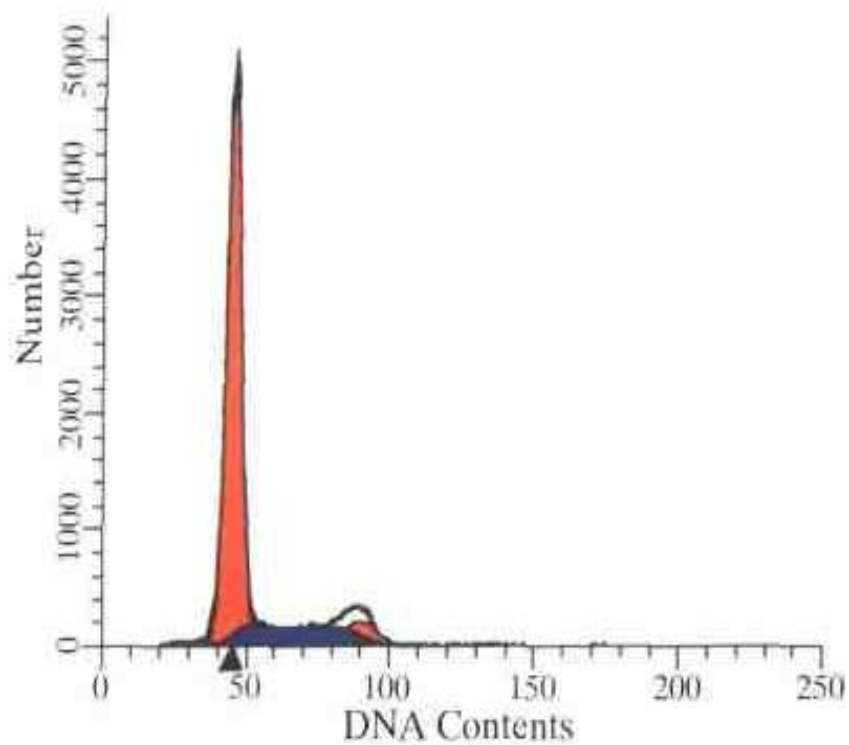
流式数据分析

- 你需要的是哪一种数据？
 - 荧光强度？
 - 阳性百分比？
 - X与y差值多少？
 - 参数1和参数2的比值？
- 可使用哪些统计手段
 - 平均荧光强度MFI (geometric or arithmetic)
 - 百分比均值%-ages
 - 变异度CV
 - 中位数Median
 - 很多其他适用于数值型数据的统计手段

流式直方图

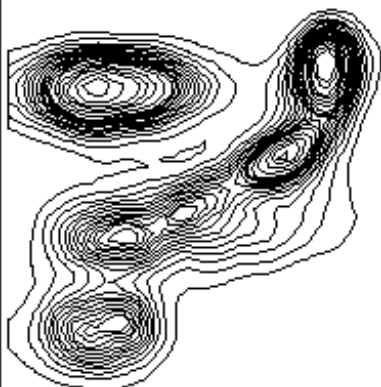


单参直方图

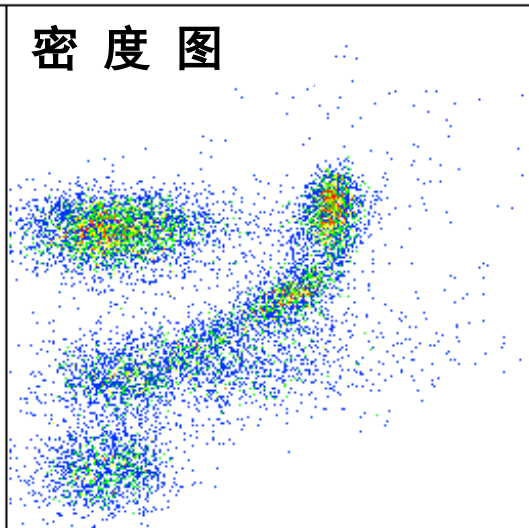


二维参数图

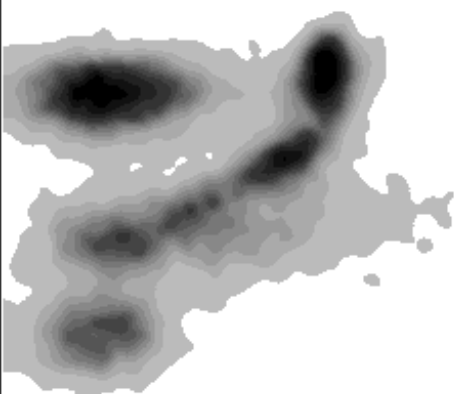
等高线图



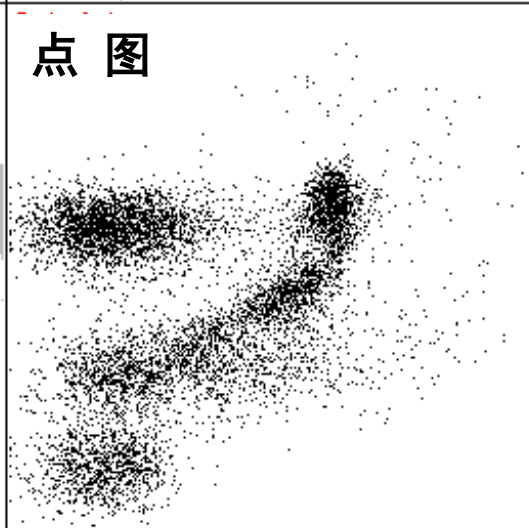
密度图



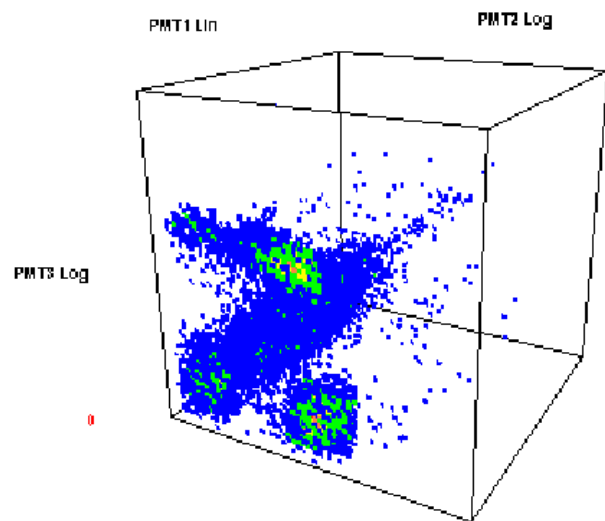
灰阶密度图



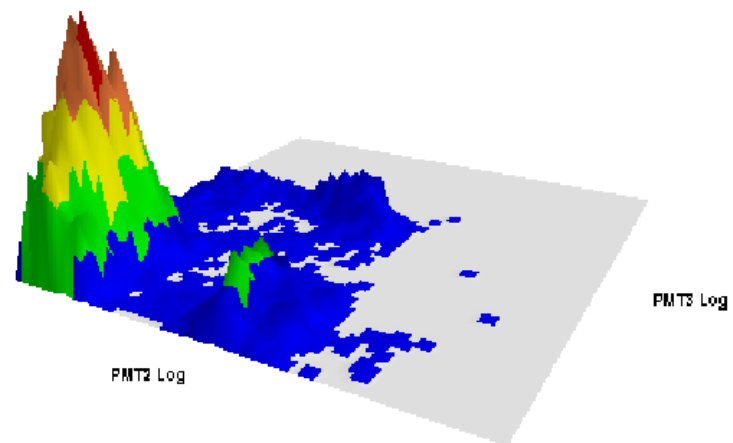
点图



(F1)[Ungated] cd3fito-cd4pe.LMD : PMT2 Log/PMT3 Log/PMT1 Lin



(F1)[Ungated] cd3fito-cd4pe.LMD : PMT2 Log/PMT3 Log



流式细胞仪检测流程

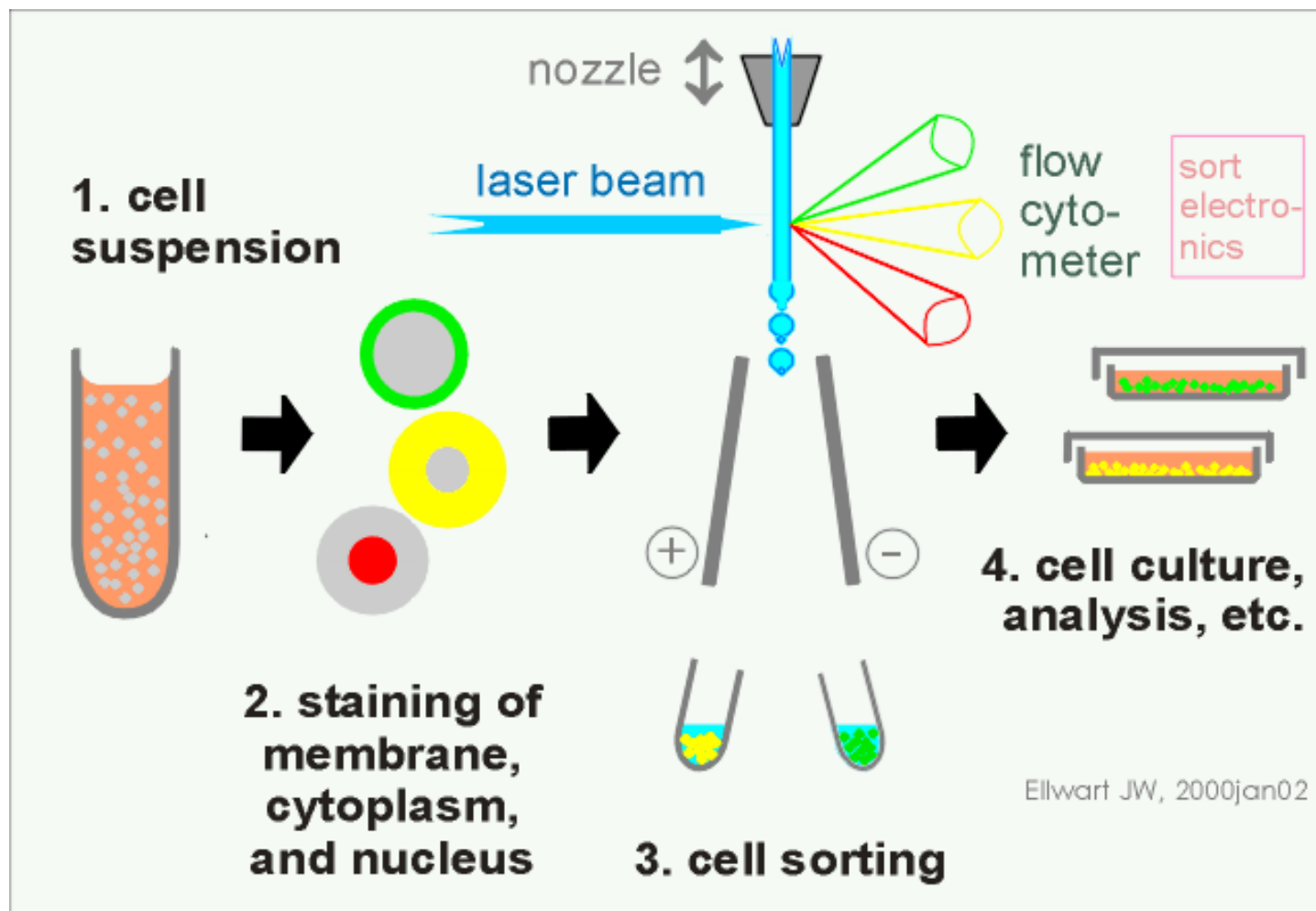
- 激光光源照射到细胞上，光向四方散射
- 散射的光线通过滤片到达检测器
 - FSC 检测细胞大小和表面形状
 - SSC 检测细胞内部结构
- 细胞表面和细胞内部结合的荧光素被激光激发，发出荧光
- 光信号被二向色性滤片分流至不同的通道
- 特定波长的光波通过带通滤片后被PMT转换成电信号
- 电信号被放大，计算机处理信号
- 数据显示及分析

什么是流式分选？

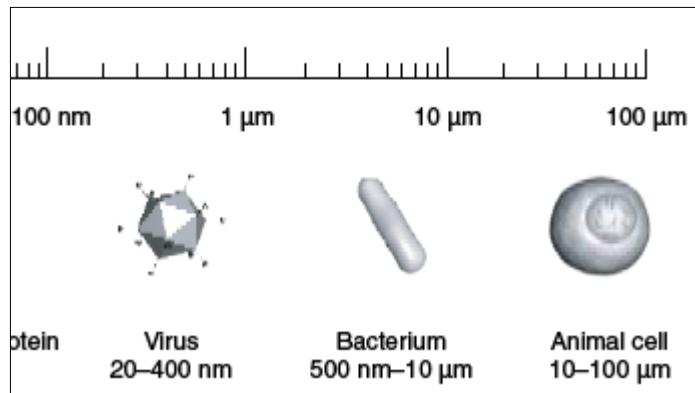
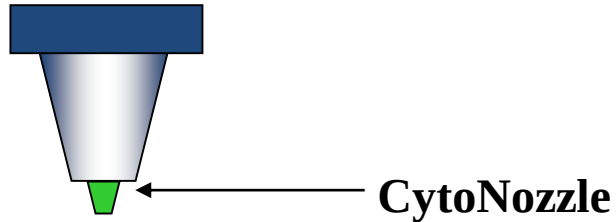


流式细胞分选技术是利用[流式细胞分选仪](#)，以高能量[激光照射](#)高速流动状态下被[荧光色素](#)染色的单细胞或微粒，测量其产生的[散射光](#)和发射荧光的强度，从而对细胞（或微粒）的物理、生理、生化、免疫、遗传、[分子生物学](#)性状及功能状态等进行定性或定量检测的一种现代细胞分析技术，它可根据发射光的[荧光强度](#)和波长将发光颗粒亚群分开并可实现单克隆分选，能复杂样本中的细胞进行鉴定、分类、定量和分离，单次可同时对其一种到四种特定细胞进行超高速分选纯化、高通量单克隆分选或[细胞芯片](#)制备。分选后的细胞能直接用于培养、移植、核酸提取、单细胞[PCR扩增](#)或[原位杂交](#)等，可进一步进行细胞基因、蛋白、功能水平的研究和不同细胞之间的差异化研究。

电子偏转的方式



MoFlo™ XDP: 喷嘴种类多, 适合不同研究对象的需要

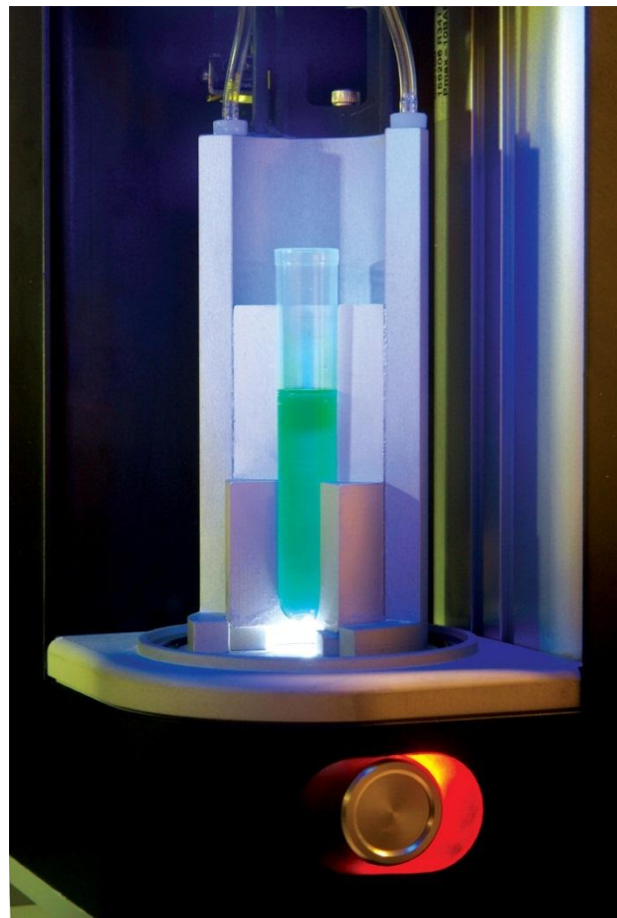


XDP	细胞	InFlux	Aria II
√	染色体/精子/细菌/大病毒颗粒/藻类细胞 (50um)	√	×
√	实验动物细胞/人淋巴细胞/神经细胞 (70-90 um)	√	√
√	肿瘤细胞 (100-130 um)	√	× / √
√	巨噬细胞等真核生物细胞 (150um)	√	×
√	植物/花粉/大藻类细胞 (200um)	×	×

- 同等大小的罗纹卸载和安装, 简单易用
- 喷嘴内壁由生物活性材料组成, 对细胞无损伤, 确保最好的细胞活性

完全程序化控制的上样系统 配备多种试管规格的适配器

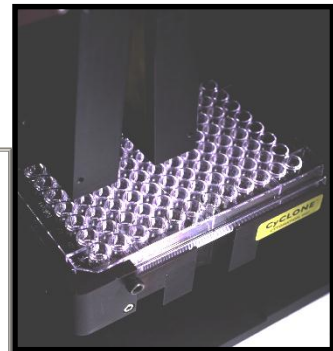
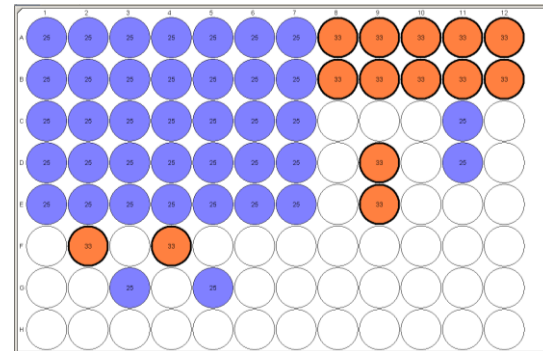
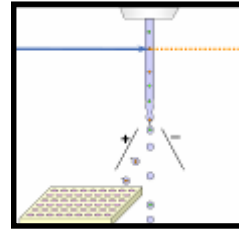
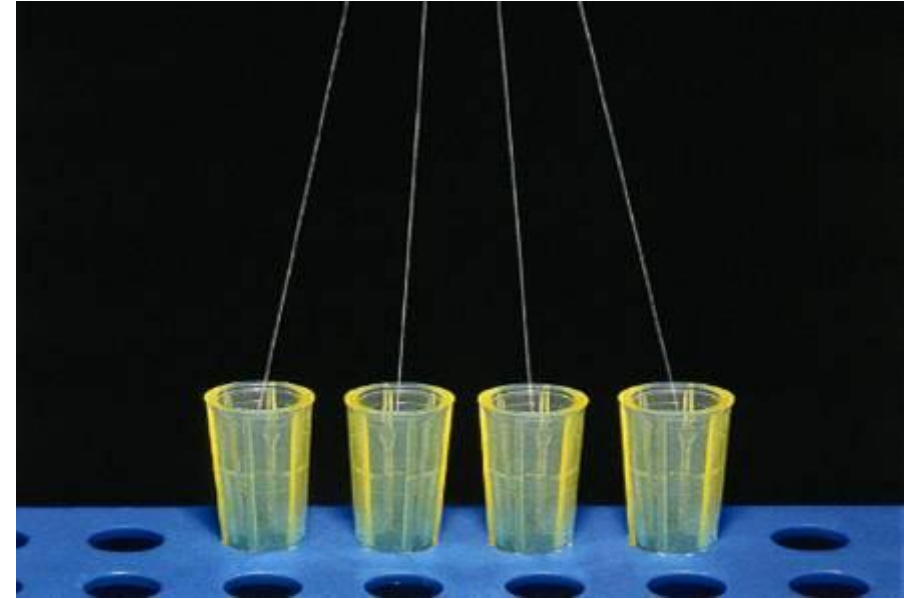
- 试管规格为 **0.5, 1.5, 5, 14, 15 and 50 mL**，适合从微量到大量样本的分选分析
- 任意震荡强度和间隔时间控制系统
- 自动气泡检测和警示系统，自动样本管空余保护功能
- 自动样本间冲洗和关机功能
- 操作者生物安全防护系统



MoFlo™ XDP:

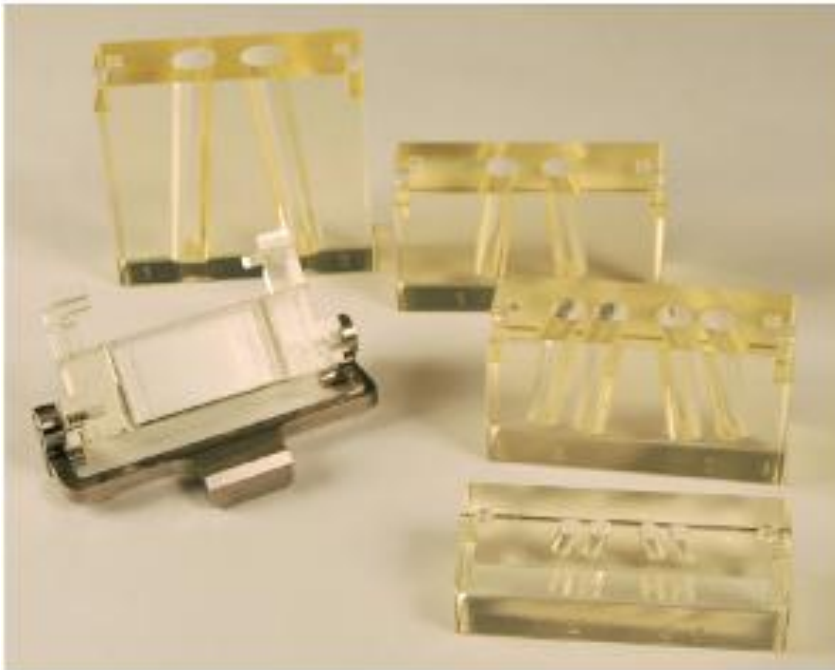
适合所有应用的细胞接收系统

- Cyclone克隆分选装置支持任意厂家的标准 6, 24, 96, 384, 1536 微孔板, 客户定制的微孔板, 波片客户任意指定矩阵的细胞芯片, 并且操作简单
- Cyclone支持分选条件改变引起分选异常的已收集细胞的SortRescue自动保护功能
- 各种试管和平板接收功能



BD FACS Aria III 分选接收装置

- 分选模块装置将覆盖高压电偏转板，以及抽吸器和抽吸器抽屉



Tube holders



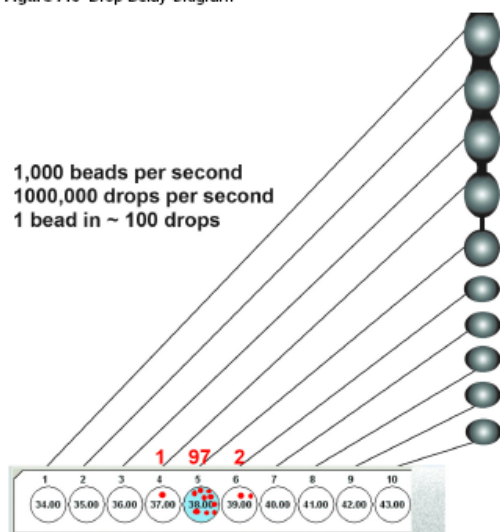
Plate loader on ACDC

传统的液滴延迟时间确定

Determine Drop Delay

Drop Delay is defined as the amount of time it takes for a particle to travel from the interrogation point of the primary laser to the Last Attached Drop in the stream. The accuracy and stability of the Drop Delay is crucial to effective sorting.

Figure 7.6 Drop Delay Diagram



The Drop Delay calibration is a statistical experiment, which operates in the following manner:

- Ten puddles are deposited on a microscope slide.
- Each of the ten puddles uses a different drop delay setting, which differs by one whole number as shown in the example above.
- Precisely 100 droplets are deposited into each puddle at these 10 different drop delay settings.

手工完成与计算人为偏差大

传统方法:

- 在每天的实验开始之前，需要用微球先进行预分选在载波片上，并不断调整液滴延迟的参数后反复试验，最后确定合理的液滴延迟时间。
- 一旦液滴延迟时间确定后，该时间固定，不能根据细胞粘连等情况自动调节。
- 操作要求很高，需要很长时间的的手工摸索，而且需要配备显微镜。

耗时：0.5到1.5小时

辅助材料：

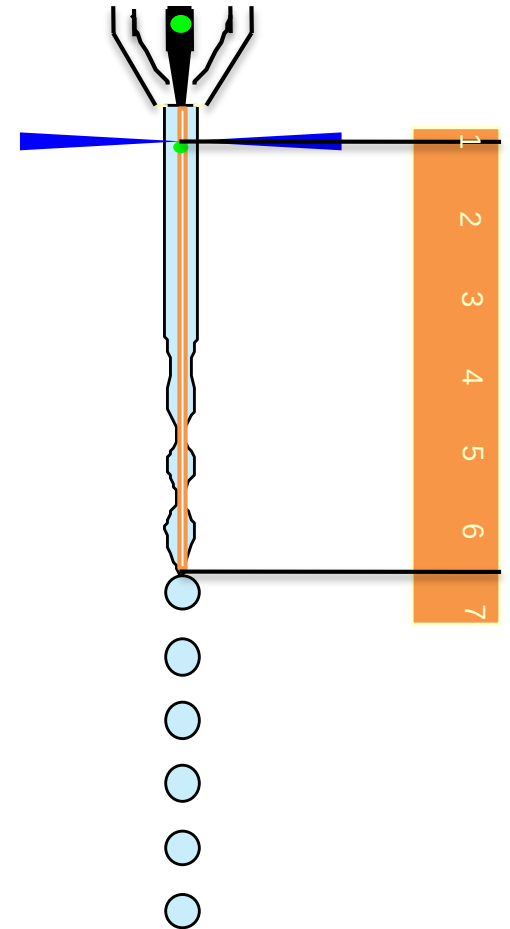
荧光微球
荧光显微镜
玻片
计算器

准确的分选,来自于精确地**充电**

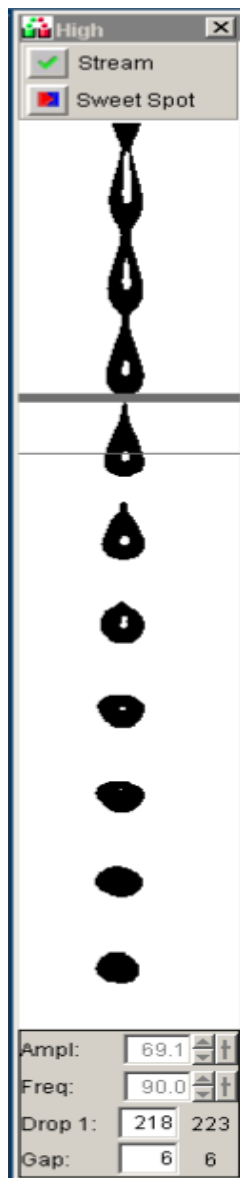
----**Drop delay**的确定

定义： Drop delay即液滴延迟时间，指细胞通过检测区到液滴分离的间隔时间

意义： Drop delay如果能够被精确确定，就可以保证包裹细胞的液滴表面不会充上相反的电荷，从而实现最高的分选纯度及细胞得率。



Sweet Spot自动监控液流

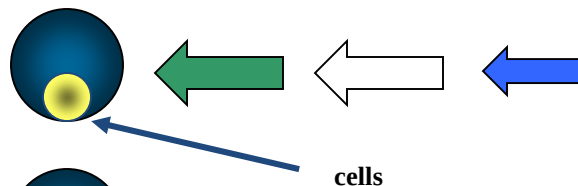


- 液滴断点监测窗口
- 振幅自动调节，维持断点稳定
- 阻塞报警，保护分选样本不受污染，实现分选时无人看管

MoFlo™ XDP: 高度智能的分选模式



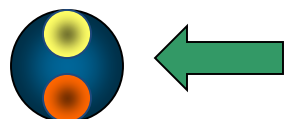
Enrich mode



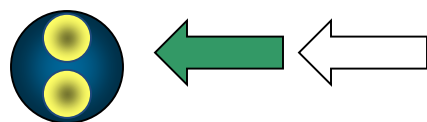
要得到所有含有目标细胞的液滴



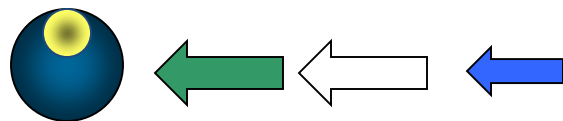
Purify mode



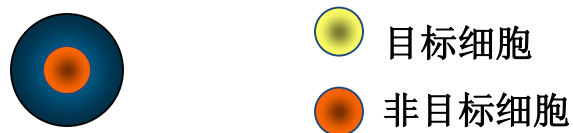
要得到所有含有目标细胞的液滴，但同时含有非目标细胞的液滴除外

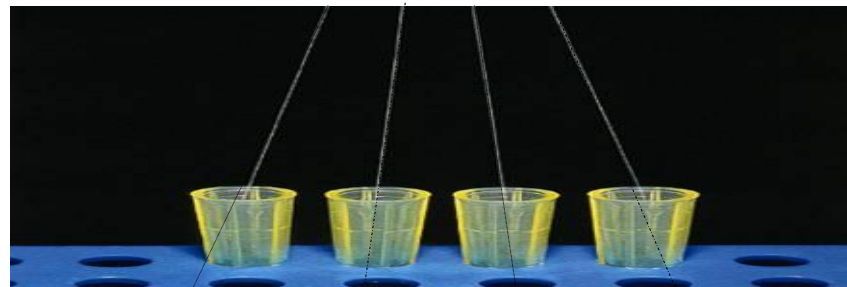
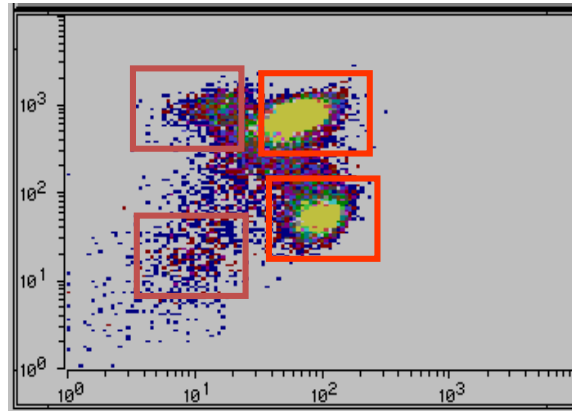


Single mode



只要只含有一个目标细胞的液滴





**Enrich
Mode**

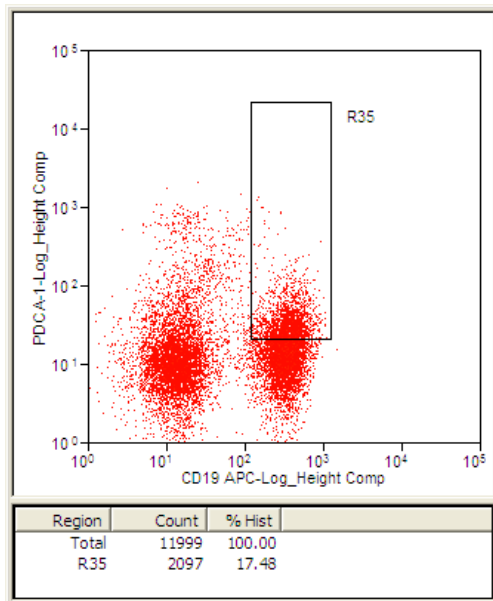
**Purify
Mode**

**Enrich
Mode**

**Purify
Mode**

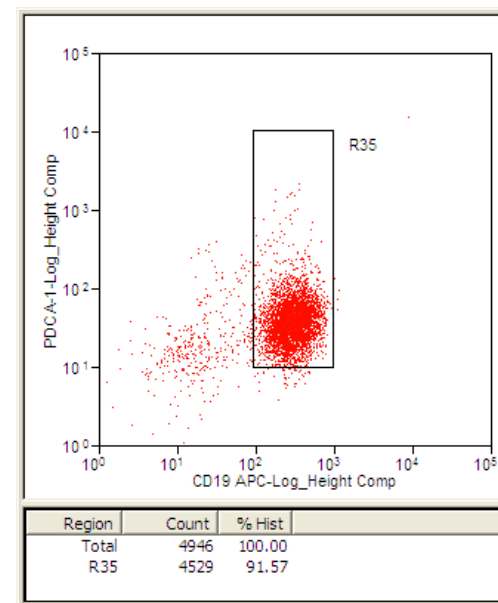
四路分选可以分别选择不同的分选模式

独家的混合分选模式：四路分选分别选择不同的模式 既有高纯度细胞，又不浪费任何一个细胞

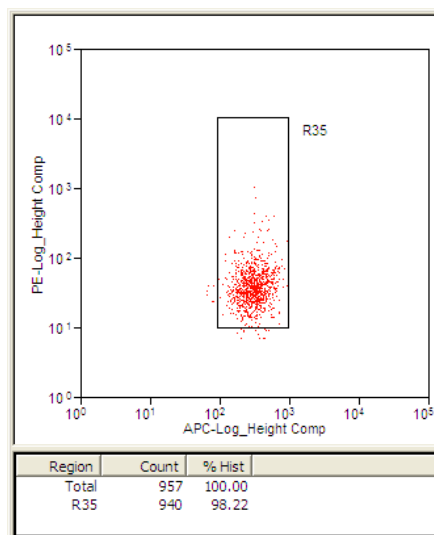


右路：富集模式

Sorted at >70,000eps for >2hrs



左路：纯化模式

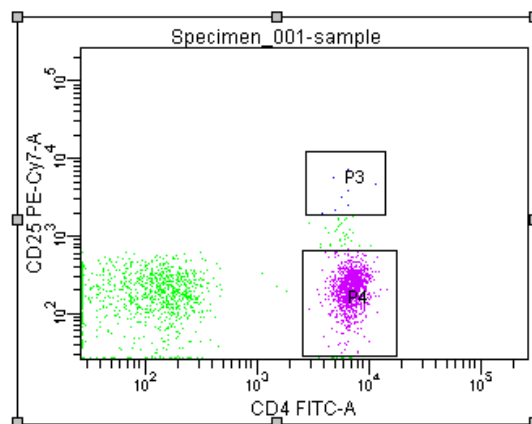


Treg细胞分选

Treg 0.1%
pre-Sort

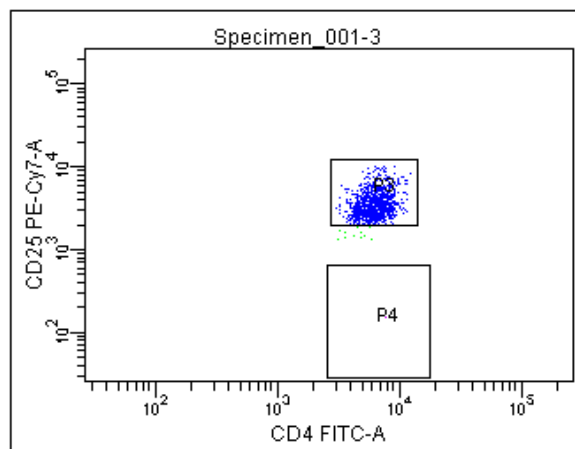


Treg 99%
post-Sort



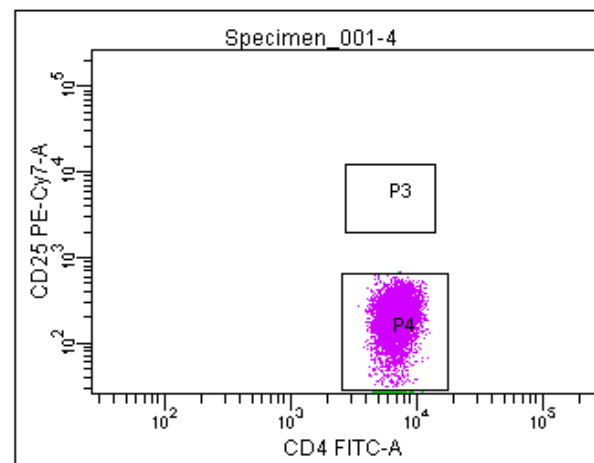
Tube: sample

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000		100.0
P1	3,062	30.6	30.6
P2	2,120	69.2	21.2
P3	8	0.4	0.1
P4	1,013	47.8	10.1



Tube: 3

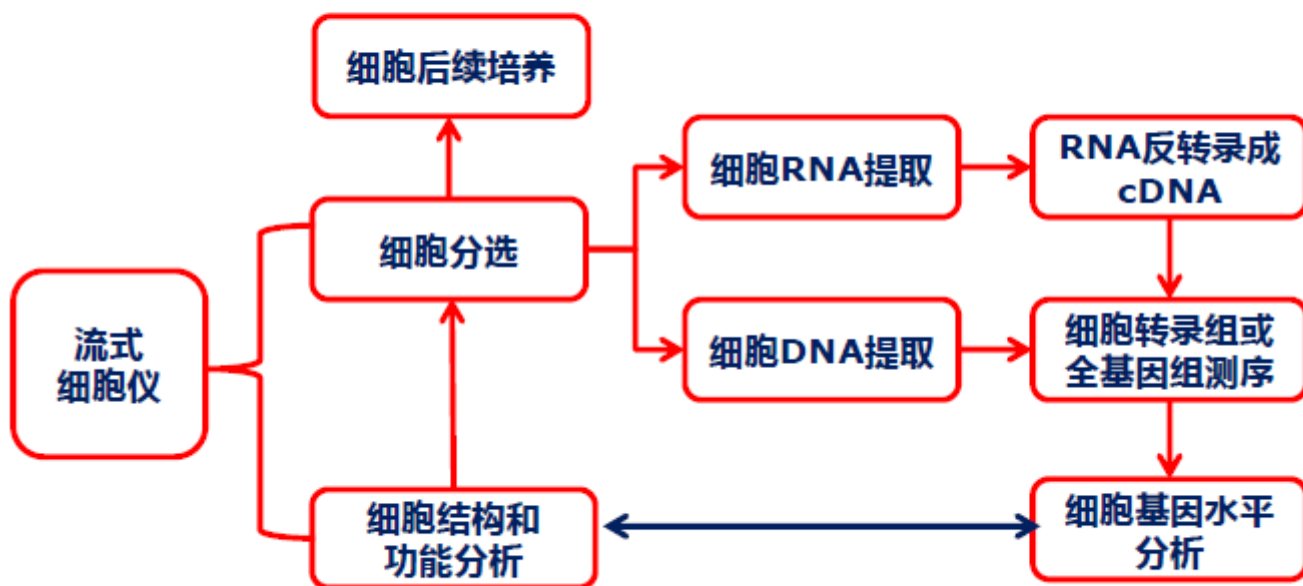
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	6,193		100.0
P1	1,165	18.8	18.8
P2	1,164	99.9	18.8
P3	1,152	99.0	18.6
P4	1	0.1	0.0



Tube: 4

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000		100.0
P1	7,459	74.6	74.6
P2	7,458	100.0	74.6
P3	0	0.0	0.0
P4	7,392	99.1	73.9

关于细胞的完整解决方案



三、如何做好流式实验？

- 流式荧光抗体的选择
- 流式实验对照的选择
- 流式样本制备

流式抗体识别

Mouse anti-Human CD4-FITC (13B8.2 IgG1)

Mouse: **抗体来源——小鼠**

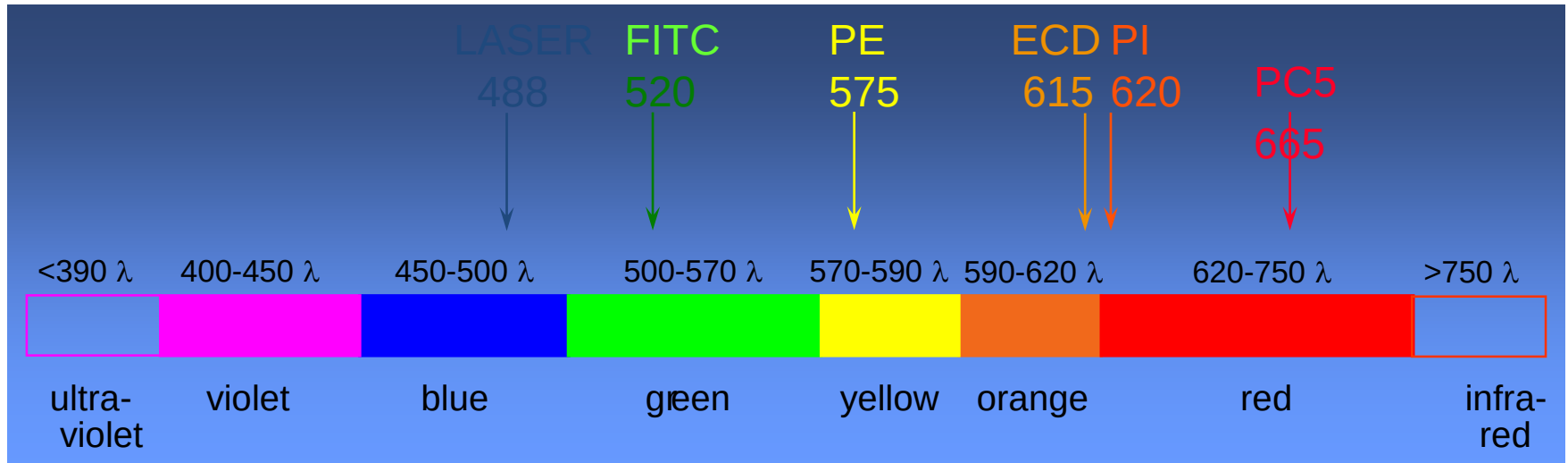
Anti-Human: **检测对象为人类细胞**

CD4-FITC: **检测CD4 抗原, 并该抗体为FITC 标记.**

13B8.2: **抗体的CLONE 株**

IgG1: **为抗体的免疫球蛋白亚型**

常用荧光染料



FITC = fluorescein isothiocyanate(异硫氰酸酞荧光素)

PE = phycoerythrin (RD1)(藻红蛋白)

ECD = energy coupled dye(藻红蛋白-德州红)

PI = propidium iodide(碘化丙啶)

PC5 = phycoerythrin cyanin 5 (PeCy5)(藻红蛋白-花青苷5)

选择荧光素的要诀

➤ 激光器的发射波长、激发波长

➤ 抗原表达的强弱

荧光染料比较(平均荧光强度) PerCP < APC ≤ FITC < ECD < PC5 < PE

➤ 荧光素与待检目标是否有非特异性结合(选择合适的对照)

阴性对照: 无特异性的、与抗体蛋白亚型一致的动物免疫球蛋白。

同型对照是非相关特异性的同型匹配的抗体作为对照。例如待用抗体为小鼠抗人CD3抗体, 其亚型为IgG2a, 标记为FITC, 那么同型对照则FITC标记的小鼠IgG2a。

➤ 多色搭配

➤ 可靠公司来源

最好选用同一试剂公司的同型对照: 不同公司的流式抗体滴度和荧光素/蛋白比(F/P, 每个抗体蛋白结合的荧光素数目)不尽相同。

常用荧光染料组合

- FITC+PE: 最常用的双色组合
- FITC+PE+PE-Cy5: 最常用的三色组合, 进行多色荧光染色时荧光光谱重叠补偿很小,
- FITC+PE+PerCP+APC: 最常用的四色组合, 一般PE和APC用于检测表达较低的抗原上, 而FITC和PerCP用于检测表达较高的抗原上, 如CD3/8/45/4
- PerCP-Cy5.5与PE之间的重合光谱范围很小, 也可用于四色组合
- PE-Cy7可与FITC、PE、PE-Cy5标记的抗体一同使用, 荧光补偿小
- PE-Cy5可与FITC、PE同时使用, 但不能与APC同时使用, 二者之间荧光干扰太大

实验对照的设置

➤ 实验样本（自发荧光＋特异荧光＋非特异荧光）

- 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

➤ 阴性对照

- 空白对照（自发荧光）

➤ 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

荧光染色对照的设置

➤ 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
- 将单种荧光素标记的单克隆抗体分别进行单色荧光染色
- ✖ 几色分析就需要制备几个补偿对照管

标本获取

➤ 常规标本来源

外周血和骨髓穿刺液

培养细胞

组织(实体瘤、脾、肝.....)

➤ 标本是否合格

凝集、溶血、量太少或骨髓穿刺液无骨髓小粒均为不合格

标本的处理

新鲜实体组织标本制备：

1. 酶法：胃蛋白酶、胰蛋白酶
2. 机械法：减碎法、网搓法、研磨法
3. 化学法：0.2%EDTA/EDTA+胰酶

标本的转运

➤ 抗凝新鲜血液和骨髓标本

室温条件下（注意不能低于 10°C 或高于 37°C ）且在储存时限以内直接转运。

注意不能剧烈震荡，以免溶血。

➤ 固定标本： 可转运和存放。

➤ 膜标记送检又较远的标本

一般需要保持细胞的活力，故需要 **Ficoll** 分离单个核细胞。然后加入**1640**完培，并含**DMSO**，置液氮或 -70°C 转运。

抗凝剂的选择

外周血和骨髓标本抗凝剂选择

1. 肝素

室温下储存限为48-72小时。

2. EDTA

室温下储存时限只有12-24小时。

3. ACD

室温下储存时限可达72小时。ACD不推荐用作骨髓穿刺液的抗凝。

固定剂、破膜剂选择

➤ 常用固定剂

4%的甲醛固定15分钟。适用于各类蛋白质的检测。

70%冰乙醇，用于细胞周期分析的标本固定

60%的酸性丙酮pH4.2，固定10分钟。适用于血及骨髓标本磷酸酶和酯酶的检测。

➤ 常用破膜剂

0.05%皂角素 > 0.1%TritonX-100 > 70%乙醇

标本的制备

免疫标记（膜表面）的样本处理

保证单细胞悬液：组织标本采用机械法、酶法。

300目尼龙网过滤

调整细胞浓度： $1 \sim 1 \times 10^6/\text{ml}$ ，

标记：取100 μl 样本 + 适量抗体

（细胞内、外标记：表面染色-固定-破膜-胞内染色）

孵育：室温避光20分（或根据抗体说明）

（加一、二抗）

溶血：溶血剂的选择（市售、氯化氨、草酸氨）

检测：上机

外周血单个核细胞的制备

程序：

- (1) 取外周血2ml，肝素抗凝，生理盐水稀释成4ml，混匀；
- (2) 沿试管壁缓缓加入4ml淋巴细胞分离液Ficoll，勿用力过大；
- (3) 离心2000r/min，30min，离心后分层，上层为血浆层，中层为分离液层，底层为红细胞层；
- (4) 用吸管将上层与中层之间的单个核细胞层吸出，用生理盐水洗两遍；
- (5) 固定或放置低温冰箱保存备用；

培养细胞单细胞悬液的制备

程序：

- (1) 将培养细胞用0.04% EDTA或0.25%胰酶消化3~7分钟，至光镜下见到贴壁细胞变圆还没有漂浮为止，弃消化液，加PBS；
- (2) 用吸管将细胞从瓶壁上轻轻吹打下来，移入离心管中；
- (3) 离心，1000r/min，5min；
- (4) 加PBS洗两遍；
- (5) 用少许PBS重悬，将细胞吹打均匀，固定或低温保存待用；

人外周血淋巴细胞亚群检测的实验步骤

①取新鲜抗凝血100u1，置于FCM测量管中；

②直接标记法：加入带荧光标记抗人的单克隆抗体 5-10u1，充分混匀，闭光孵育20~30min；

(间接标记法：加入不带荧光标记的鼠抗人的单克隆抗体试剂10u1，充分混匀，室温孵育30min，再加入带荧光标记的羊抗鼠抗体，反应30min)

④加入溶血剂A液600u1，轻轻振荡15s，

⑤加入溶血剂B液260u1，轻轻振荡15s，

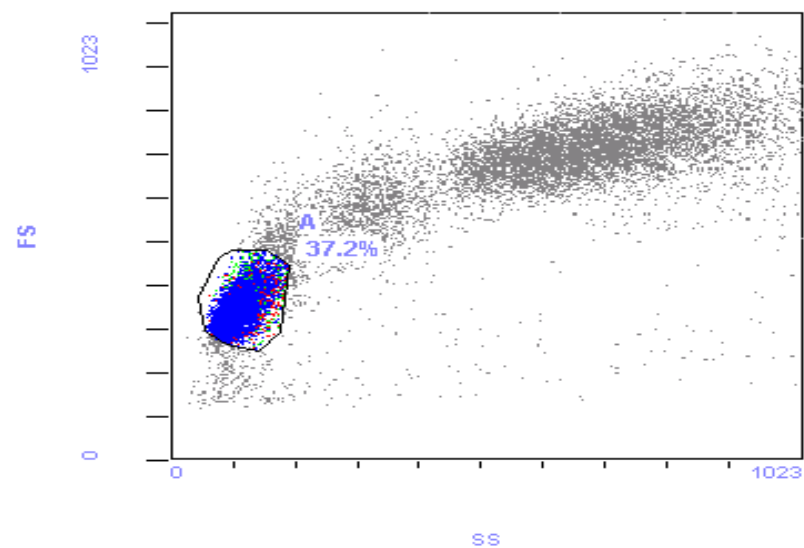
⑥加入溶血剂C液100u1，振荡10 s, 上机检测。

其它溶血剂:加入3-4ml溶红细胞液，充分混匀，室温孵育5~10min, 1500r/min离心5min，去上清；用PBS洗涤1遍，收集细胞上机检测。

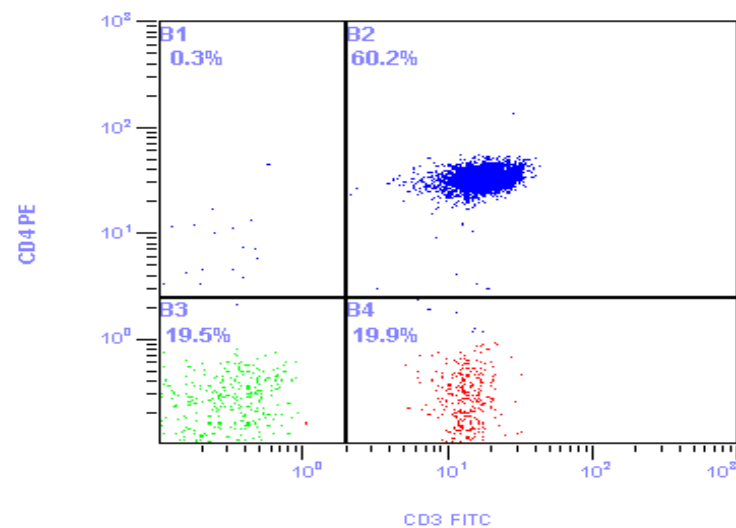
实验分组

- A: 空白对照管或同型对照 (调节电压)
- B: 单标补偿管 (电压不变, 调节补偿)
- C: 双标样本检测管

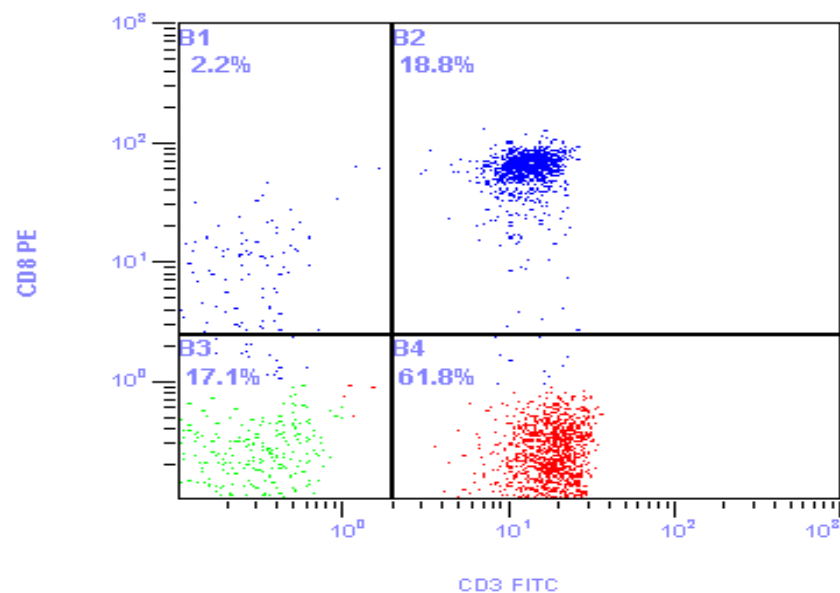
(F1)[Ungated] 2 Color CD3 CD4.LMD : SS/FS



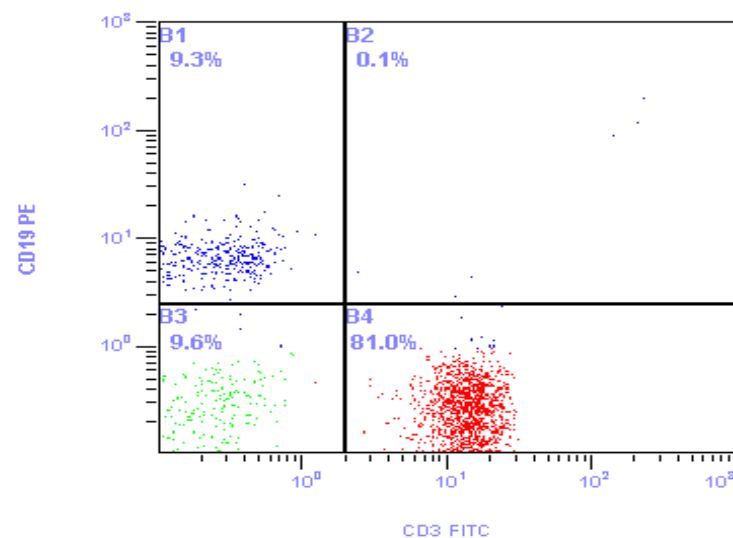
(F1)[A] 2 Color CD3 CD4.LMD : FL1 LOG/FL2 LOG



(F1)[A] 2 Color CD3 CD8.LMD : FL1 LOG/FL2 LOG



(F1)[A] 2 Color CD3 CD19.LMD : FL1 LOG/FL2 LOG



四、流式细胞术的应用与案例分享

免疫学

血液学

肿瘤学 (细胞周期、细胞增殖、细胞凋亡)

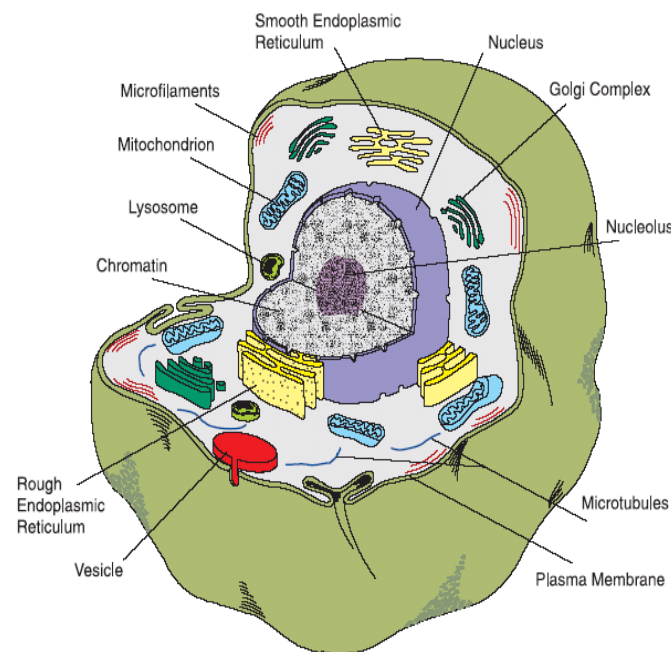
骨髓和器官移植

血栓与止血

生物遗传学

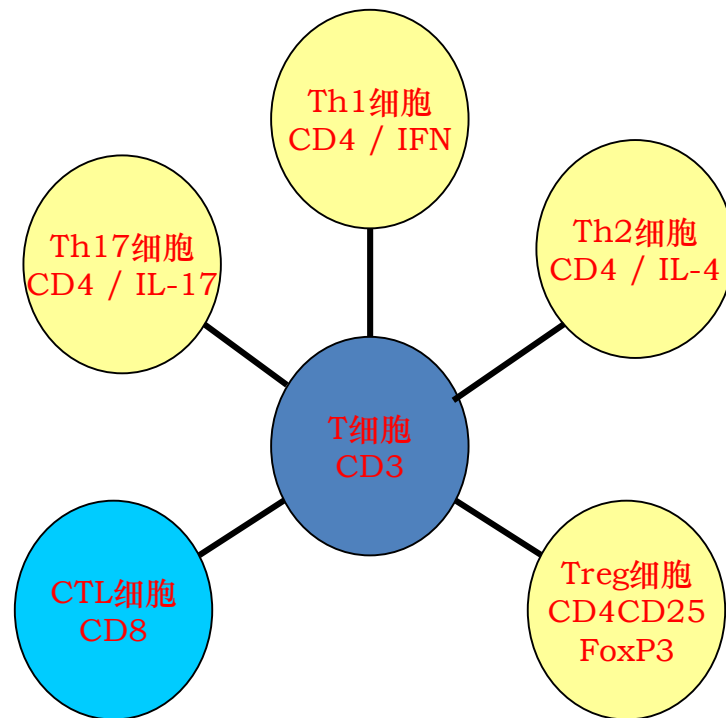
细胞内钙离子测定、膜电势

干细胞研究



细胞免疫功能测定

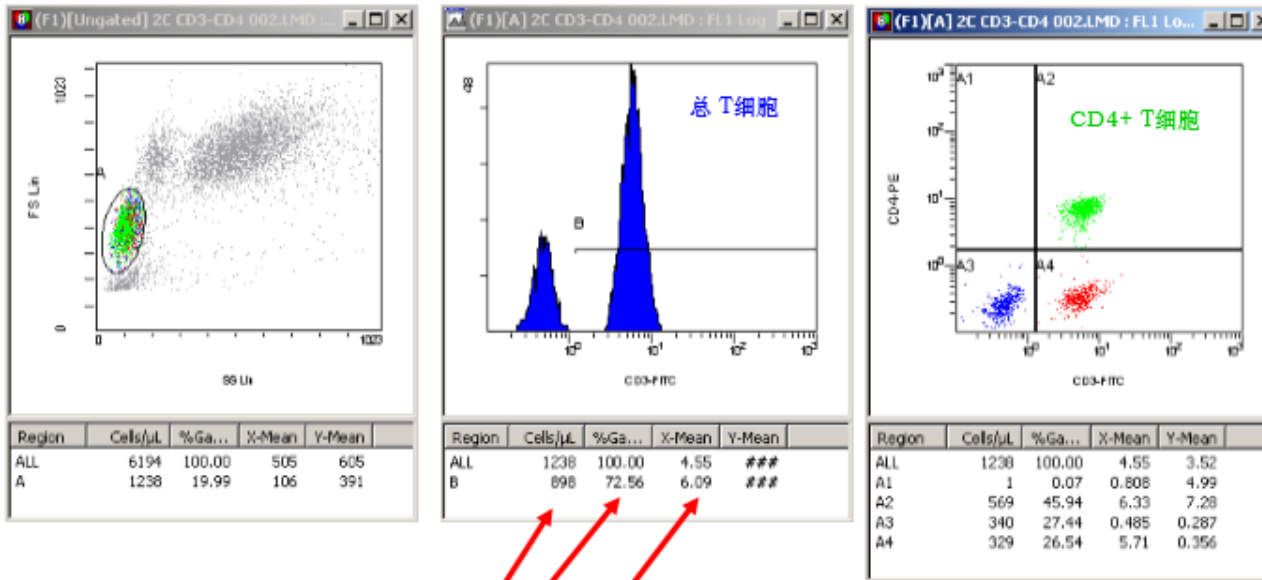
- 淋巴细胞亚群 (T, B, NK)
- 活化的淋巴细胞
- 有功能的淋巴细胞
- 抗原特异性淋巴细胞
- 调控性免疫细胞
- 抗原递呈细胞
- 先天免疫细胞



外周血淋巴细胞亚群临床意义

疾病	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8	NK
自身免疫病		降低	增高	降低	降低
AIDS	降低	严重降低	增高	降低	
SARS	降低	降低	降低	降低	降低
慢性活动性肝炎、肝硬化		降低	正常或增高	降低	降低
肿瘤	降低	降低	增高	降低	降低

HIV感染患者CD4阳性T细胞的绝对计数



艾滋病人
CD4细胞

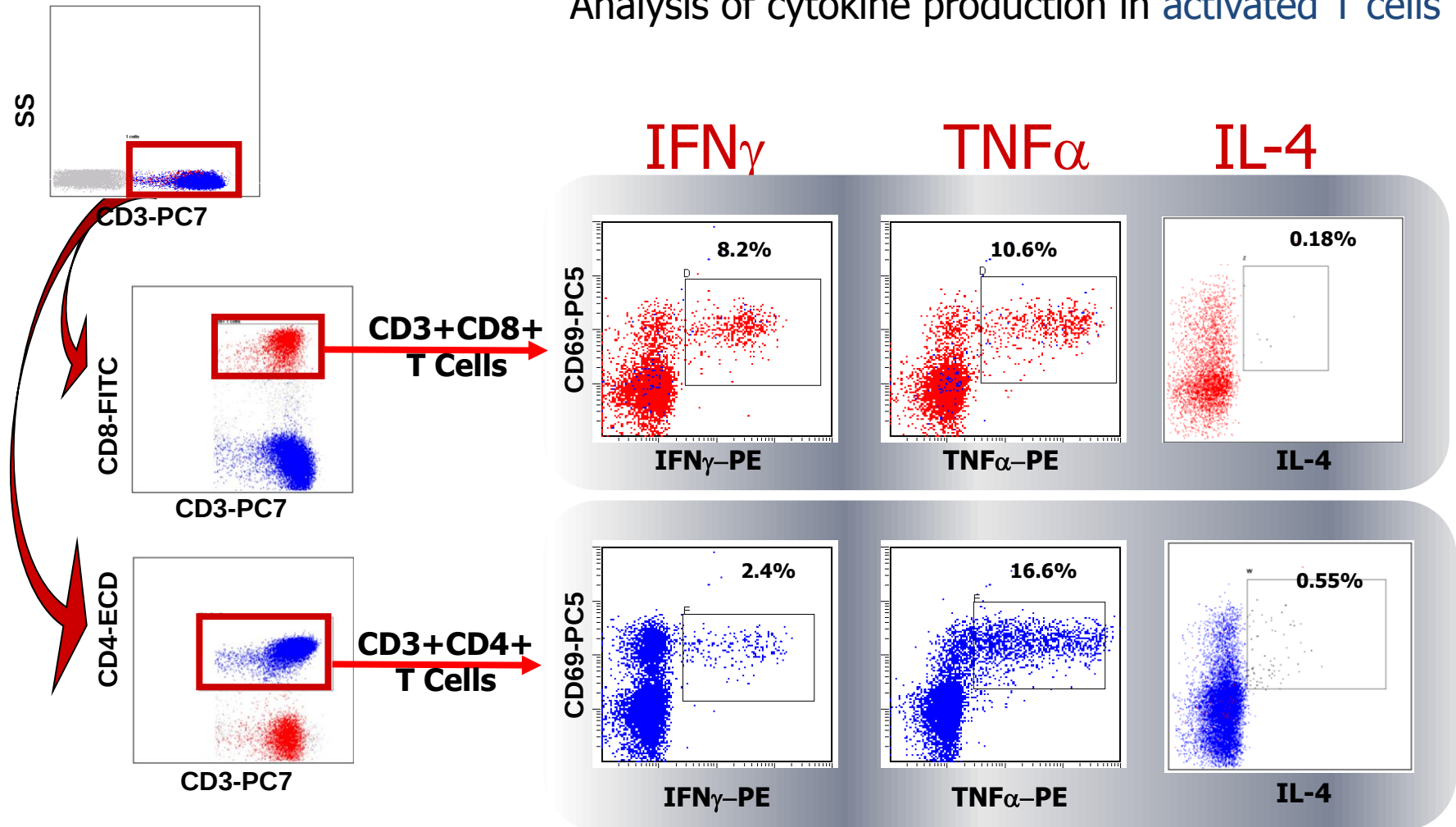
绝对计数值
相对计数值
蛋白表达强度

- HIV入侵人体的目标细胞是CD4 T细胞，感染后期能严重破坏T细胞，引起CD4细胞的减少
- CD4细胞的计数是诊断、疗效观察和预后的最重要指标
- CD4细胞绝对数量如果低于200细胞/ μ L，表明疾病将进入重症期

细胞内细胞因子分析

SEB/CD28 Activated T cells

Analysis of cytokine production in **activated T cells**



CBA

实验简介

Cytometric Bead Array (CBA)，即微量样本多重蛋白定量技术是一个基于流式细胞检测系统的多重蛋白定量检测方法。它能够同时对单个样品中的多个指标进行检测。首先利用一系列带有荧光标记的微球连结特定的捕获抗体以捕捉溶液系统中的待测物，然后再通过相对应的各种不同检测物特异微球上的不同荧光强度同时定量测定分析样本中多种可溶性成分。

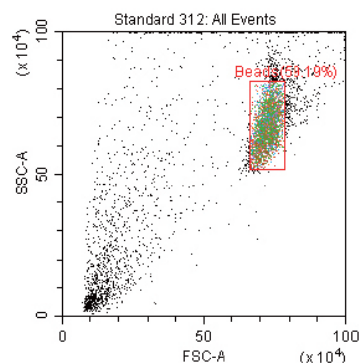


图 1

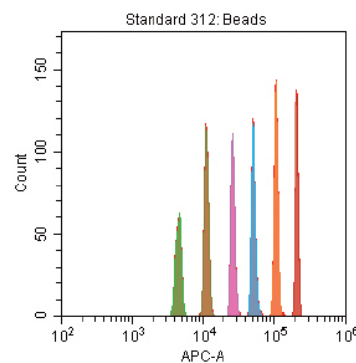


图 2

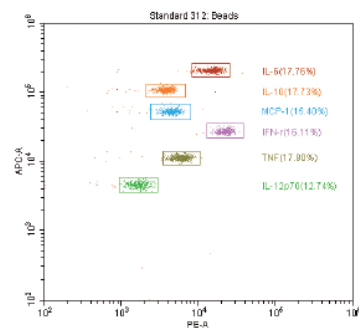


图 3

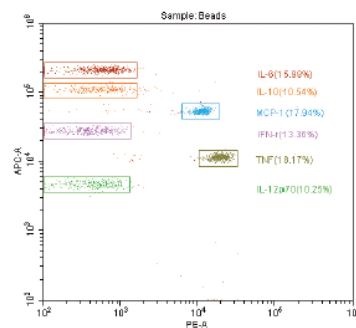


图 4

图 1: 通过电压调节，将微球群体找到；图 2: 显示为代表不同炎症因子的六种微球，在 APC 通道的荧光强度梯度明显，提示仪器的荧光灵敏性和线性度良好；图 3 为标准品 312 pg/mL；图 4 为样本检测结果。

武汉大学生命科学院-杨代常

---转基因水稻大规模生产重组人血清白蛋白

研究表明：由转基因水稻种子生产的重组人血清白蛋白(OsrHSA)在生理生化性质、物理结构，生物学功能、免疫原性与血浆来源的人血清白蛋白一致；并建立了大规模生产重组人血清白蛋白的生产工艺，获得了高纯度和高产量重组人血清白蛋白产品。

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE



Immunotoxicity Assessment of Rice-Derived Recombinant Human Serum Albumin Using Human Peripheral Blood Mononuclear Cells

Kai Fu¹, Qin Cheng¹, Zhenwei Liu¹, Zhen Chen¹, Yan Wang³, Honggang Ruan², Lu Zhou², Jie Xiong², Ruijing Xiao², Shengwu Liu², Qiuping Zhang², Daichang Yang^{1*}

¹ State Key Laboratory of Hybrid Rice and College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan, China, ² Department of Immunology, College of Basic Medical Science, Wuhan University, Wuhan, China, ³ Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Analysis and Testing center, Wuhan, China

Abstract

Human serum albumin (HSA) is extensively used in clinics to treat a variety of diseases, such as hypoproteinemia, hemorrhagic shock, serious burn injuries, cirrhotic ascites and fetal erythroblastosis. To address supply shortages and high safety risks from limited human donors, we recently developed recombinant technology to produce HSA from rice endosperm. To assess the risk potential of HSA derived from *Oryza sativa* (OsrHSA) before a First-in-human (FIH) trial, we compared OsrHSA and plasma-derived HSA (pHSA), evaluating the potential for an immune reaction and toxicity using human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The results indicated that neither OsrHSA nor pHSA stimulated T cell proliferation at 1x and 5x dosages. We also found no significant differences in the profiles of the CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets between OsrHSA- and pHSA-treated cells. Furthermore, the results showed that there were no significant differences between OsrHSA and pHSA in the production of cytokines such as interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin (IL)-10 and IL-4. Our results demonstrated that OsrHSA has equivalent immunotoxicity to pHSA when using the PBMC model. Moreover, this *ex vivo* system could provide an alternative approach to predict potential risks in novel biopharmaceutical development.



案例五、流式细胞术评估转基因水稻重组人血清白蛋白免疫反应的潜在性风险的应用

利用外周血单个核细胞作为一种用于重组人血清白蛋白从水稻胚乳中免疫反应的潜在风险评估体外系统。

研究了T细胞的增殖和T细胞亚群的分布，特别是CD8+细胞毒性T细胞，随着对OsrHSA细胞的细胞因子释放。结果表明：OsrHSA和血浆来源的人血清白蛋白（PHSA）不能刺激T细胞增殖的1倍和5倍剂量。OsrHSA和PHSA之间观察到处理后的细胞，T细胞表型没有差异；四种细胞因子的炎症和免疫调节相关的分泌，包括γ-干扰素

（IFN-）、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白细胞介素（IL）-10和IL-4，OsrHSA和PHSA处理之间没有显着不同。这表明OsrHSA在PBMC治疗没有明显的潜在毒性。

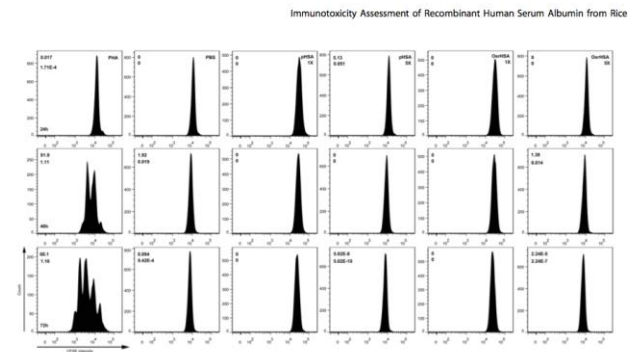
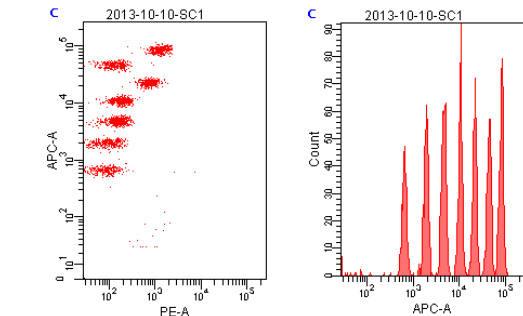


Figure 1. Measurement of T cell proliferation using CFSE. The PBMCs were labeled with CFSE and then treated with PHA, PBS, pHSA and OsrHSA for 24, 48 and 72 h. The PBMCs were then analyzed by flow cytometry. The value in the upper left corner indicates the percentage of dividing T cells, and the value in the lower left corner represents the average number of cell divisions.

Table 2. T cell immunophenotypes at different dosages and time points of treatment.				
Treatments	Cell markers			Dosages
	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	
PHA	31.30 ± 10.60	28.83 ± 10.62	1.23 ± 0.60	24 h
PBS	34.31 ± 8.91	29.47 ± 6.36	1.23 ± 0.44	
pHSA	33.56 ± 9.01	32.34 ± 5.10	1.08 ± 0.38	
OsrHSA	32.80 ± 8.28	32.37 ± 5.92	1.06 ± 0.40	5x
pHSA	34.83 ± 8.43	27.29 ± 6.26	1.33 ± 0.41	
OsrHSA	35.74 ± 9.73	28.51 ± 6.74	1.31 ± 0.47	
PHA	23.39 ± 9.33	25.54 ± 10.26	1.06 ± 0.56	48 h
PBS	34.47 ± 10.08**	29.27 ± 5.78	1.24 ± 0.47	
pHSA	36.74 ± 10.28**	32.06 ± 4.93**	1.18 ± 0.41	
OsrHSA	35.74 ± 9.00**	33.06 ± 4.81**	1.11 ± 0.37	1x
pHSA	37.51 ± 9.77**	27.35 ± 5.91	1.42 ± 0.46*	
OsrHSA	38.65 ± 9.77**	28.86 ± 5.70	1.40 ± 0.48*	
PHA	23.18 ± 8.74	29.08 ± 12.01	0.92 ± 0.50	72 h
PBS	37.19 ± 8.97**	29.47 ± 6.27	1.29 ± 0.44*	
pHSA	36.44 ± 9.37**	33.22 ± 5.24	1.14 ± 0.40	
OsrHSA	36.94 ± 9.23**	33.40 ± 5.29	1.14 ± 0.39	5x
pHSA	39.76 ± 9.52**	29.94 ± 6.32	1.40 ± 0.47*	
OsrHSA	40.21 ± 9.76**	30.04 ± 6.47	1.41 ± 0.49*	

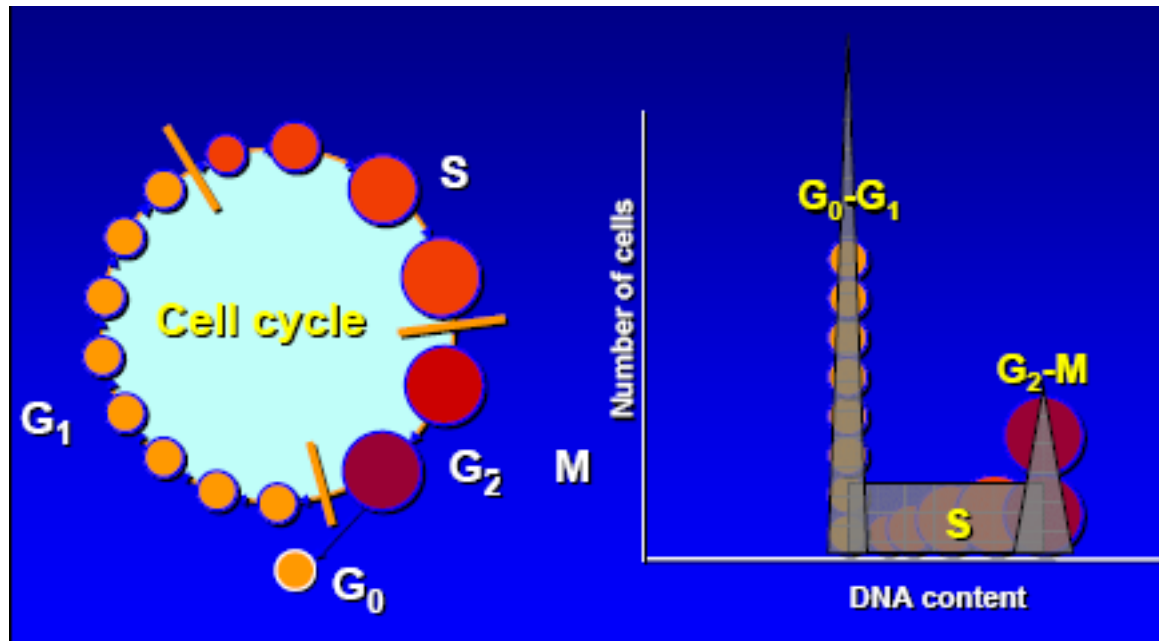
a. *p<0.05; **p<0.01.



细胞周期检测

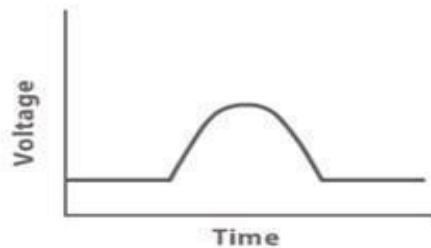
在细胞周期的不同时期，DNA含量存在差异，用DNA染料（如PI）进行染色，可根据DNA荧光强度变化判断细胞所处的细胞周期时期。

常用染料：PI、DAPI、7-AAD、Hoechst 33342...

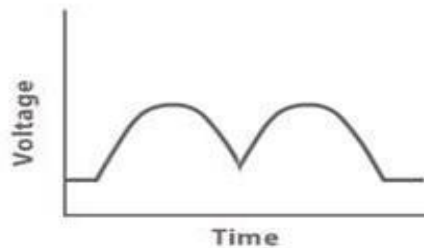
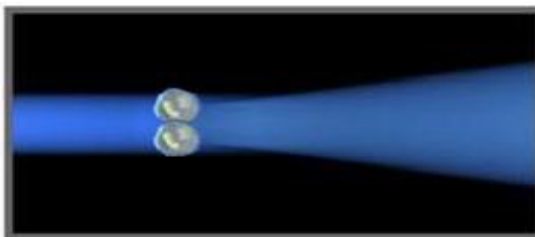


排除粘连体细胞

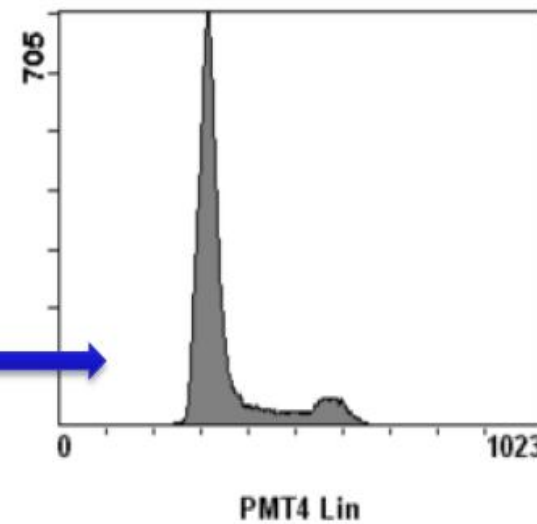
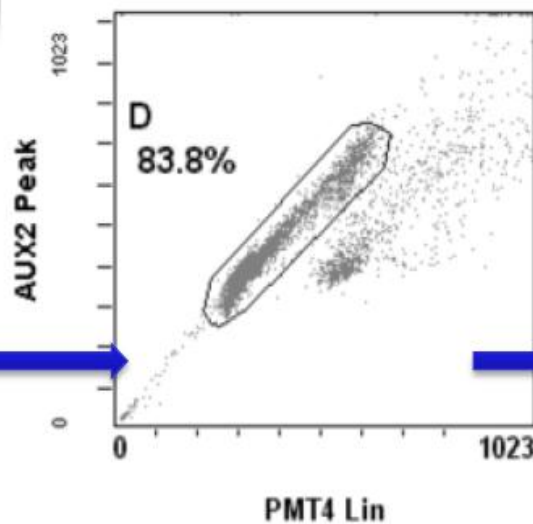
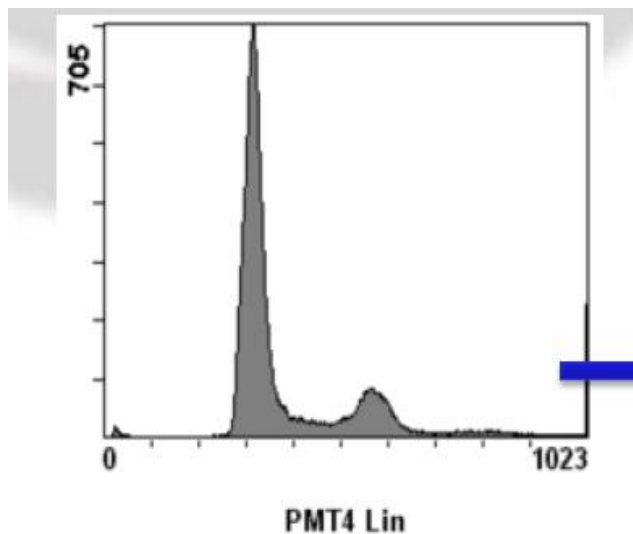
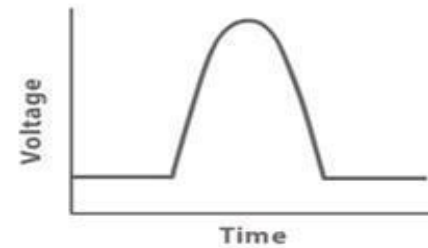
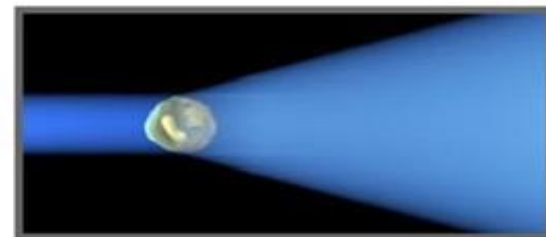
G₀/G₁



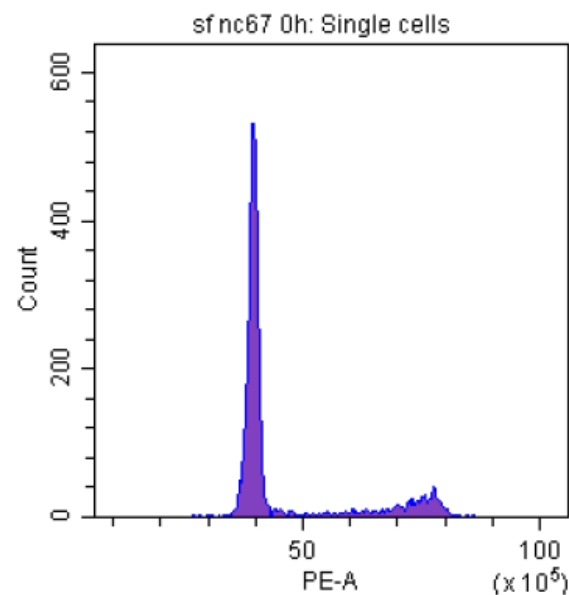
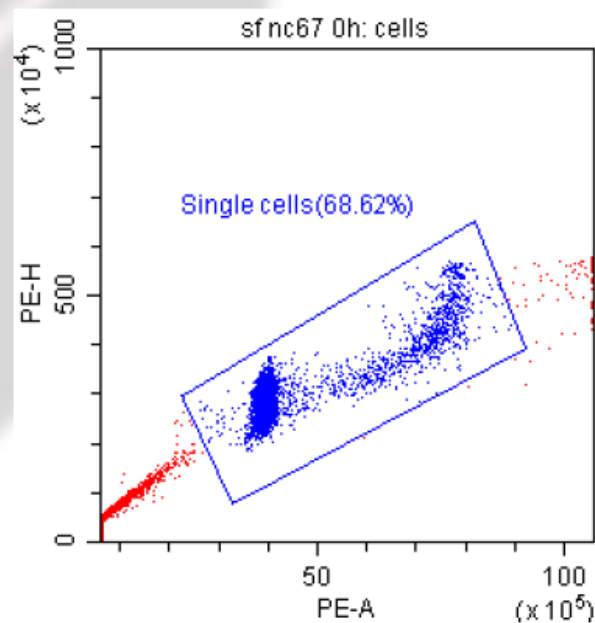
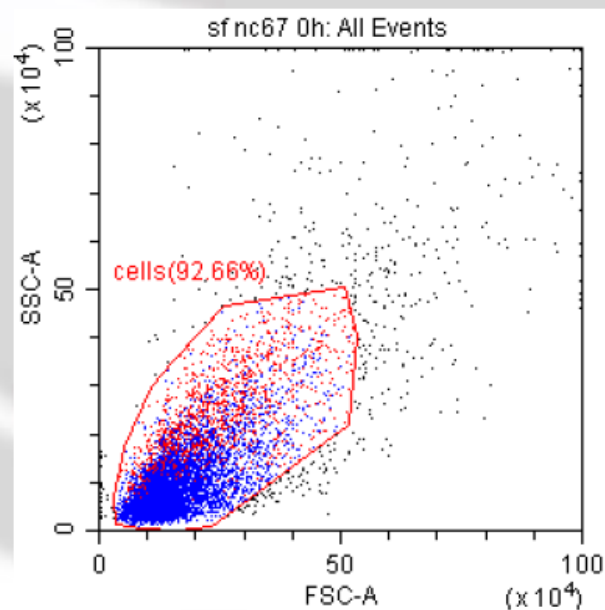
Doublets



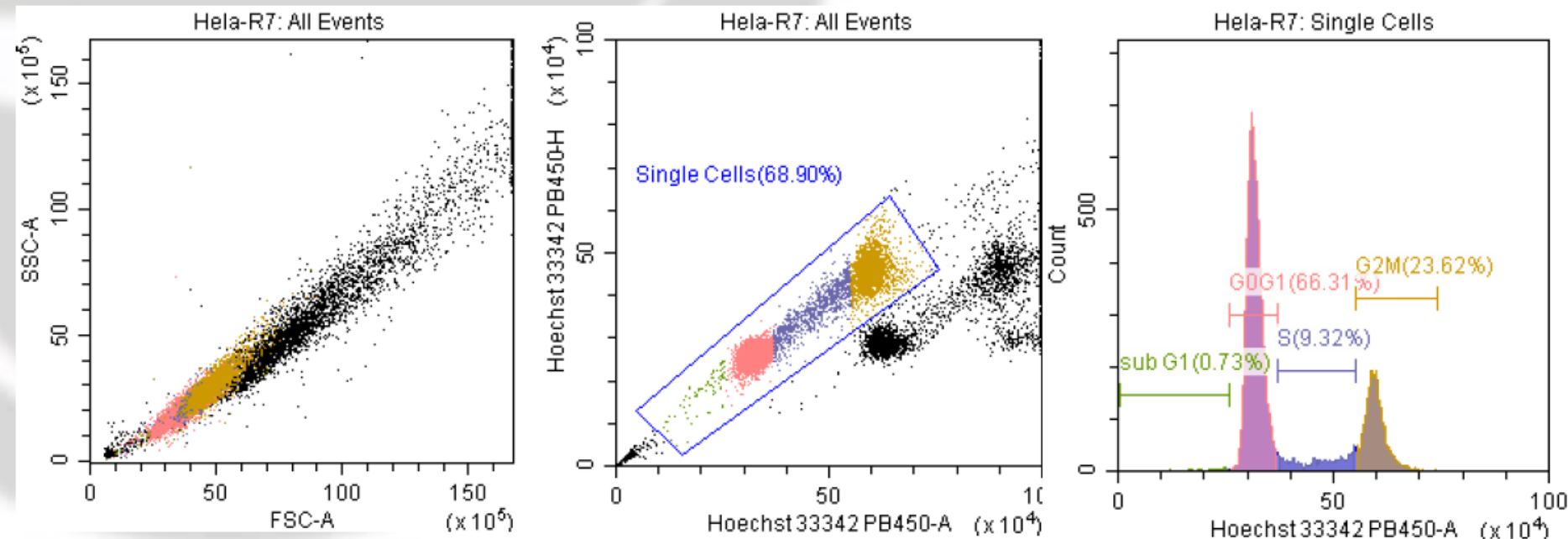
G₂/M



CytoFlex PI 细胞周期检测结果

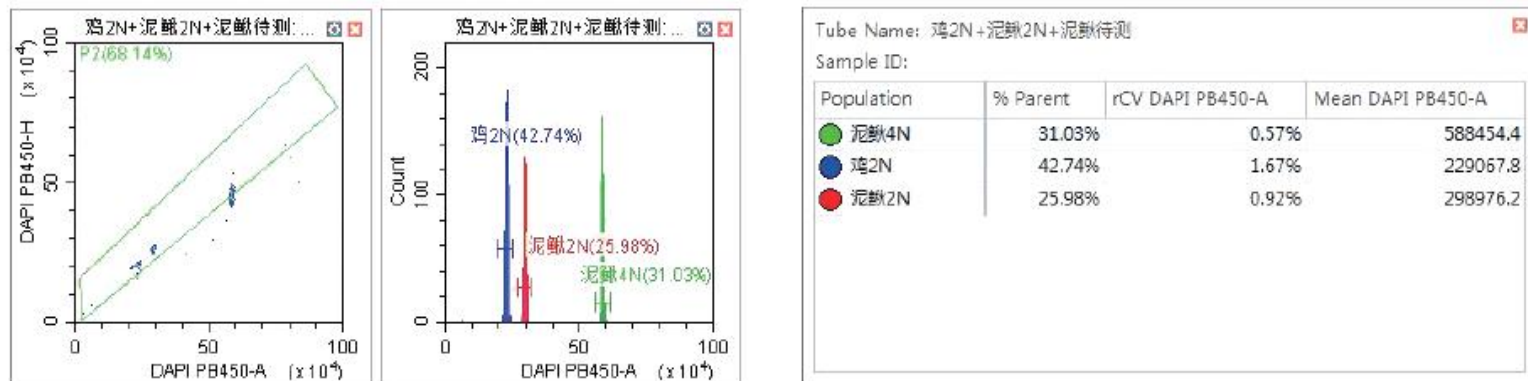


CytoFlex Hoechst活细胞周期检测



注意事项:

1. “细胞去哪里了”？
2. 固定必须用70%冰乙醇，固定时间2h以上
3. 乙醇清洗干净，否则影响RNase的效果



E: 鸡 2N+ 泥鳅 2N+ 泥鳅待测

以鸡红细胞为内参，已知鸡血细胞 DNA 含量值为 2.50 pg/N (Tiersch et al., 1989, Vinogradov, 1998)。

- 待测泥鳅 DNA 含量 = $\frac{\text{待测泥鳅血细胞 Mean 值}}{\text{鸡血细胞 Mean 值}} \times 2.50 = 6.62 \text{ pg/N}$
- 2N 泥鳅 DNA 含量 = 3.26 pg/N

$$3. \frac{\text{待测泥鳅 DNA 含量}}{2\text{N 泥鳅 DNA 含量}} = 2.03 \approx 2$$

$$4. \frac{\text{待测泥鳅 DAPI Mean}}{2\text{N 泥鳅 DAPI Mean}} = 1.97 \approx 2$$

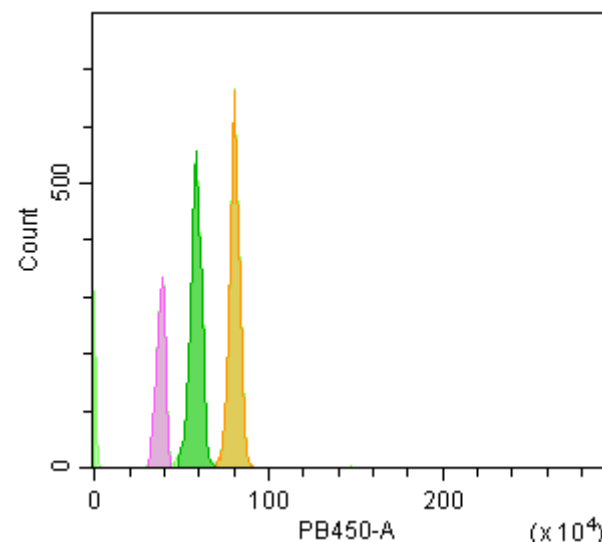
实验结果说明待测泥鳅样本 DNA 含量为二倍体泥鳅 DNA 含量的二倍，DAPI 平均荧光强度也为二倍体泥鳅的二倍，即待测泥鳅为四倍体。

本实验证明凭借 CytoFLEX 流式细胞仪高达 80 mW 功率的 405 nm 激光与最佳的检测灵敏度，能有效地对 DAPI 染料进行检测，且线性度良好。

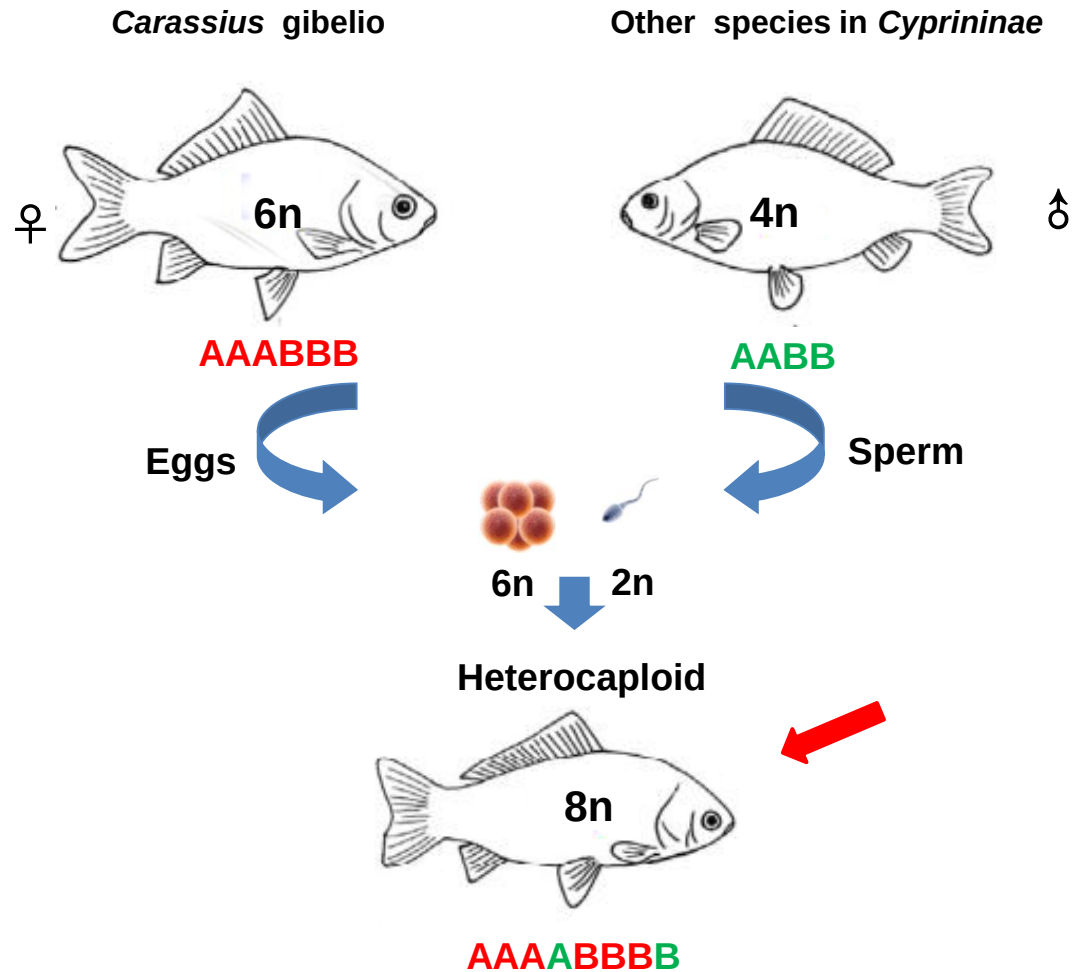
中国科学院水生生物研究所-桂建芳院士

---鱼类遗传育种等相关基础生物学和生物技术研究

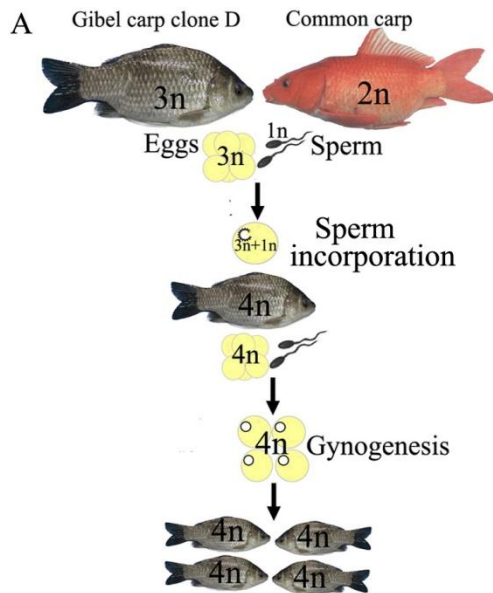
开展多倍体银鲫生殖发育机制研究，证实银鲫存在单性雌核生殖和有性生殖双重生殖方式，原创银鲫育种技术路线，利用银鲫特有的生殖方式，培育出由雄核发育产生的异育银鲫“**中科3号**”。开拓出一条**X**和**Y**染色体连锁标记辅助的全雄鱼培育技术路线。



流式细胞仪在银鲫新多倍体育种中的作用



由于银鲫具有整合整套异源基因组的能力，但自然发生概率很低。因此可以通过流式细胞仪对后代倍性进行快速检测从而筛选出整合有一套或多套异源基因组的银鲫新多倍体。



B

Year and generation	Percent of tetraploid
2008 G0	0.55% (1/180)
2009 G1	79% (79/100)
2010 G2	98% (98/100)
2011 G3	100% (450/450)
2012 G4	100% (100/100)
2013 G5	100% (100/100)
2014 G6	100% (100/100)

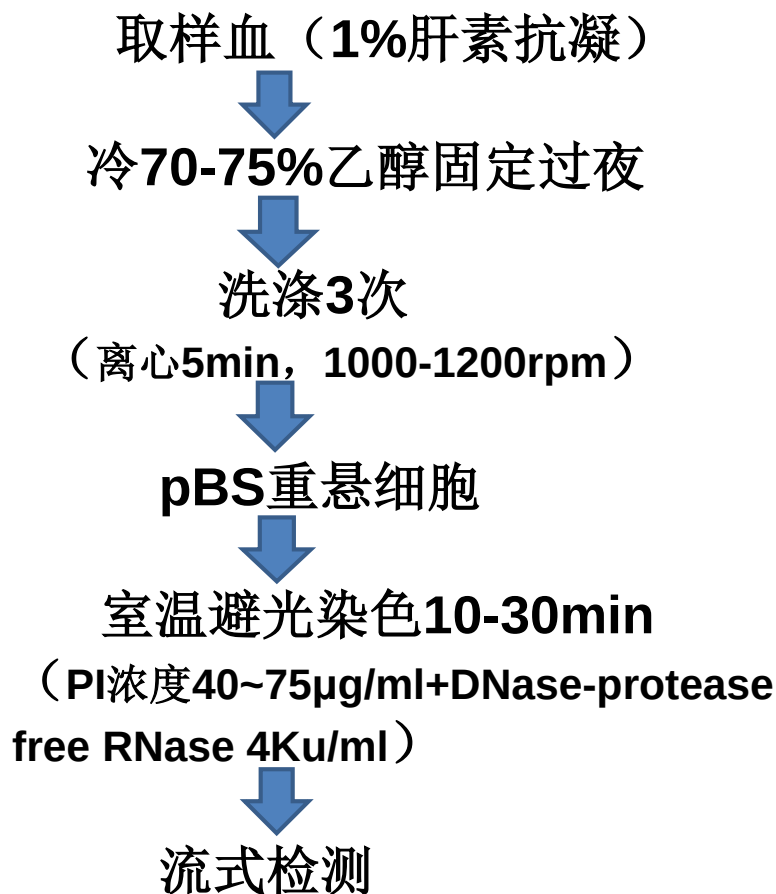


合成异源八倍体异育银鲫 “长丰鲫”

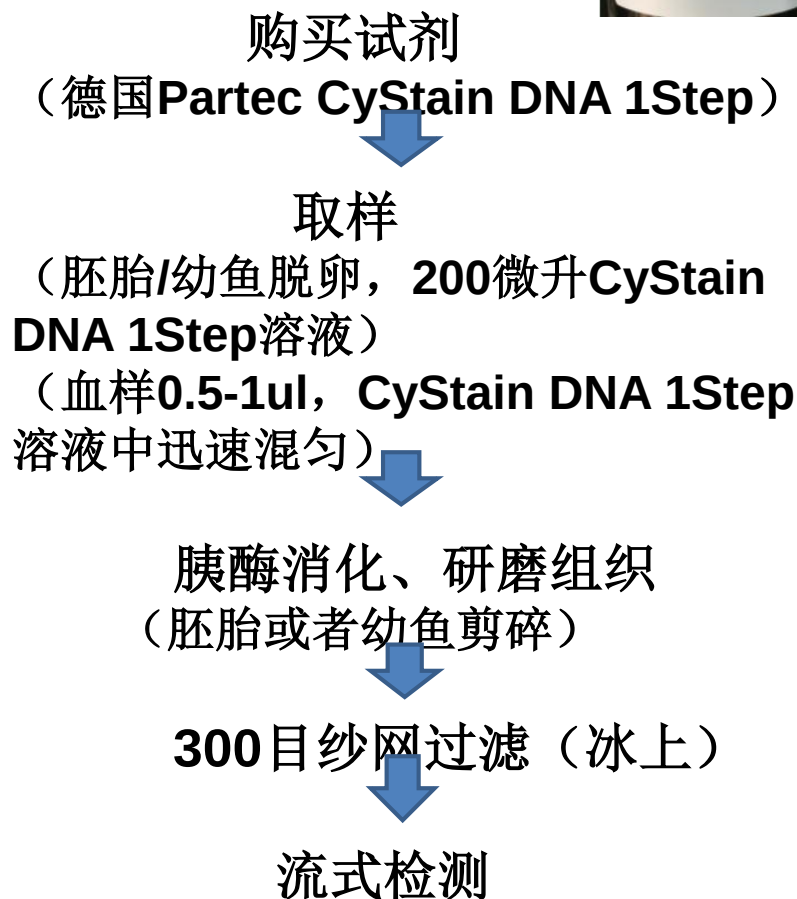
由中国水产科学研究院长江水产研究所和中国科学院水生生物研究所联合培育，以异育银鲫D系为母本，整合有一套兴国红鲤基因组并且具有明显生长抗病优势的合成异源八倍体银鲫新品种“长丰鲫”已于2016年通过国家水产新品种审定，品种登记号为GS-04-001-2015。

流式细胞仪高通量筛选鱼类育种、 基因突变等方面研究

传统方法

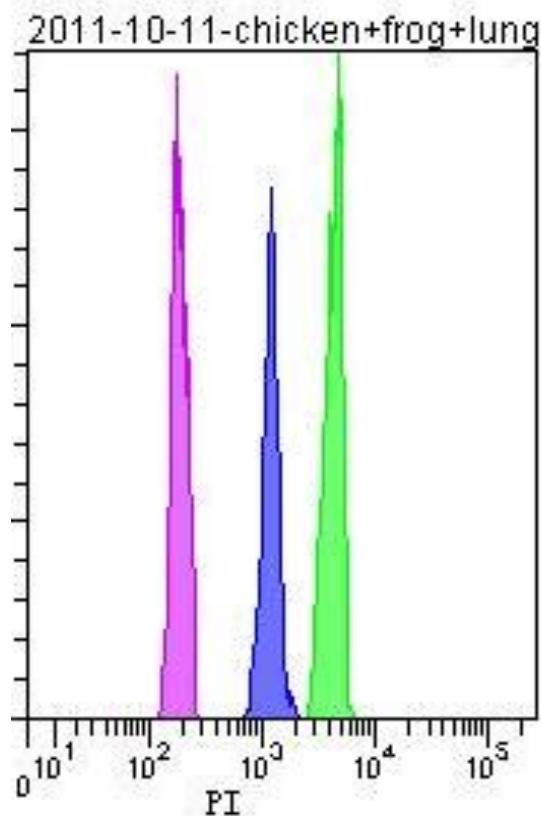


一步法



水生动物基因组大小检测

流式细胞仪检测肺鱼基因组大小 鸡血、蛙血作为肺鱼标准内参

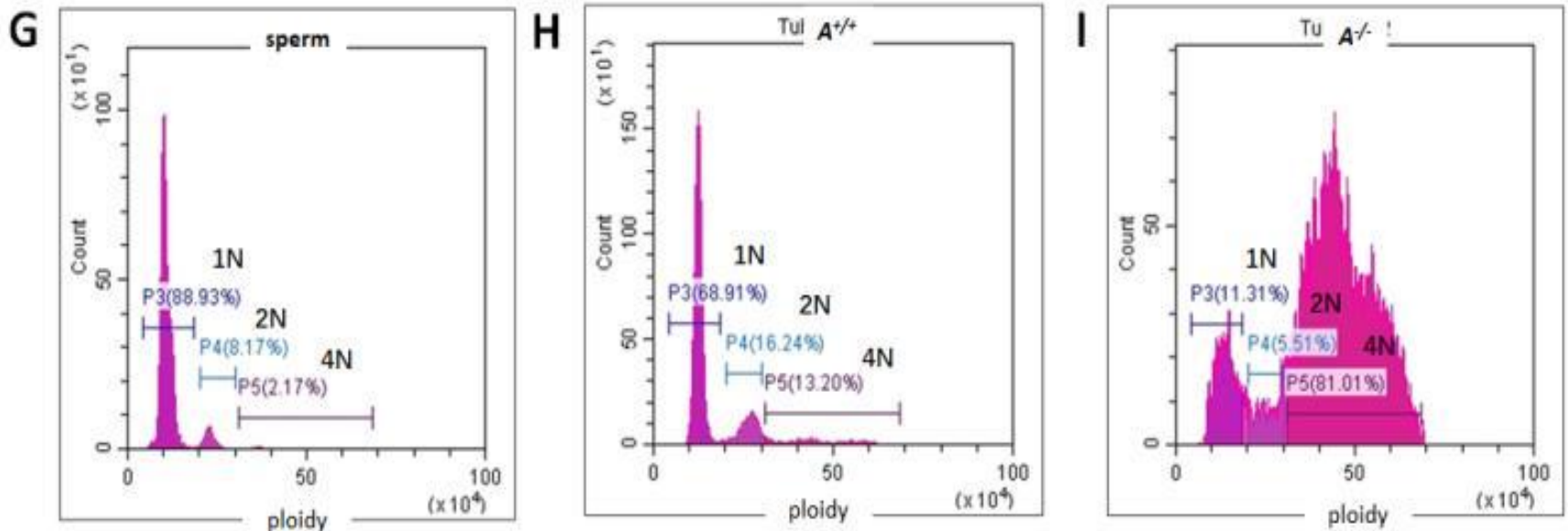


Experiment Name: Experiment_017
Specimen Name: 2011-10-11
Tube Name: chicken+frog+lungfish3
Record Date: Oct 11, 2011 1:57:00 PM
\$OP: Administrator
GUID: cac8aa27-7aaf-46b6-94d0-9afde385d69c

Population	#Events	%Parent	PI
			Mean
lungfish	1,530	9.3	4,195
frog	1,098	6.7	1,174
chicken	1,346	8.2	183

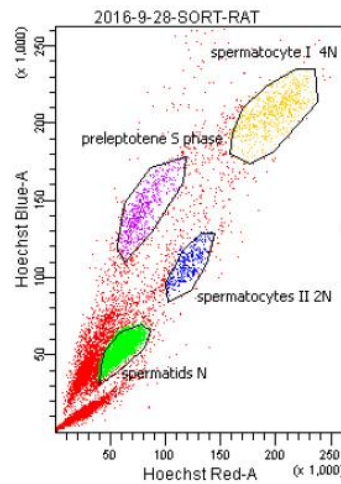
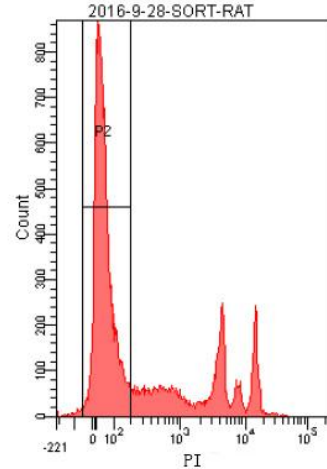
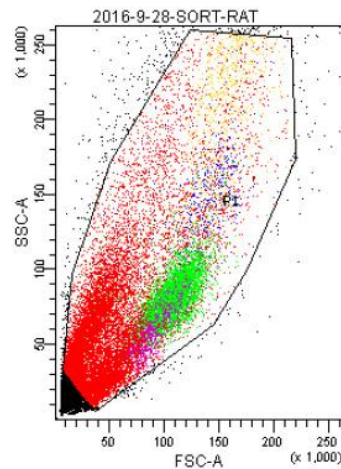
斑马鱼精巢突变体的研究

精子（几乎只有1N），野生型精巢（含精子1N，4N如初级精母，其他的2N如精原细胞等），突变体精巢（从形态学观察没有精子，可能有2N（性腺体细胞），绝大多数可能是4N）



流式分选术在大鼠睾丸生精细胞研究中的应用

正常的精子对于保护物种和遗传多样性具有至关重要的作用。哺乳动物的睾丸生精细胞由精原干细胞，精母细胞，精子细胞等多种细胞构成，这些细胞的大小、形态和染色体数目均有所区别。获得高纯度的不同类型的生精细胞，对于研究不同阶段生精细胞的功能以及减数分裂的发生机制具有重要意义。



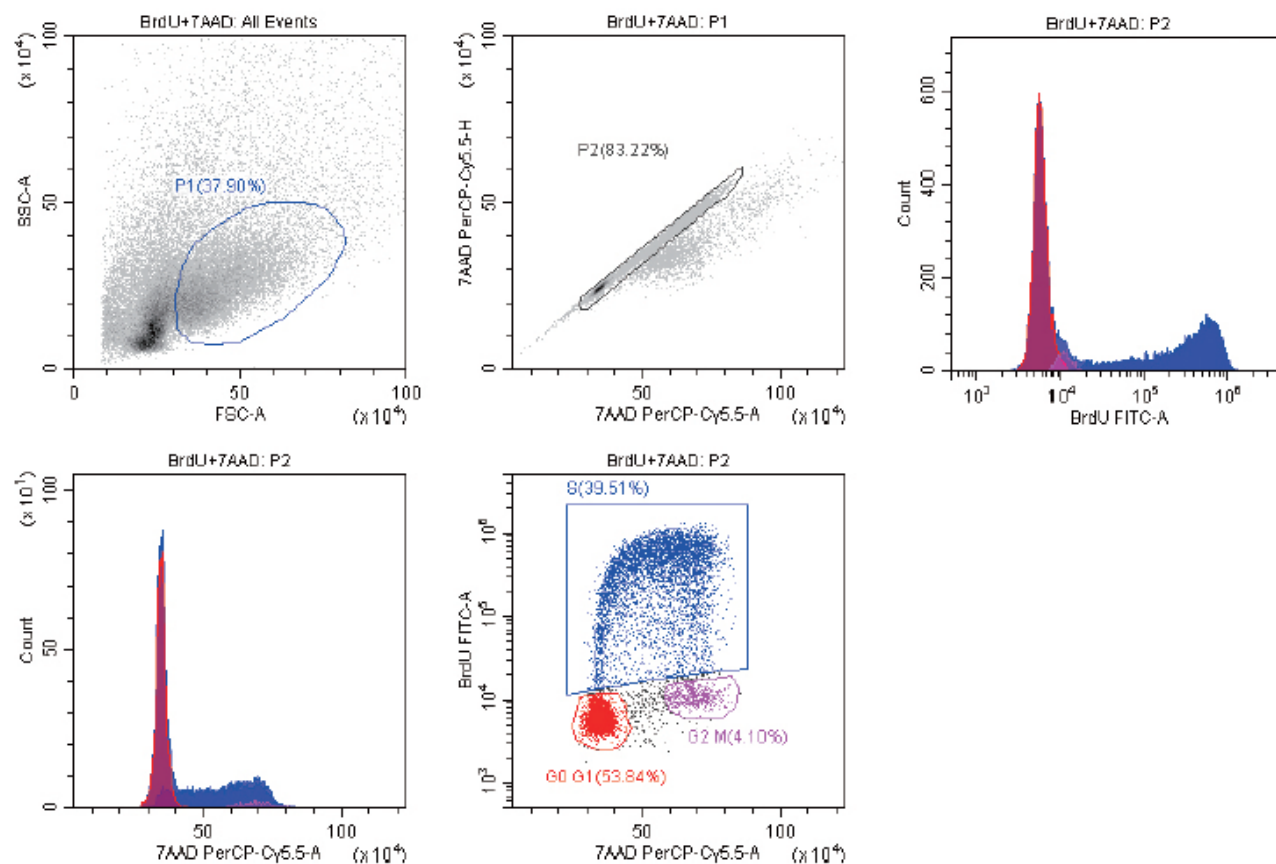
Tube: RAT			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	29,140	###	100.0
P1	20,914	71.8	71.8
P2	13,094	62.6	44.9
spermatids N	3,905	29.8	13.4
spermatocytes II 2N	332	2.5	1.1
preleptotene S phase	545	4.2	1.9
spermatocyte I 4N	607	4.6	2.1

BrdU 细胞增殖

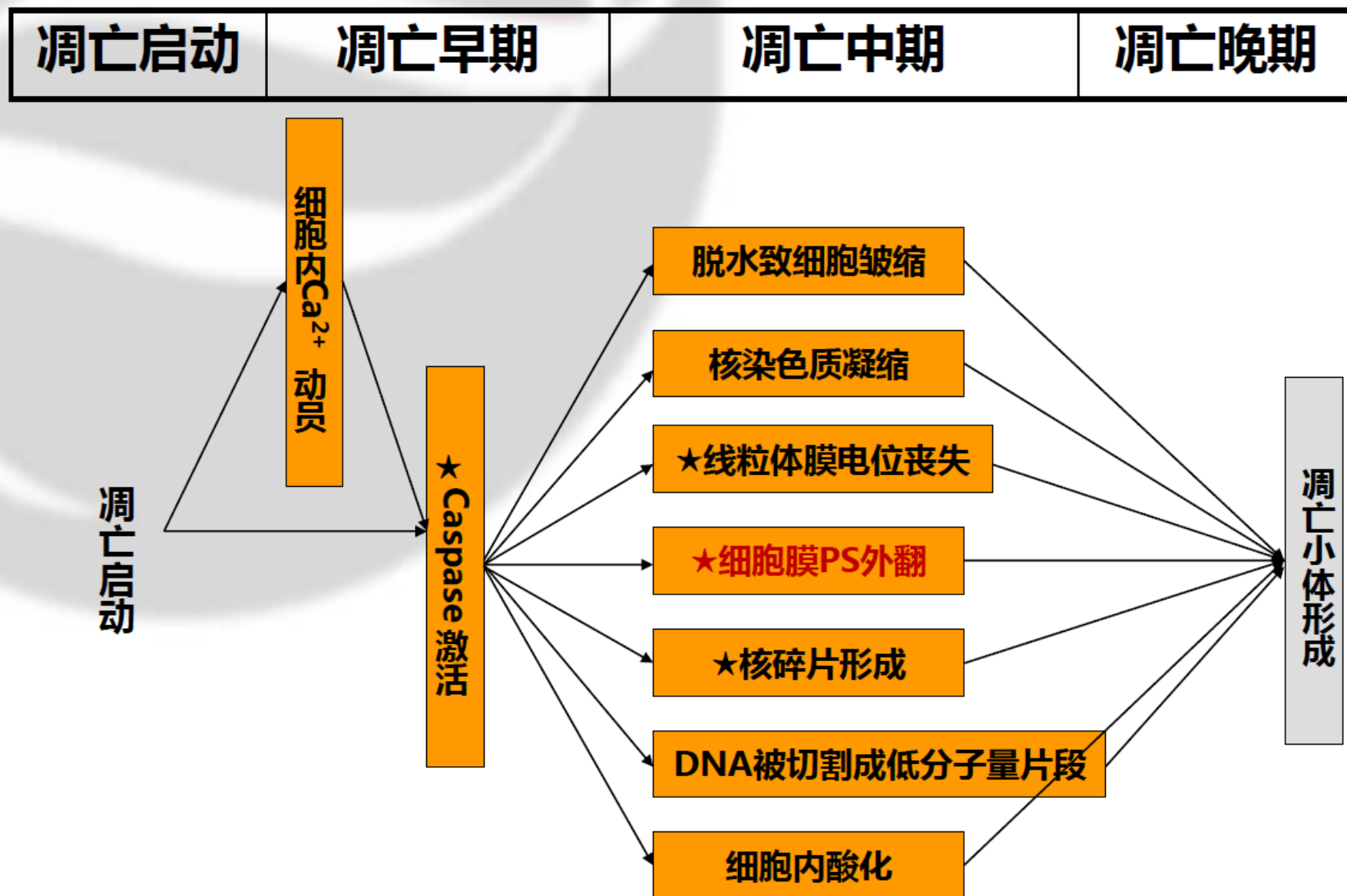
实验简介

5 - 溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU)，是人工合成的胸腺嘧啶 (thymidine) 类似物，在 DNA 合成期 (S 期)，BrdU 能够代替胸腺嘧啶而渗入正在复制的 DNA 分子中，然后用荧光标记的 BrdU 抗体进行染色，就可以对细胞增殖进行检测。

在 BrdU 检测同时加入 DNA 染料同时对细胞周期进行检测，是对细胞同时进行周期、增殖检测的完美流式解决方案。



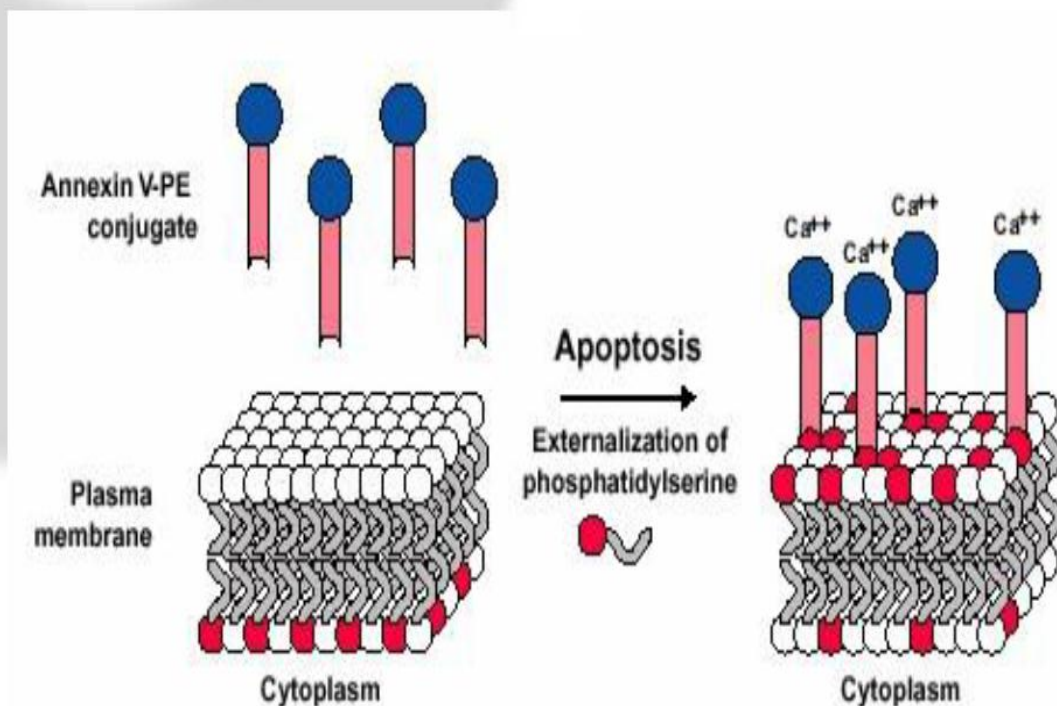
细胞凋亡检测与分析



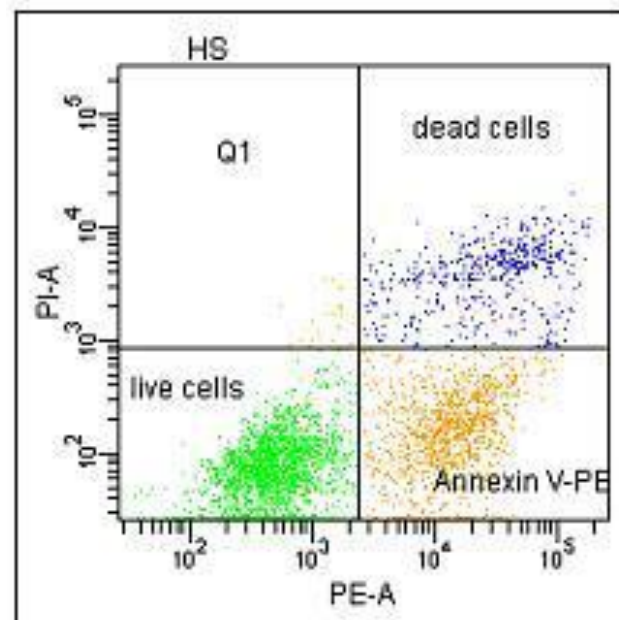
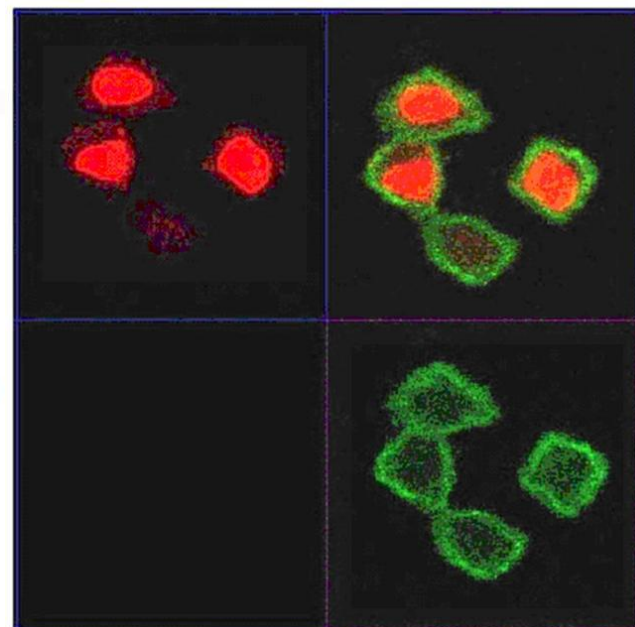
AV+PI双染法

◆ 原理：

膜内侧磷脂酰丝氨酸外翻到膜表面，胞膜结构仍然完整。



Schematic representation of the Annexin V assay.



AV+PI双染法

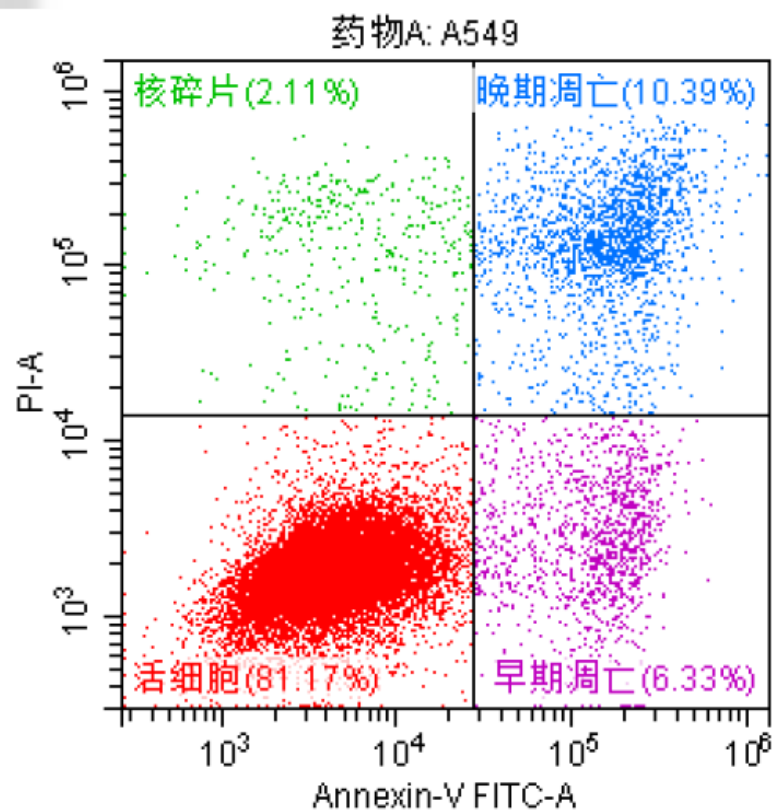
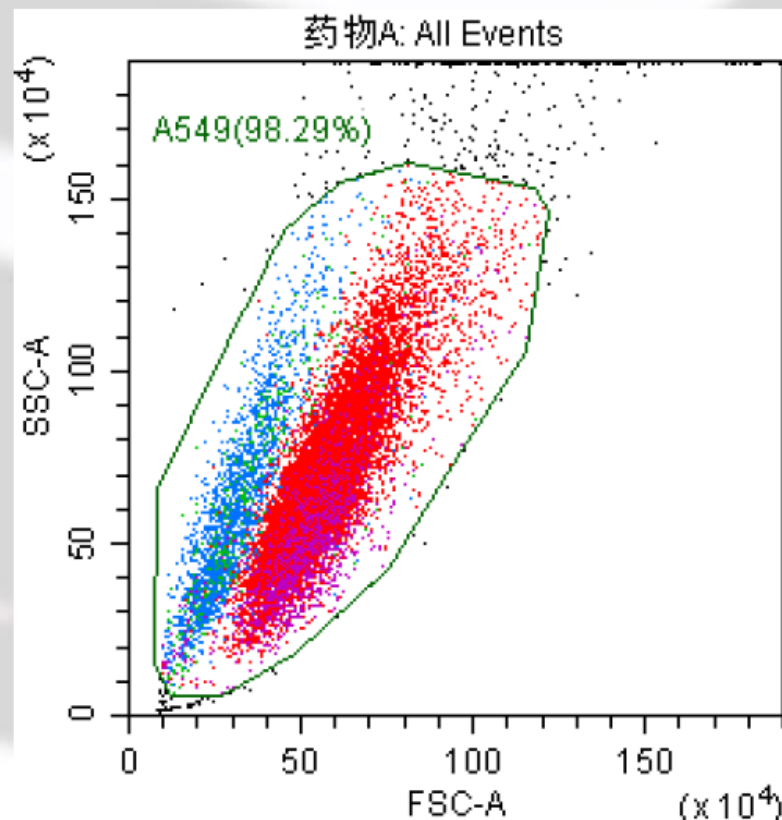
➤ 对照设置

- ① 未染细胞
- ② 单染细胞（建立凋亡模型，必须有凋亡群体存在，用于补偿调节）
- ③ 实验样本

➤ 制备方法

- ① 细胞、组织消化，不加**EDTA**
- ② 分散细胞（不宜过度吹打，**3~5**次为宜）
- ③ 水平离心细胞，**<800g**，
- ④ 收集培养瓶或板中上清的细胞
- ⑤ 当天上机检测。

CytoFlex细胞凋亡检测结果



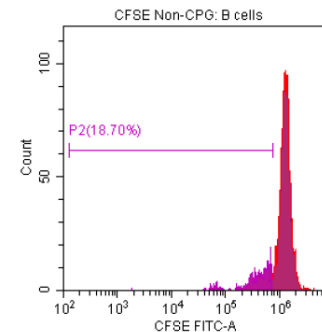
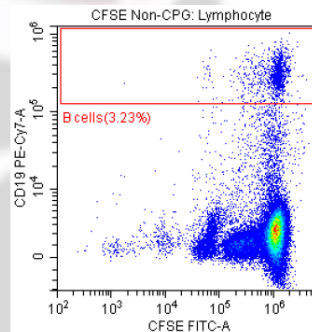
注意：也需要调节补偿，自动调节补偿，生成的补偿矩阵随电压变化而变化
好处：实验室里有一个人做单染管调节补偿后，其它的人，无论做什么类型细胞的凋亡，都不用再做补偿

细胞增殖检测

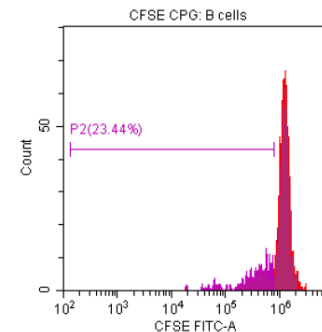
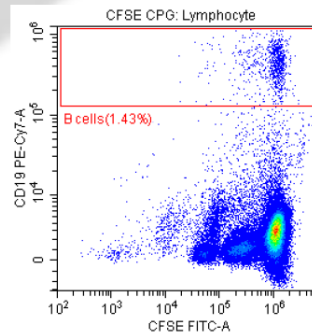
荧光染料CFSE能够轻易穿透细胞膜，在活细胞内与胞内蛋白共价结合，水解后释放出绿色荧光。在细胞分裂增殖过程中，它的荧光强度会随着细胞的分裂而逐级递减，标记荧光可平均分配至两个子代细胞中，因此其荧光强度是亲代细胞的一半，根据这一特性，它可被用于检测细胞增殖，细胞周期的估算及细胞分裂等方面

CytoFlex细胞增殖检测结果

实验组：

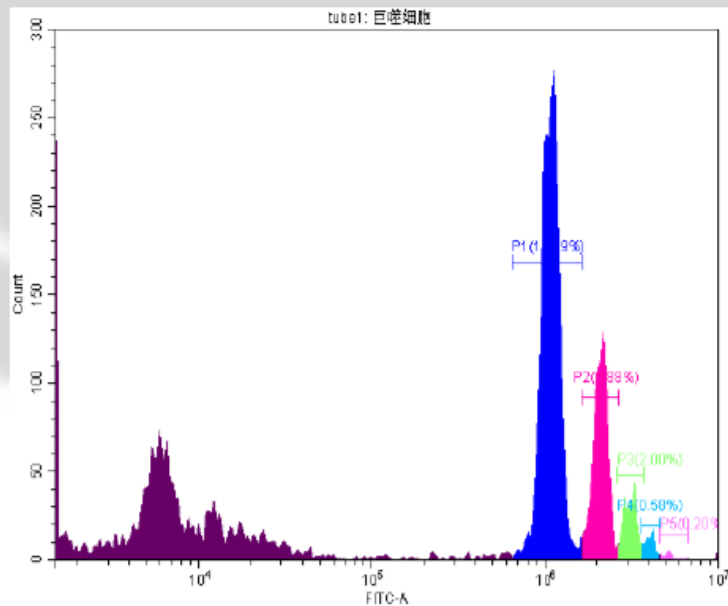


对照组：



细胞吞噬功能

巨噬细胞承担着吞噬、消除细胞内寄生菌、真菌，和清除衰老的自身细胞的职能，它在特异性体液免疫或细胞免疫应答中都有重要作用，所以巨噬细胞的吞噬消化功能，在一定程度上可以反映机体的免疫状态



Population	Events	% Total	% Parent	Events/ μ L(V)
● All Events	58135	100.00%	100.00%	1095.81
● 巨噬细胞	11657	20.05%	20.05%	219.73
● P1	2225	3.83%	19.09%	41.94
● P2	802	1.38%	6.88%	15.12
● P3	233	0.40%	2.00%	4.39
● P4	68	0.12%	0.58%	1.28
● P5	23	0.04%	0.20%	0.43

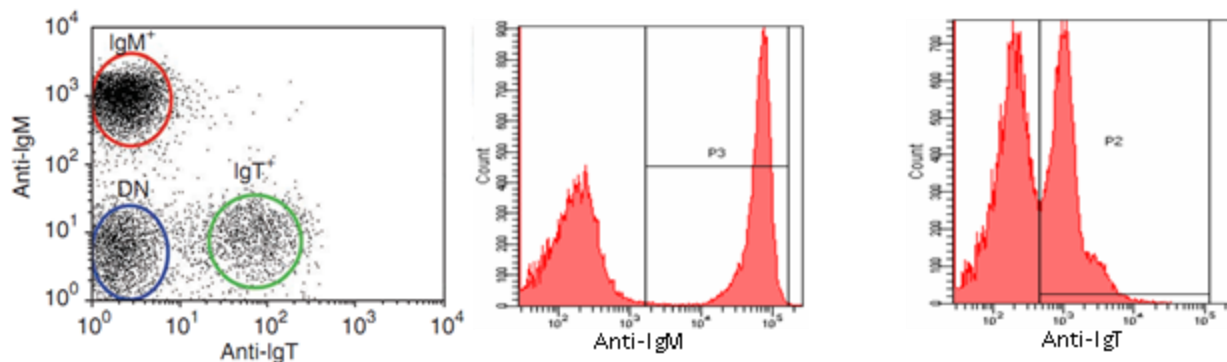
流式分选术在鱼类免疫球蛋白研究中应用

在硬骨鱼中，一直以来都认为只存在IgM和IgD两类比较保守的免疫球蛋白分子，2005年一种新型的免疫球蛋白IgZ/IgT在斑马鱼和虹鳉中被发现，2010年其功能在虹鳉中被验证，与哺乳动物IgA类似在黏膜免疫中发挥主要作用。由IgM和IgT的基因组结构及抗体分选可知，虹鳉体内存在IgM⁺IgT⁻和IgM⁻IgT⁺两种类群的B淋巴细胞。



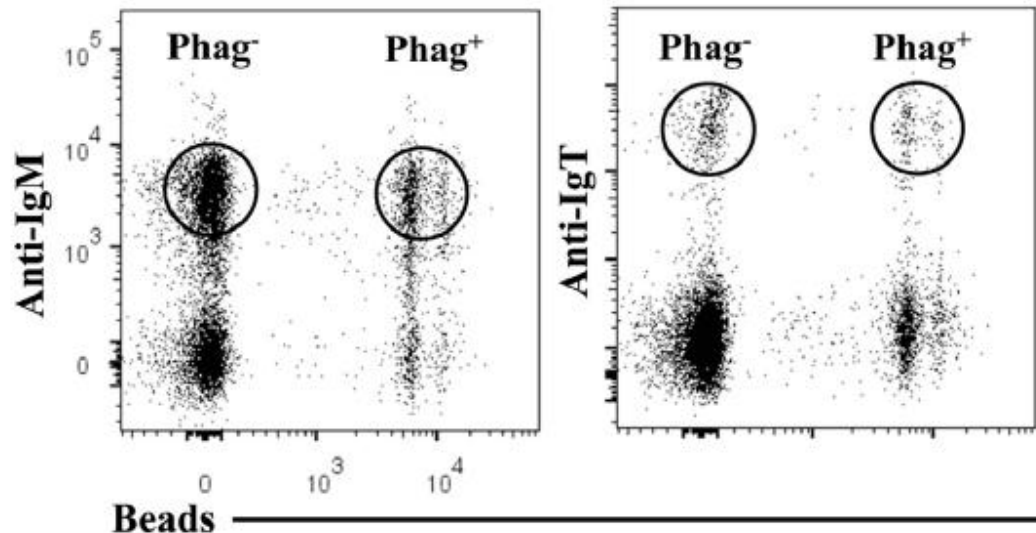
结果

利用抗IgM和IgT的抗体可以将虹鳉PBL中的B淋巴细胞分为IgM⁺IgT⁻和IgM⁻IgT⁺两种类群。为后续研究IgT的功能奠定基础。

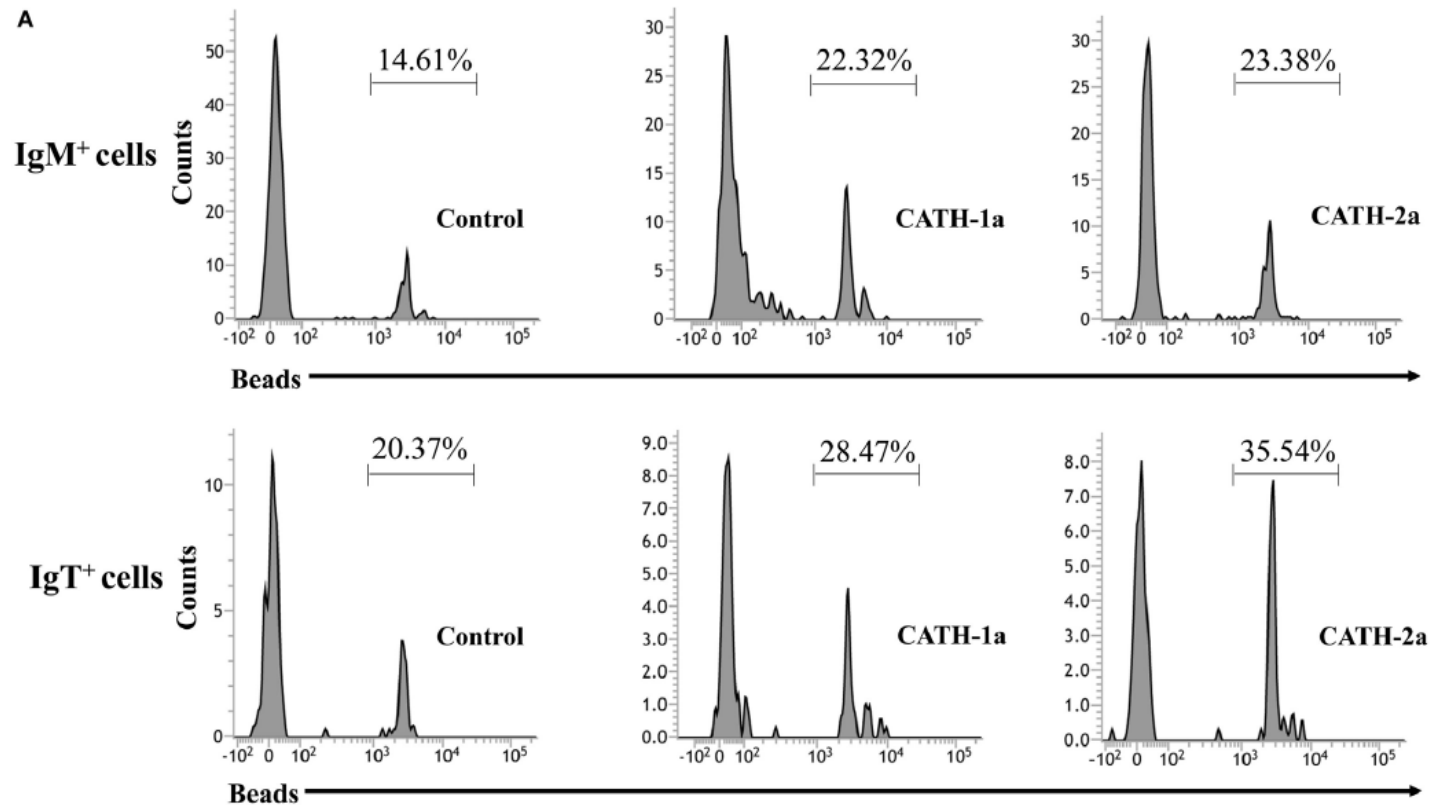


流式分选术在鱼类B细胞研究中的应用

在哺乳动物中，吞噬作用主要由专职吞噬细胞（例如单核细胞和巨噬细胞）来完成，而B细胞缺乏吞噬能力；但是在硬骨鱼类中，B细胞具有吞噬能力，2006年，B细胞的吞噬能力首次在虹鳉被验证，表明硬骨鱼类B细胞在先天免疫中有着某些不同于哺乳类B细胞的功能，同时也预示着B细胞和巨噬细胞之间可能存在着进化上的关系。



抗菌肽是先天免疫中的一类重要分子，可以调节巨噬细胞的功能，在虹鳟中，抗菌肽能够促进B细胞的吞噬活性，为阐明B细胞和巨噬细胞之间进化上的关系提供了新的证据。



囊泡检测

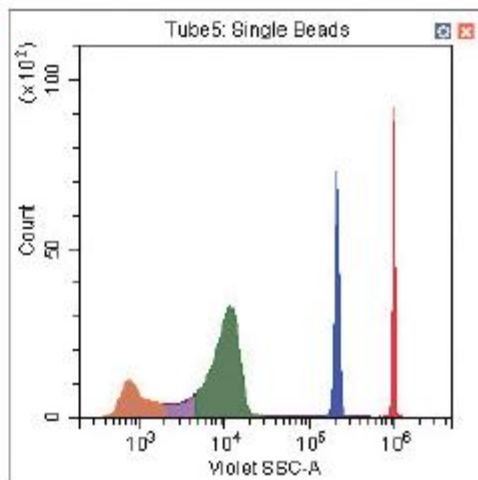
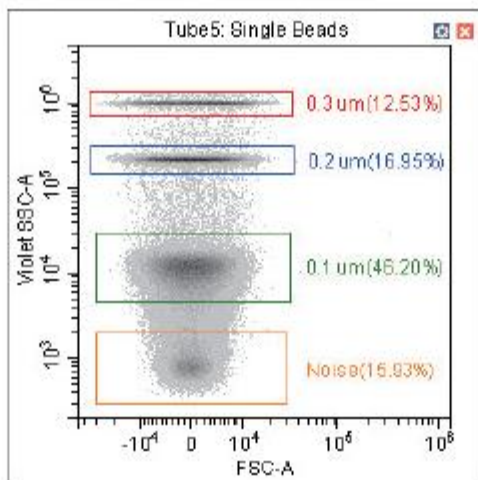
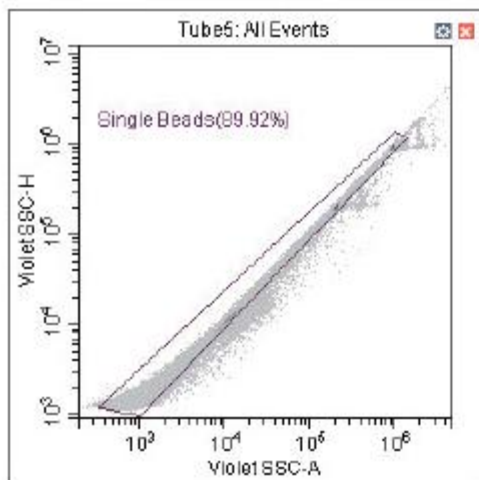
实验简介

囊泡天然存在于体液中，并稳定携带了一些重要的信号分子。囊泡相关功能的研究已经成为研究热点，并有望在多种疾病的早期诊断中发挥作用。通常因流式细胞仪无法检测低于 250nm 的颗粒，因而并不是检测囊泡微颗粒的最佳选择。而贝克曼库尔特公司 CytoFLEX 流式细胞仪的问世，为流式检测囊泡微颗粒开辟了蹊径。CytoFLEX 是第一台可检测 100 nm 微颗粒的流式细胞仪，并具有可同时检测 13 色荧光、单个样本存储量大等优秀性能，为微颗粒的检测提供了理想的检测平台。

微颗粒检测

实验简介

为了探究 CytoFLEX 仪器对微颗粒的分辨能力，该实验采用 PCS Control Mixed Kit (Beckman Coulter, 6602336) 中 100 nm, 200 nm 和 300 nm 的微球颗粒作为研究对象，验证 CytoFLEX 仪器是否能准确分辨噪音信号，100 nm, 200 nm 和 300 nm 微球。



水体藻类的分类和多样性研究

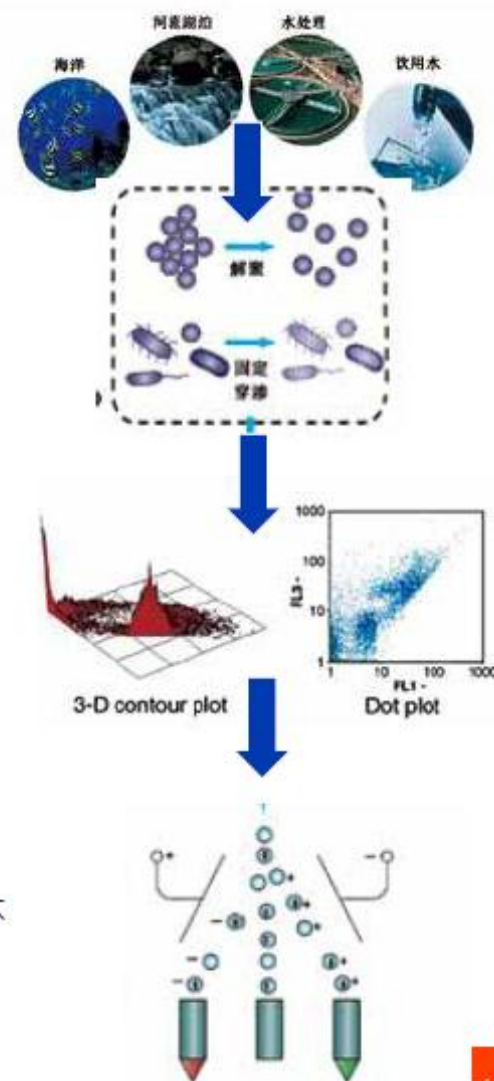
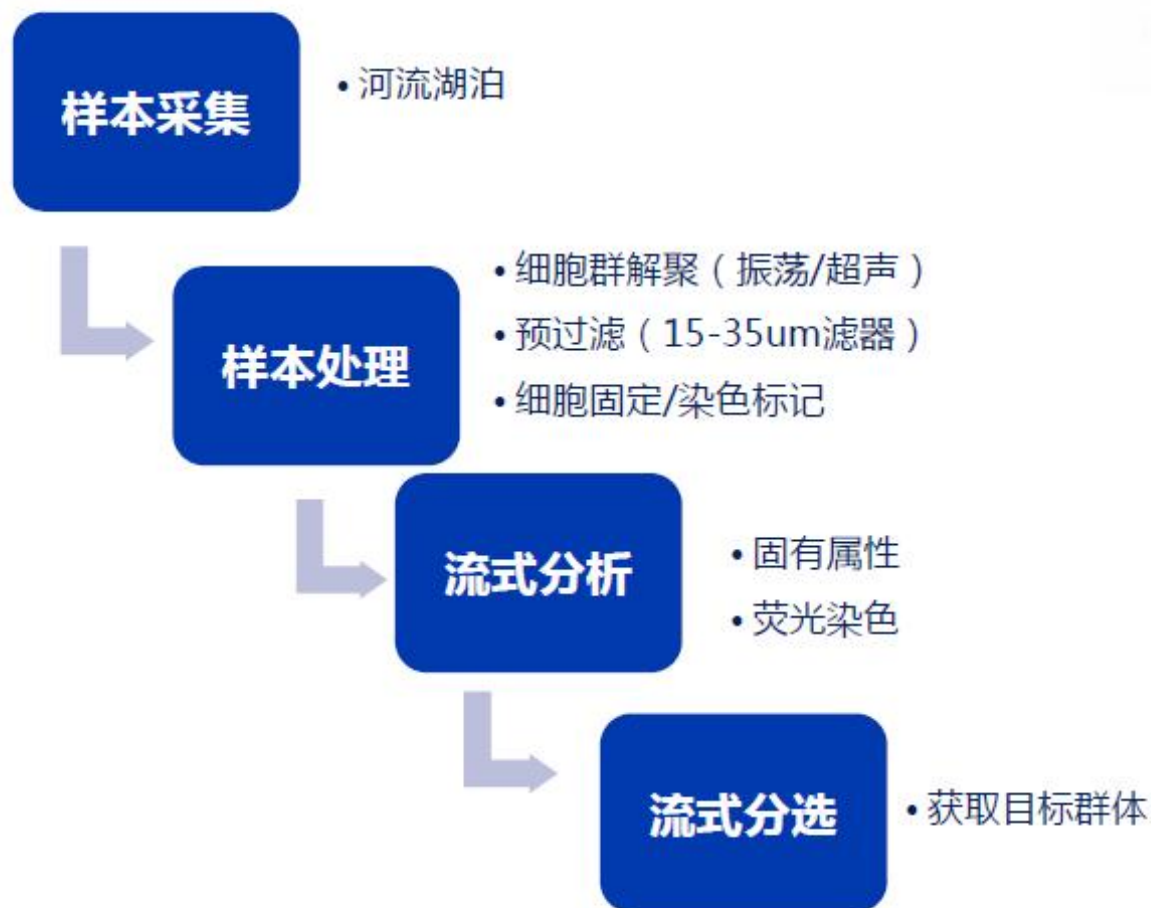
水生浮游植物种类多、数量大、分布广，是生态系统中不可或缺的一环。

水生浮游植物的群落、数量及分布信息对于了解淡水生态系统动力学具有重要意义。

对淡水生态系统保护、资源的开发利用提供理论支持。

流式细胞术可以根据浮游植物固有性质(细胞大小和颗粒度，色素自发荧光)或结合荧光染料，对其进行分群，并同步研究个类群的数量和生理生化变化。

流式细胞术在水体研究中的应用策略



流式细胞术研究藻类的自发荧光光谱

自发光	激发波长	发射波长
叶绿素a (Chlorophyll a)	400-600 nm 480 nm, 650 nm	680 nm
藻蓝素 (Phycocyanin)	400-620 nm 610 nm	660 nm
藻红素 (Phycoerythrin)	400-550 nm 550 nm	580 nm

蓝藻计数

实验简介

蓝藻是水体中的常见藻类，在适宜的温度下会大量生长，导致“绿潮”，是水质检测中常见的检测项目。蓝藻富含叶绿素，叶绿素在蓝光激发下有红色自发荧光，流式细胞仪可利用这一特性将蓝藻与水中的自养细菌区分开来，进行计数。

材料与方法

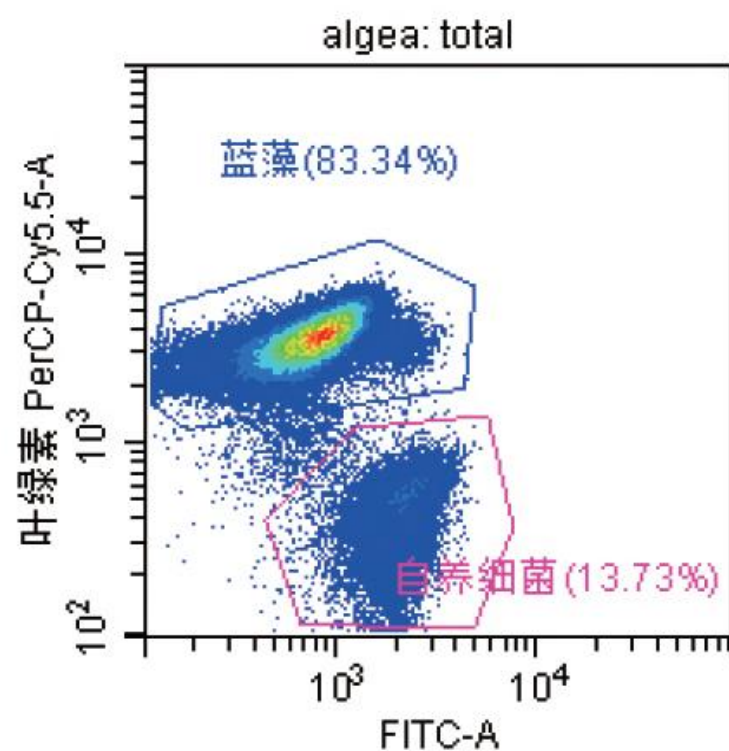
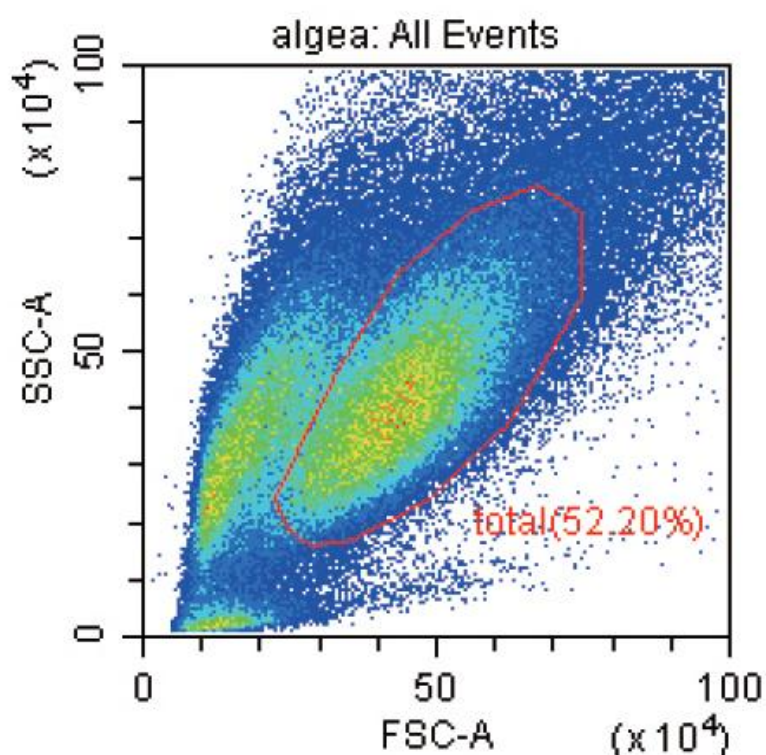
试剂

Laser	405 nm					488 nm					638 nm		
Fluor	KrO	PB	V610	V660	V780	FITC	PE	ECD	PC5	PC7	APC	APCA 700	APCA 750
Marker									叶绿素				

样品制备

Sample Type	Species	Age of specimen	Prep Method
	蓝藻	新鲜	300 目滤网过滤检测

实验结果



Tube Name: algea

Sample ID:

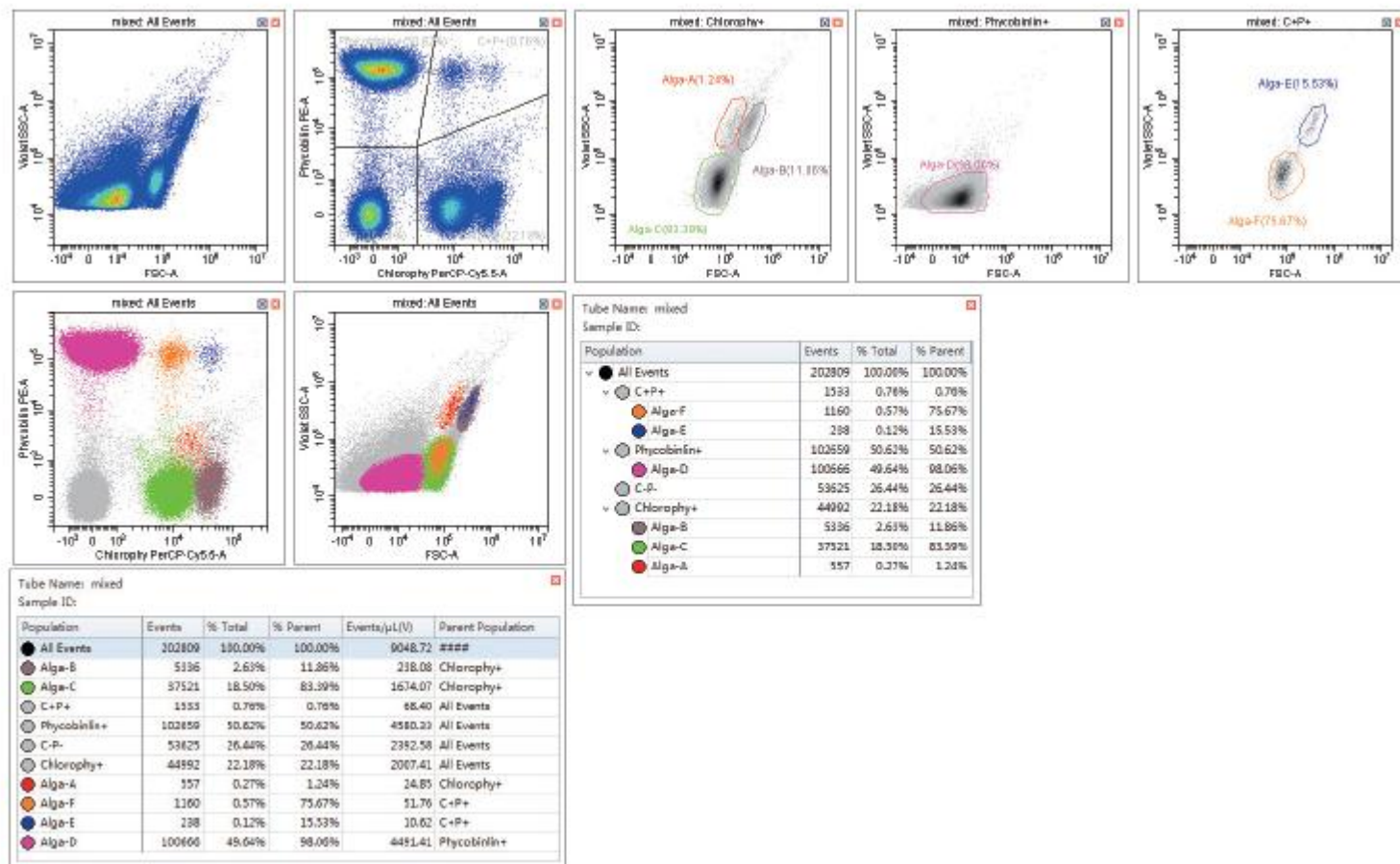
Volume(μ L): 3.7

Population	Events	% Parent	Events/ μ L(V)
● 蓝藻	77090	83.34%	20704.57
● 自养细菌	12697	13.73%	3410.12

藻类分类计数

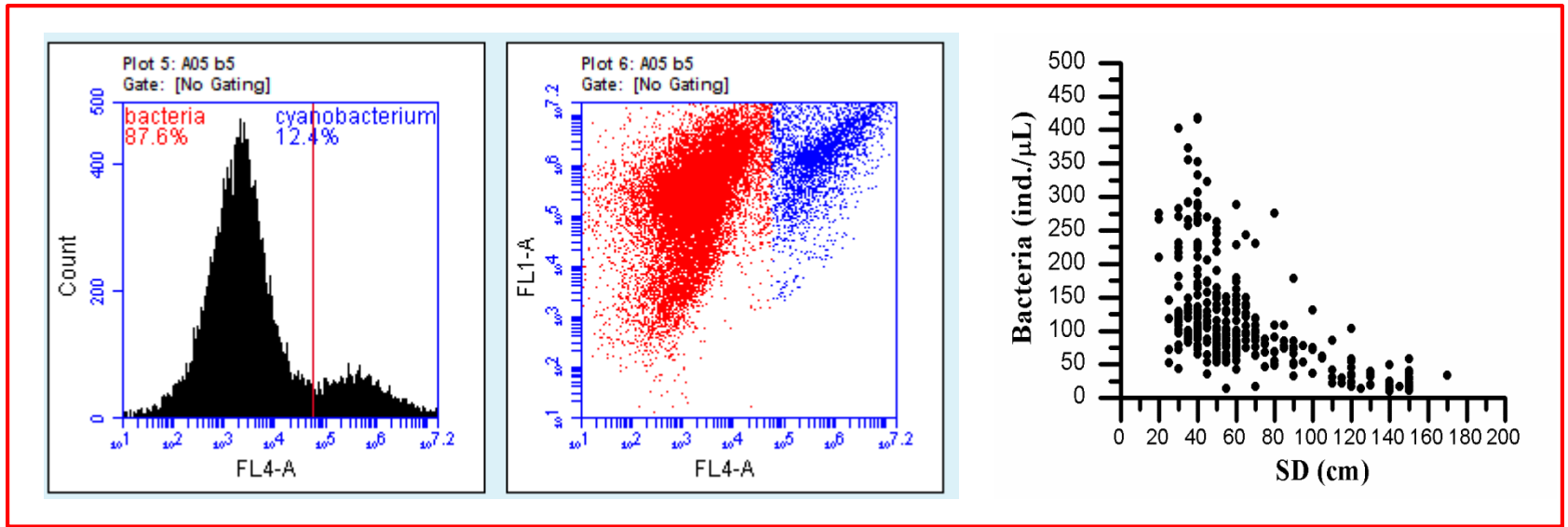
实验简介

利用藻胆素 (phycobilin) 和叶绿素 (chlorophyll) 含量不同和细胞大小的不同用以进行混合样本中不同藻类的分类计数, 这有利于环境生物学, 海洋学研究者对混合样本进行分类研究。本实验中采用微球 (0.3 μm , 0.5 μm , 3 μm , 6 μm , 10 μm) 进行大小测定, 海藻物种基于客户要求仅以 ABCD 替代。



蓝藻和浮游细菌生物量的动态变化及其对湖泊水体透明度的影响

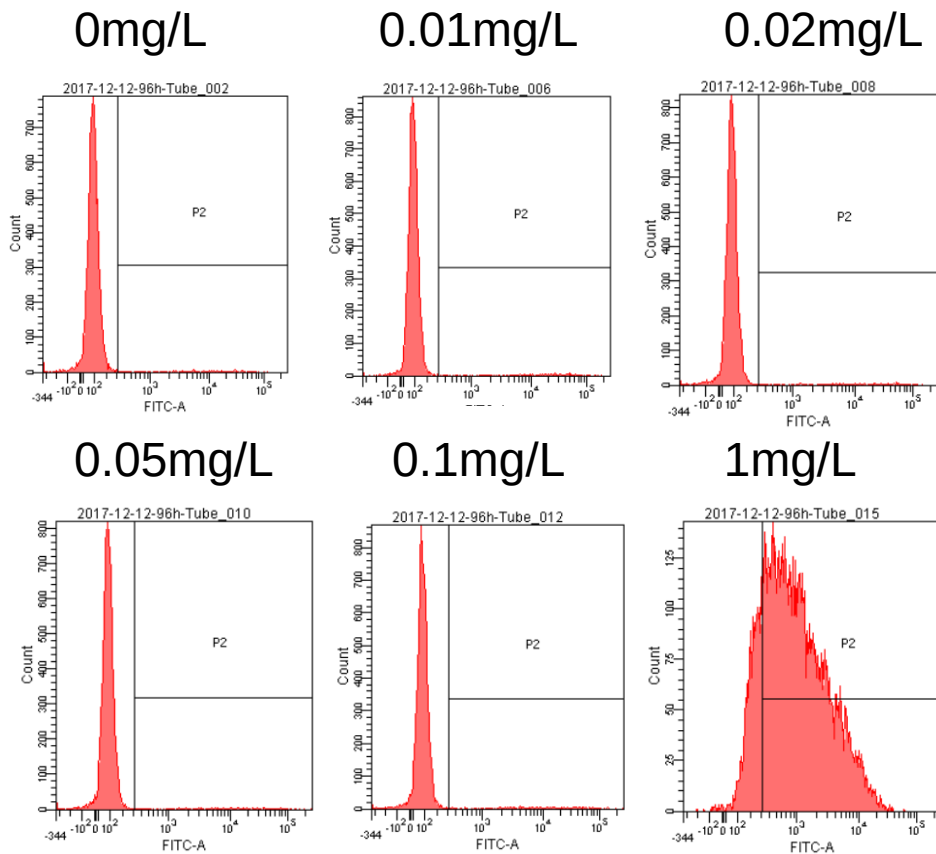
Bacterioplankton dynamics and its relations to the transparency of Lakes Chunbo Wang, Xingqiang Wu, Bangding Xiao* (滇池) (Unpublished)



用流式细胞仪BD Accuri C6 分析水样中浮游细菌的生物量。采集的水样用40 μ m细胞过滤器过滤之后用with SYBR Green I染色，再用流式细胞仪分析。图中红色的部分表示细菌，蓝色的部分表示小于40 μ m的蓝藻。

藻类细胞活性检测

不同浓度百草枯处理下微囊藻活性检测



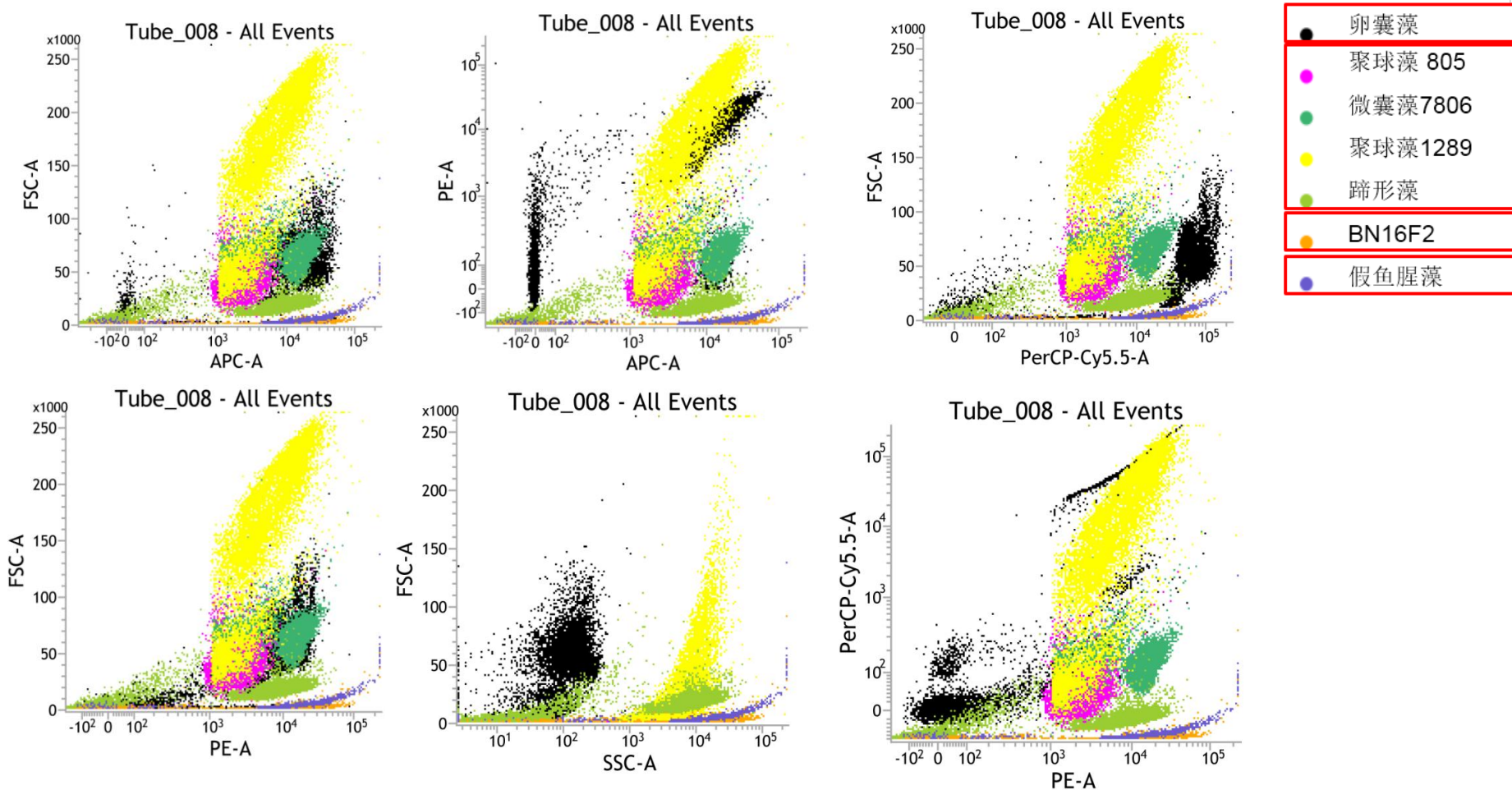
- 流式细胞术分析采集不同浓度百草枯96h处理下的微囊藻细胞膜损伤程度，样本经SYTOX™ Green（死细胞染料）染色处理。

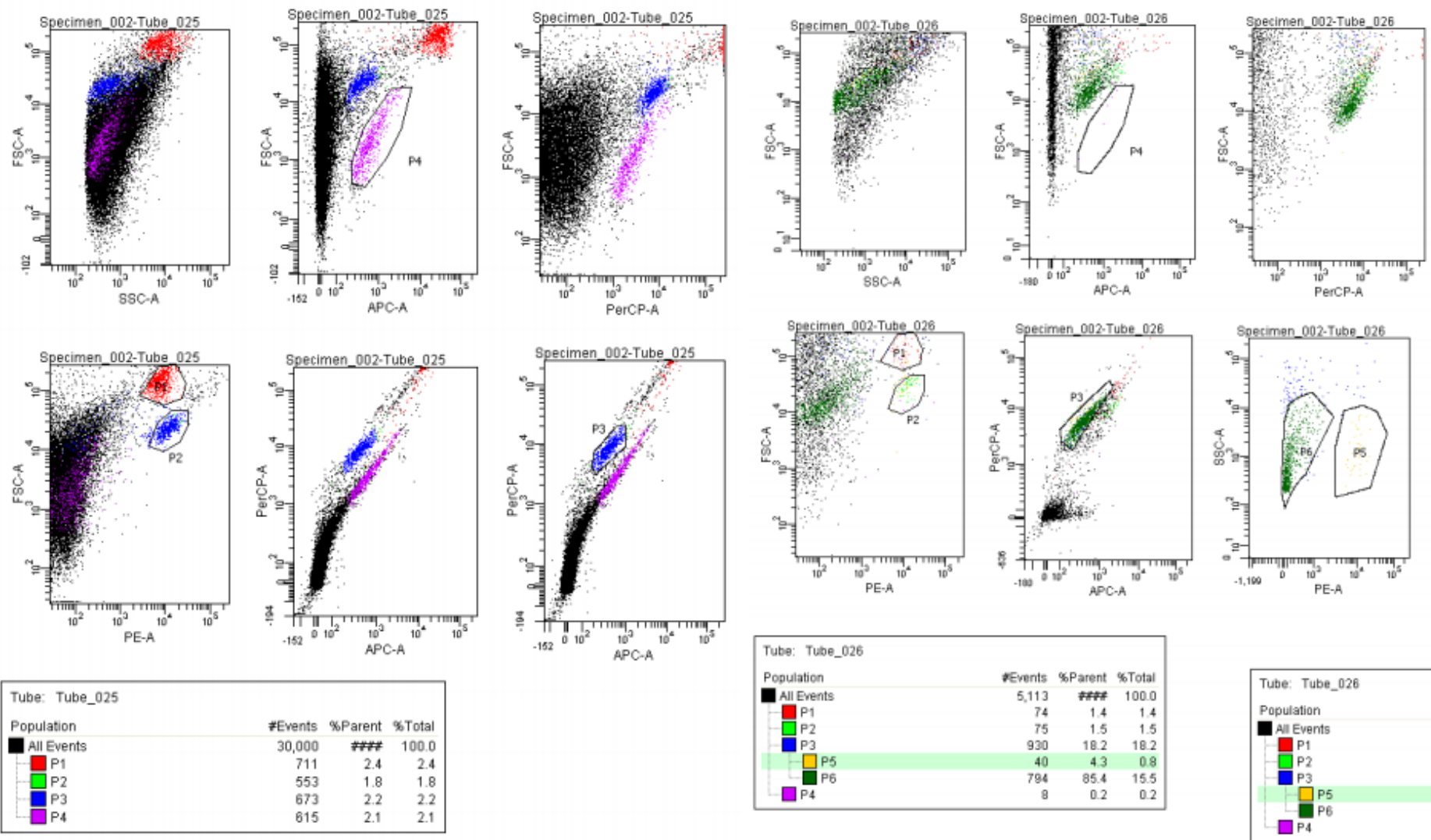
Treatment concentration (mg/L)	The percent of cellular membrane damage (%)
0	2.9
0.01	3.15
0.02	3.2
0.05	3.4
0.1	3.8
1	82.1

藻微标准品确定野外的物种所落的位置和数量

以7种形状、大小以及所含色素种类不同的藻株为标准品，确定不同类群

浮游植物在流式细胞仪不同参数分析情况下的具体位置

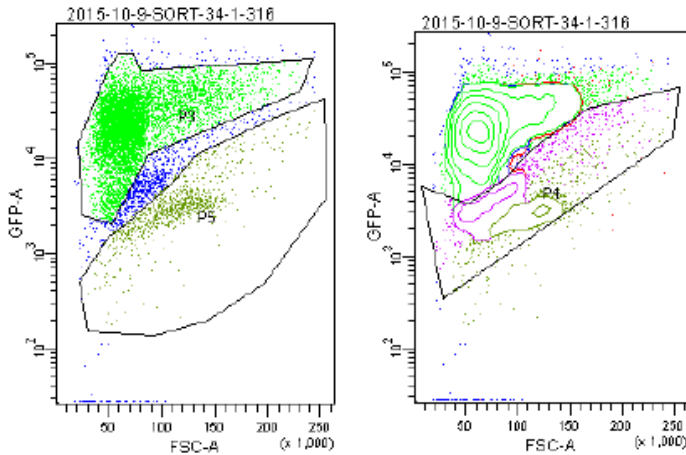




上面几幅图展示了利用流式细胞仪分析水库中浮游植物的群落结构，通过不同的参数画出几个门，p1和p2利用前向散射光合藻红蛋白荧光分开，p3利用叶绿素和藻蓝蛋白荧光分开，p4利用前向散射光合藻蓝蛋白荧光分开（ps：正常情况下p1-4都应该是所含色素蛋白和大小较一致的种类，但实际基本都是混合类群）
其中p1包括甲藻和微囊藻 p2包括甲藻、裸藻和微囊藻 p3是微囊藻和超微藻

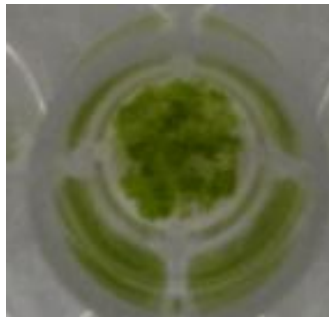
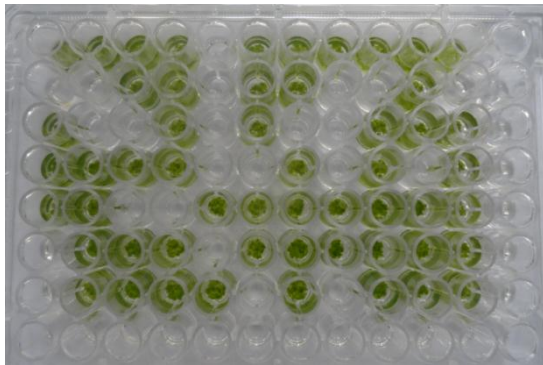
流式细胞仪分选藻类功能研究

流式分选荧光标记凝集素的具有抗真菌功能的雨生红球藻



雨生红球藻细胞壁的糖类与标记荧光蛋白GFP凝集素结合，采用流式分选将不同荧光强度的细胞进行富集，研究表明低荧光强度的细胞具有抗真菌的功能。

鞭毛相关基因的突变体藻的单克隆筛选



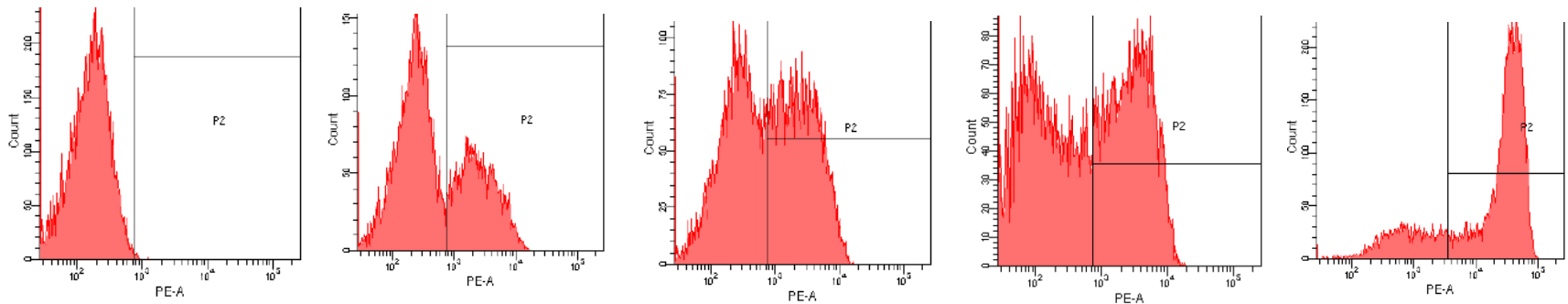
流式作为藻类研究富集的重要手段

藻类细胞大小、内涵物、自发光进行分类和快速富集，为后续研究奠定基础。

微藻生物能源领域中的应用

利用流式细胞仪分选与检测突变体衣藻的油脂含量

在不同时间缺氮条件下，通过Nile Red染料对某个基因的突变衣藻进行染色，探索该突变体基因衣藻的油脂含量变化，再应用在有前景的能源微藻上如小球藻、硅藻等。（ Nile red 是一种脂溶性的荧光染料）



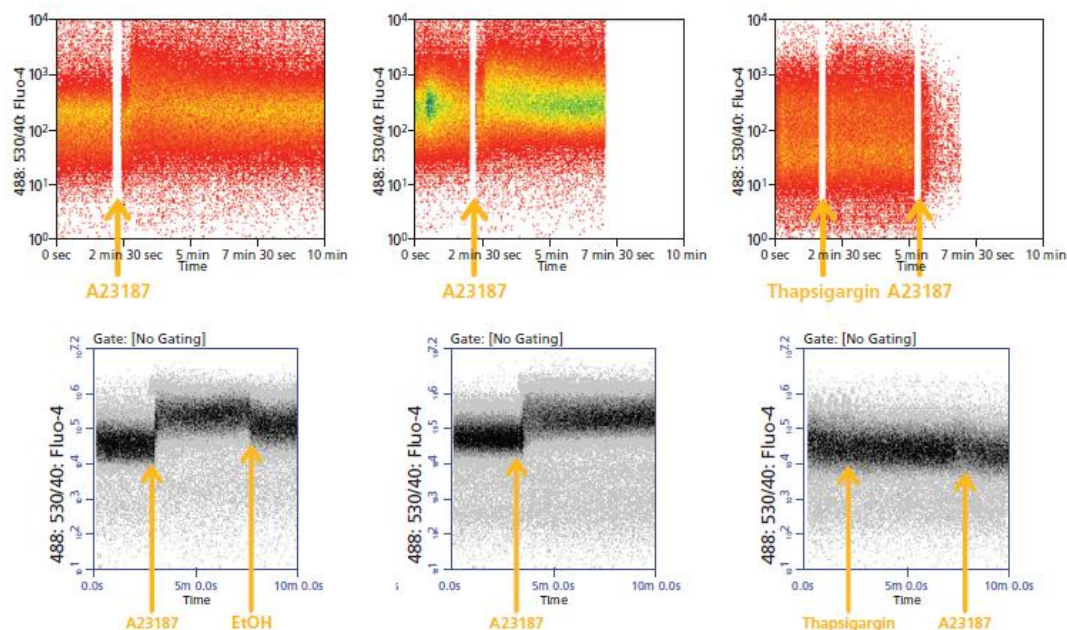
钙离子浓度检测



Fluo³-Am 是一种高度特异性 Ca²⁺ 荧光指示剂，可以灵敏地反映细胞内游离钙离子浓度的变化。Fluo³-Am 进入细胞后经非特异性酯酶脱去 Am 酯，成为脂溶的 Fluo³ 留在细胞内，当 Fluo³ 与细胞内游离钙结合

后，在 FL1 通道发出荧光，其荧光强度与游离钙离子浓度成正比。

钙离子浓度的变化非常迅速，因此，在加入刺激剂后要尽快进行上机检测。传统流式细胞仪是正压上样，测完基线后必须把样本拿下来加入刺激剂再进行检测，有可能错过钙离子浓度的变化。Accuri C6 是负压上样，可以在检测的过程中加入刺激剂，连续监测钙离子浓度变化情况。



比较中断检测法和连续检测法。

A: 用传统流式仪测钙离子检测，空白处为加刺激剂的时间间隔。
B: 用 Accuri C6 检测时，可在检测的过程中加入刺激剂，连续监测钙离子浓度变化情况。

钙离子通道检测

流式细胞仪在小球藻信号通道研究的应用 (王强学科组)

小球藻的作用机制:对氮的饥饿细胞质 Ca^{2+} 水平的变化和 Ca^{2+} 的作用小球藻中中性脂质合成的信号转导研究。

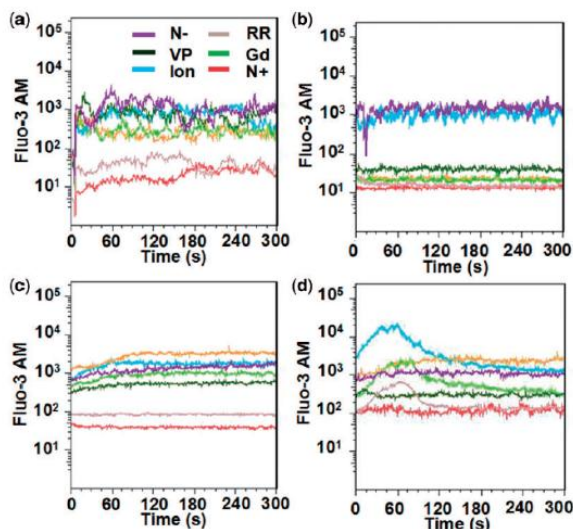


Fig. 3 FCM analysis the cytosolic Ca^{2+} levels in *Chlorella* sp. C2 under N starvation. The fluorescence of Fluo-3 AM was detected at 0 d (a), (b), 2 d (c) and 8 d (d) after N starvation. N-, N starvation; RR, ruthenium red; VP, verapamil; Gd, GdCl_3 ; Ion, ionomycin; N+, N sufficient data points at each second represent the means of 2×10^3 – 3×10^3 cells in three replicated studies with similar findings.

PCP
PLANT & CELL PHYSIOLOGY

Ca^{2+} Signal Transduction Related to Neutral Lipid Synthesis in an Oil-Producing Green Alga *Chlorella* sp. C2

Hui Chen¹, Yunming Zhang^{1,2}, Chenliu He¹ and Qiang Wang^{1,*}

¹Key Laboratory of Algal Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, Hubei, China

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100094, China

*Corresponding author: E-mail, wangqiang@ihb.ac.cn; Fax, +86-27-68780123

(Received November 12, 2013; Accepted January 14, 2014)

Regular Paper

Changes in the cytosolic Ca^{2+} levels and the role of Ca^{2+} signal transduction in neutral lipid synthesis in *Chlorella* sp. C2 under nitrogen starvation conditions were investigated. The results detected by using the scanning ion-selective electrode technique demonstrate that nitrogen starvation induced significant Ca^{2+} influx across the plasma membrane into cells. Ca^{2+} fluorescence imaging and flow cytometry were used to estimate the effect of this Ca^{2+} influx on the generation of the Ca^{2+} signal, and the results showed that the extracellular Ca^{2+} concentration increased transiently and

Introduction

Many plants are adversely affected by several environmental factors, including light, temperature, CO_2 , O_2 , water, nutrients, and stresses such as drought, low pH, salt, and pathogen or predator attacks, that negatively affect their survival and development (Plieth 2001). Ca^{2+} is a ubiquitous intracellular second messenger in the signal transduction of environmental stimuli in plants (Sun et al. 2006). When plants are forced to respond to environmental stimuli, the Ca^{2+} level rises rapidly and transi-

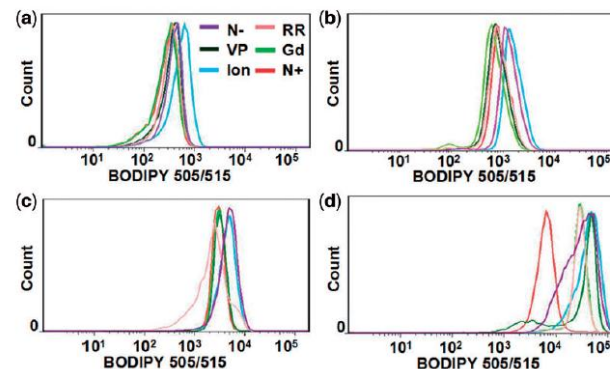
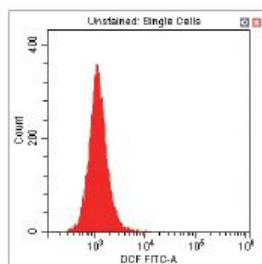


Fig. 6 FCM analysis of *Chlorella* sp. C2 cells labeled in vivo with BODIPY 505/515. The fluorescence of BODIPY 505/515 in the cells ($>10^4$) was detected at 0 d (a), 0.5 d (b), 2 d (c) and 8 d (d) after N starvation. N-, N starvation; RR, ruthenium red; VP, verapamil; Gd, GdCl_3 ; Ion, ionomycin; N+, N sufficient. All of the curves are representative of three replicated studies with similar findings.

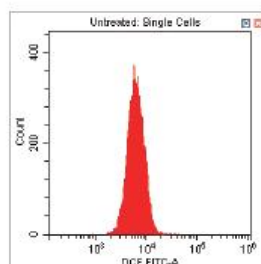
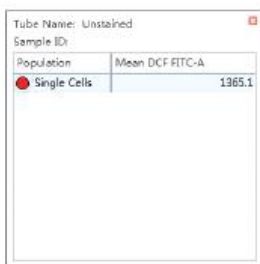
活性氧检测

实验简介

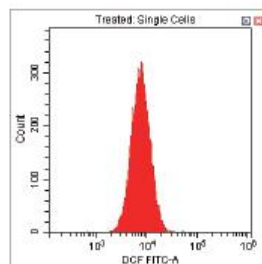
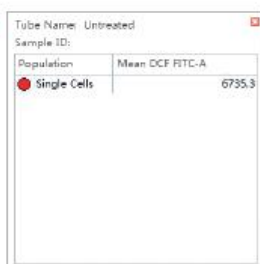
活性氧检测 (Reactive oxygen species assay) 是一种利用荧光探针 DCFH-DA 进行活性氧检测的方法。DCFH-DA 本身没有荧光, 可以自由穿过细胞膜, 进入细胞内后, 可以被细胞内的酯酶水解生成 DCFH。而 DCFH 不能通透细胞膜, 从而使探针很容易被装载到细胞内。细胞内的活性氧可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF。检测 DCF 的荧光就可以知道细胞内活性氧的水平。



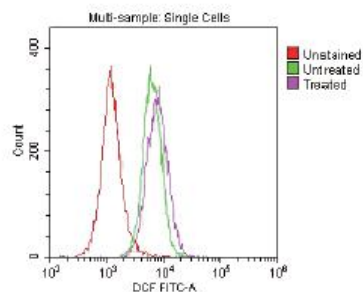
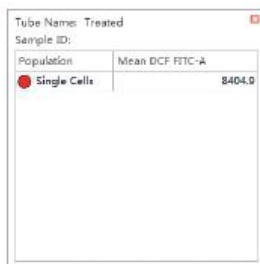
空白组



对照组



A 药物处理组



用 CytExpert 软件叠加分析

实验结果说明 HUVEC 细胞在 A 药物作用下, 会导致 HUVEC 细胞中活性氧的增加。

浸没型大叶角菌对微囊藻细胞的生成和细胞损伤的影响 (吴振斌学科组)

Allelopathy Journal 38 (2): 229-238 (2016)

Tables: -, Figs: 5

0971-4693/94 Euro 10.00
International Allelopathy Foundation 2016

Effects of submerged macrophyte *Ceratophyllum demersum* on ROS generation and cell damage in *Microcystis aeruginosa*

Y. HE¹, L. CHENG, Y. TIAN, Z.L. CHEN, Q.H. ZHOU^{*}, Y. Y. ZHANG, B. Y. LIU^{*}, Z.B. WU

State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology
Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

E. Mail: qhzhou@ihb.ac.cn; liuby@ihb.ac.cn

(Received in revised form : May 17, 2016)

ABSTRACT

In laboratory bioassay, we investigated the generation of reactive oxygen species (ROS) in cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* induced by allelopathic effects of submerged macrophyte *Ceratophyllum demersum* in co-culture system and the changes in cell membrane integrity and DNA damage. We found that the growth inhibition of *M. aeruginosa* significantly increased with the increase in *C. demersum* biomass (0.5, 1.0, 3.0 and 6.0 g FW/L). The concentrations of total phenolic compounds (TPCs) secreted by *C. demersum* in co-culture water increased with the increase in *C. demersum* biomass and co-culture time. Compared with control, the level of ROS increased in a dose-dependent manner with the biomass of *C. demersum* and the concentration of TPCs in co-culture water from the second day. According to the propidium iodide (PI) staining results, numbers of cells losing the membrane integrity increased with ROS generation in *M. aeruginosa* co-cultured with 1.0, 3.0 and 6.0 g FW/L *C. demersum* on the fourth day. The significant DNA fragmentation was observed in *M. aeruginosa* cells at 6 g FW/L *C. demersum* group. These results suggested that the overproduction of ROS induced by the submerged macrophyte *C. demersum* was the major factor, resulting in the loss of cell membrane integrity and DNA fragmentation and finally leading to the death of *M. aeruginosa* cells.

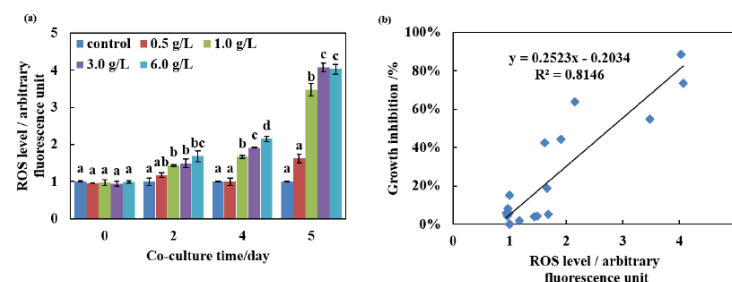


Figure 2. Generation of ROS in *M. aeruginosa* co-cultured with *C. demersum* (a) and correlation between the ROS level and the growth inhibition of *M. aeruginosa* when co-cultured with *C. demersum* (0.5, 1.0, 3.0, 6.0 g FW/L) (b). Lower case letters a, b, c and d indicated statistically significant difference (one-way ANOVA) among the different biomasses of *C. demersum* groups (0.5, 1.0, 3.0, 6.0 g FW/L). Data and error bars represent means $\pm$ SD ($n=3$)

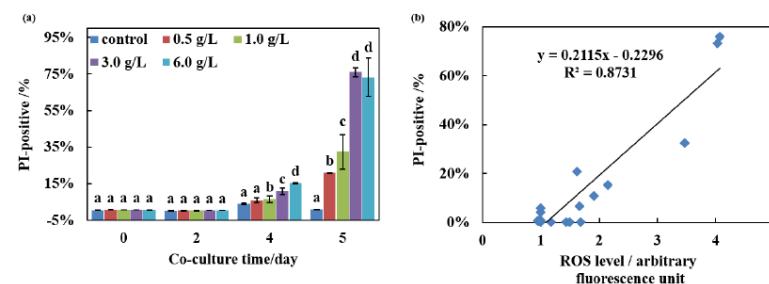
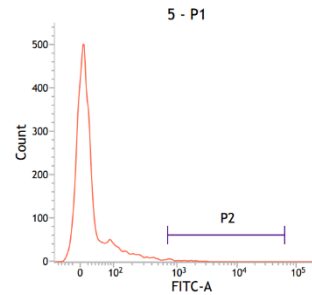
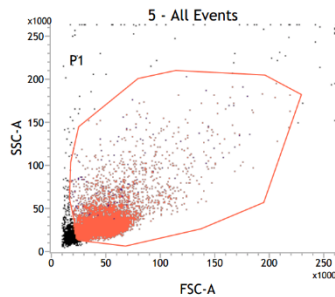
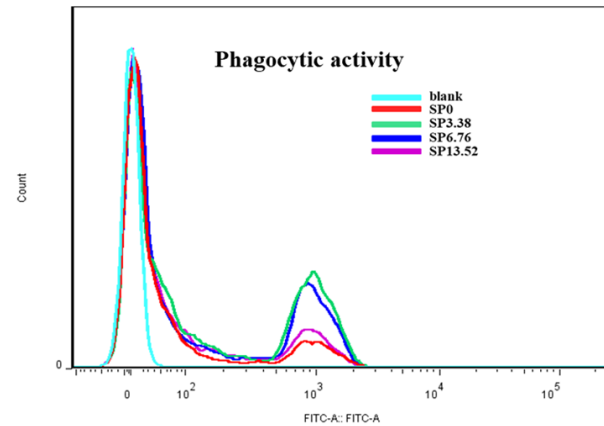
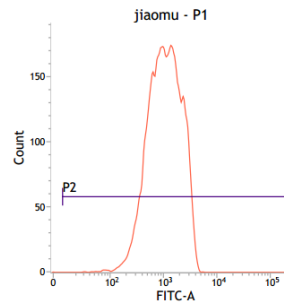
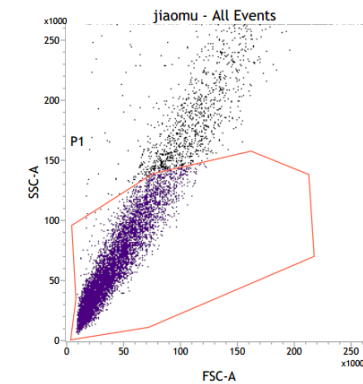


Figure 4. Changes in membrane integrity in *M. aeruginosa* co-cultured with *C. demersum* (a) and correlation between the ROS level in *M. aeruginosa* and the percentage of PI-positive *M. aeruginosa*

水生生物免疫毒理评价-呼吸爆发 (ROS)

饲料中添加不同藻粉比例对异育银鲫血液白细胞的吞噬活性的影响 (曹申平, 未发表)

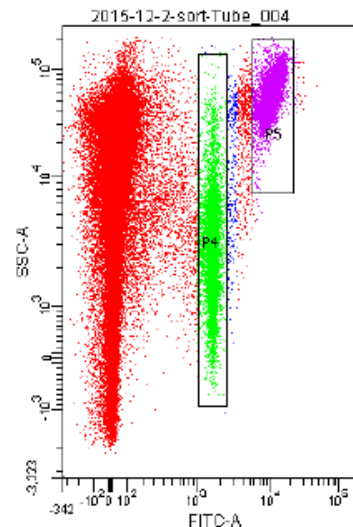
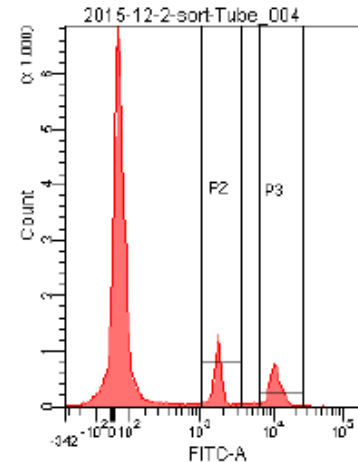


采用流式细胞技术, 经荧光染色, 分析鱼体头肾、血液等组织中白细胞呼吸爆发 (左上列) 和吞噬活性 (左下列)。

流式分选术在原生动物进化基因组学 与系统发育学研究

纤毛虫-嗜热四膜虫为作为原生动物，具有单细胞真核生物特征，是唯一一类一个细胞中同时具有大、小核的生物，大核（营养核）在营养时期表达，小核（生殖核）是有性生殖时期表达。

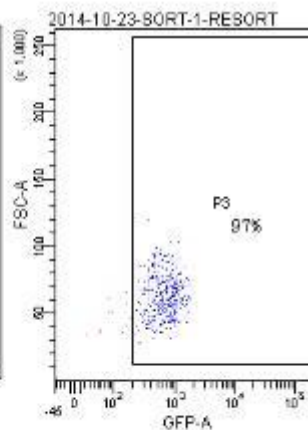
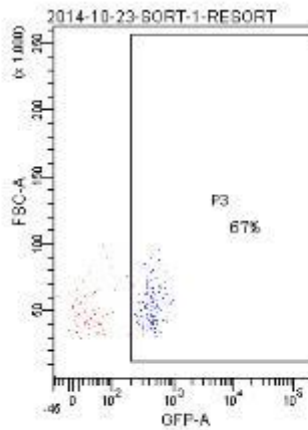
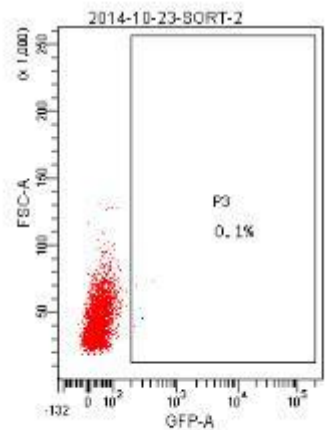
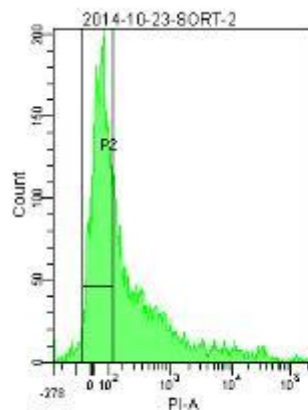
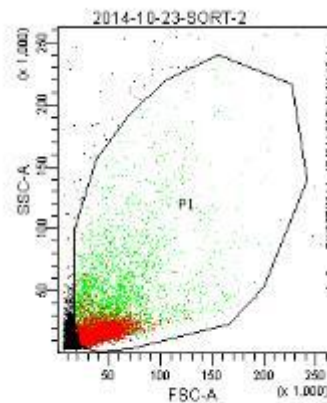
Sybrgreen I对四膜虫染核经流式分选大小核来研究有性、无性生殖的意义。流式分选技术为研究四膜虫进化与生态功能基因组学和建立功能基因组学数据库提供技术手段。



Tube: Tube_004			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	106,911	###	100.0
P1	97,165	90.9	90.9
P2	9,277	9.5	8.7
P3	8,557	8.6	8.0
P4	9,046	9.3	8.5
P5	8,705	9.0	8.1

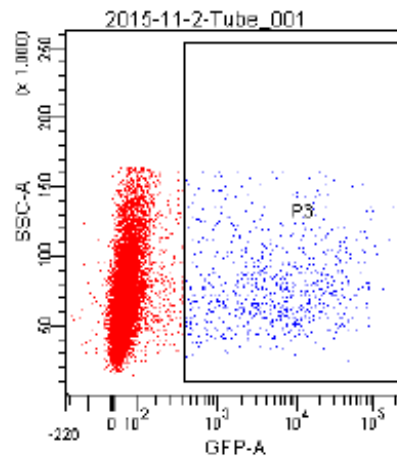
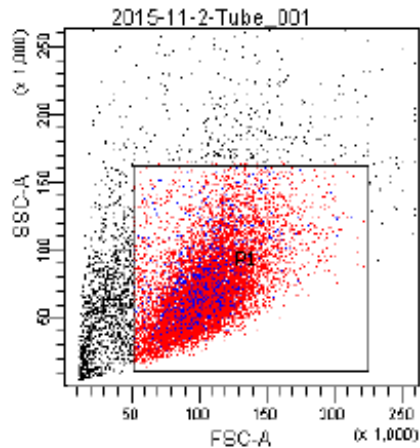
流式细胞仪分选斑马鱼原始生殖细胞的应用

- 原始生殖细胞(Primordial germ cell,PGC): 为了探索控制原始生殖细胞发育的关键基因,以斑马鱼为模型,构建在斑马鱼PGC特异表达外源基因的转基因品系,活体荧光标记的方法特异标记原始生殖细胞,利用流式细胞仪分选该类细胞,进行后续转录组测序分析。GFP原始生殖细胞比例低,一次分选得不到理想纯度,采用二次分选后纯度达到97%,有利于后续测序分析。



单克隆分选在青鳉精巢多能细胞系中研究 (96孔板)

用**GFP**标记的真核表达质粒转染青鳉细胞系，用流式细胞仪单克隆分选阳性细胞培养成细胞株，鉴定细胞株基因型并开展功能基因研究。





感谢各位专家、同仁！