

CytoFlex装机培训理论介绍

我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者
 我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service misused herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

目录

- ❖ 流式基础知识讲解
- ❖ 流式在科研中的常规应用
- ❖ 流式数据分析
- ❖ CytoFlex流式仪维护（操作员）



我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service names used herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

流式基础知识讲解

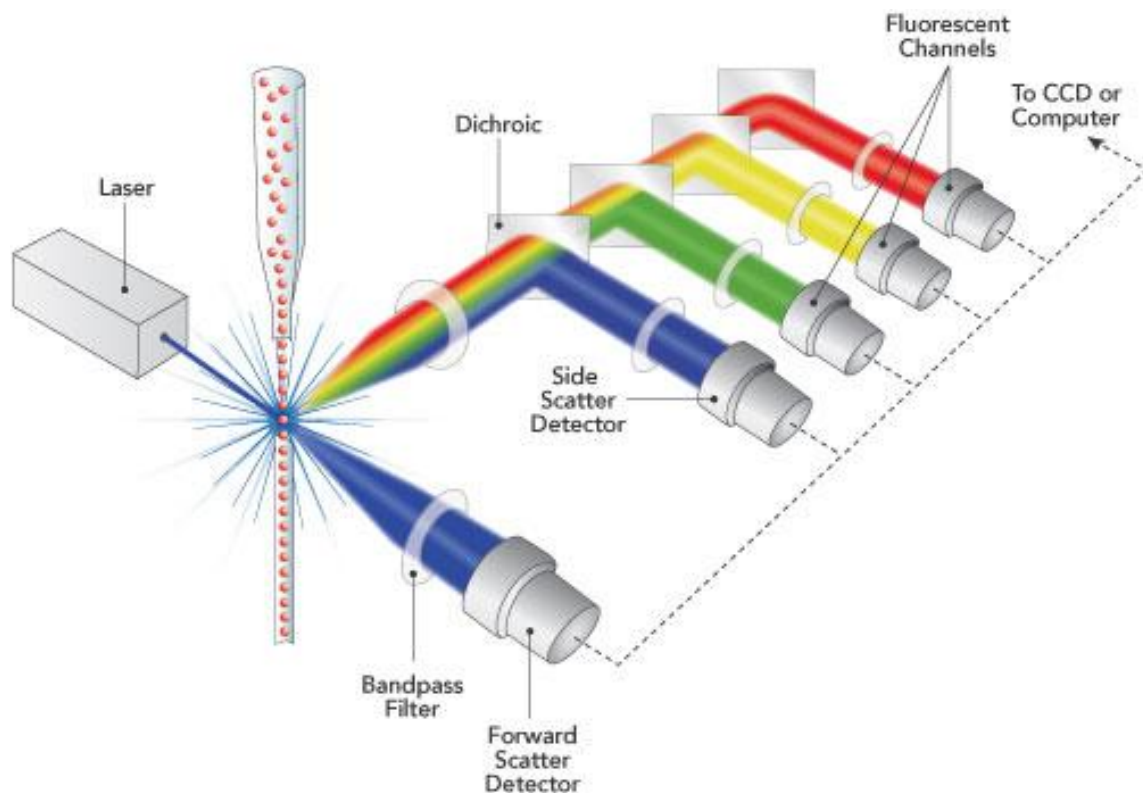
我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service names used herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

流式细胞术的基本概念

流式细胞仪通过**检测器**接收**激光**照射液流内**细胞(或颗粒)**产生的**光信号**，经过**光电转换**和统计分析，从而反映细胞物理化学特征和细胞功能。



流式细胞仪的组成

荧光信号—电信号—数字信号

光学系统

光源

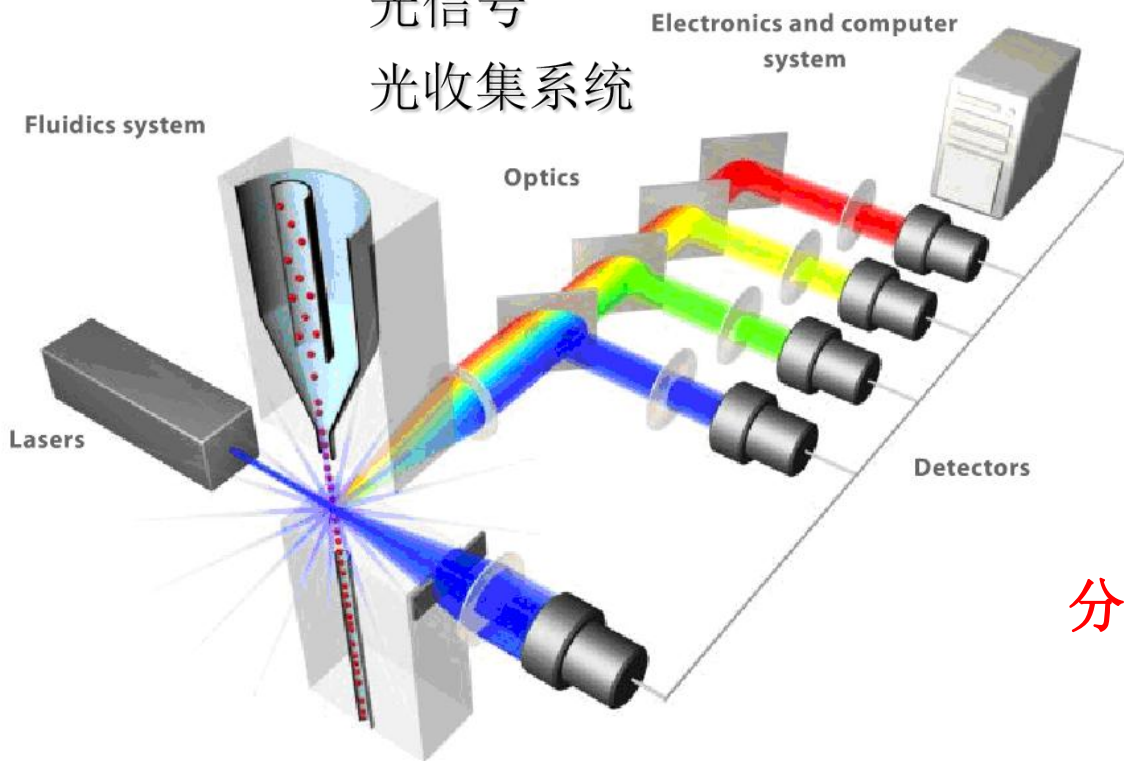
光信号

光收集系统

电子系统

液流系统

流动室
鞘液流



分选系统

我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

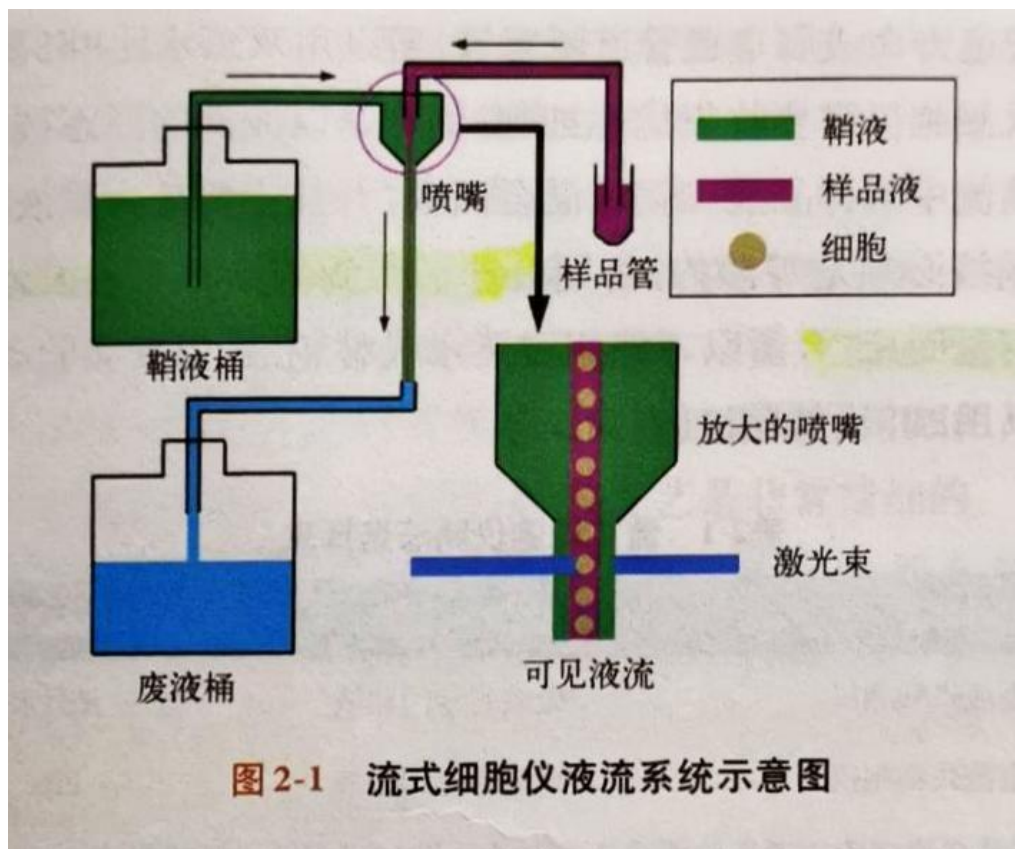
我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service names used herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

液流系统

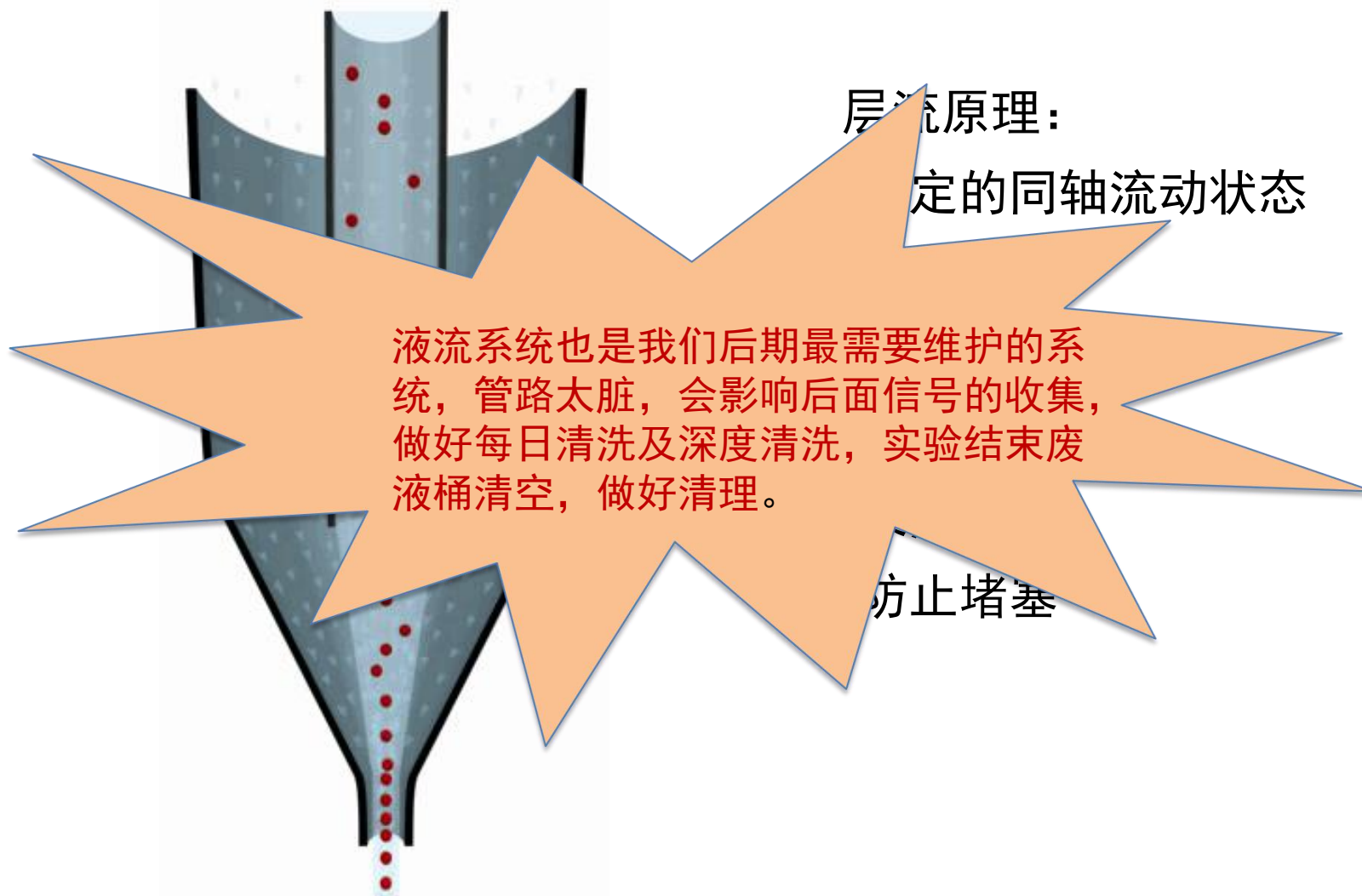
作用：形成单细胞液流

概念：鞘液、样品液



图片摘自《流式细胞术-原理、操作及应用》

液流系统



层流原理：

稳定的同轴流动状态

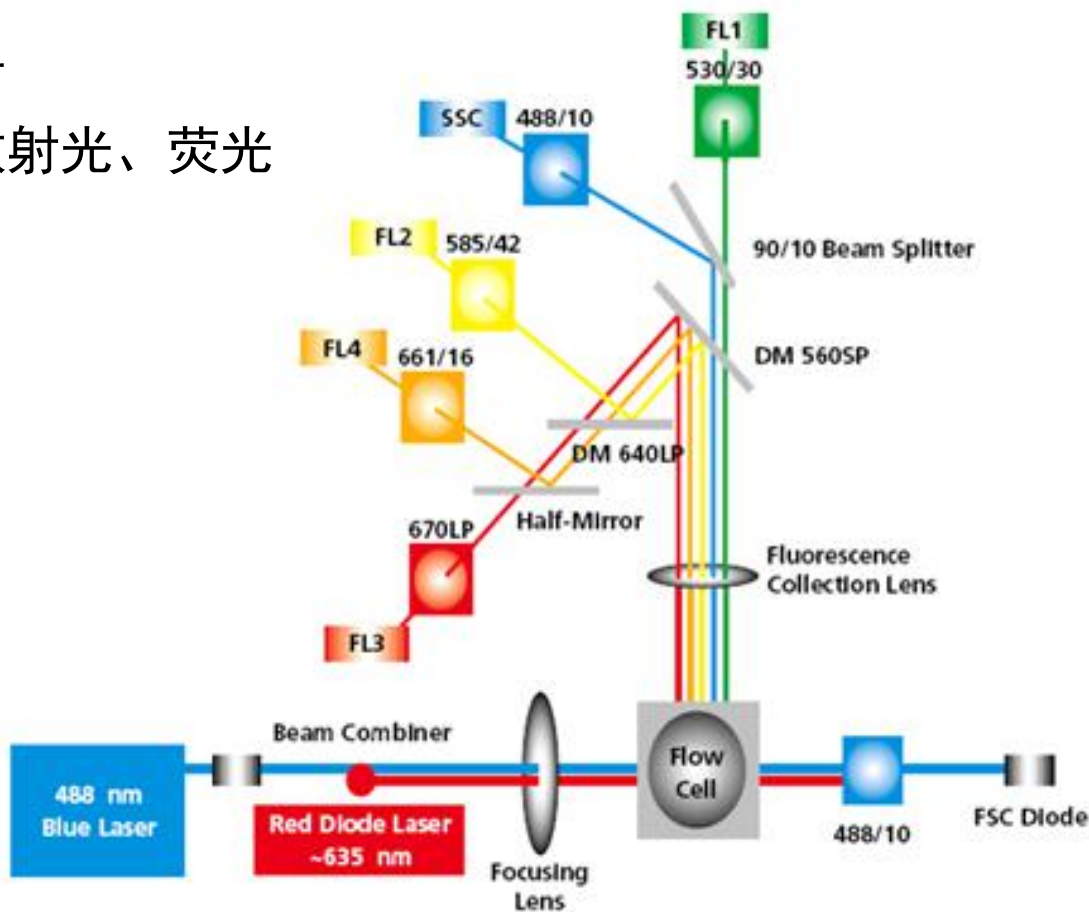
液流系统也是我们后期最需要维护的系统，管路太脏，会影响后面信号的收集，做好每日清洗及深度清洗，实验结束废液桶清空，做好清理。

防止堵塞

光学系统

作用：产生可区分的光信号

概念：激光器、滤光片；散射光、荧光



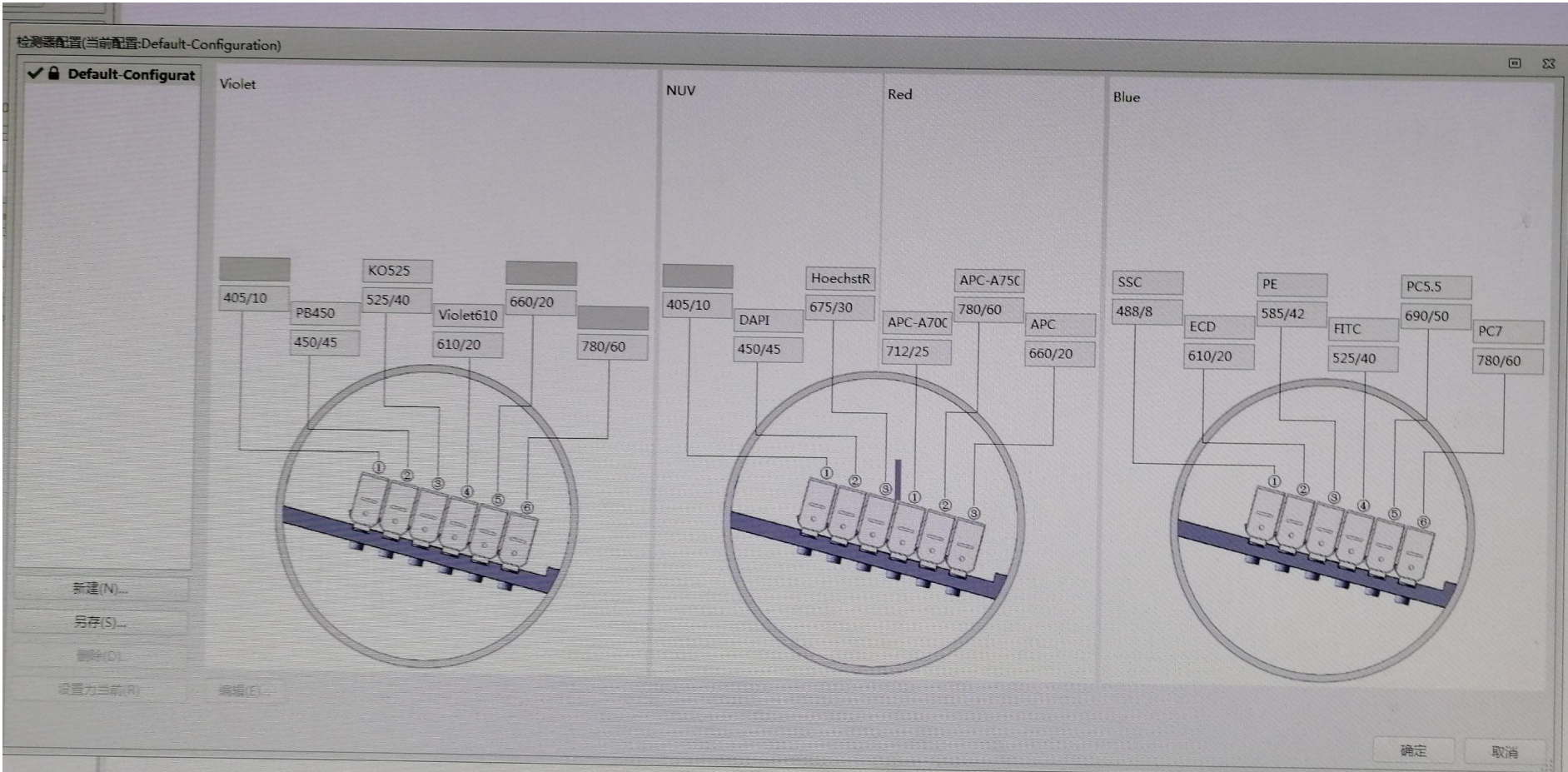
在仪器配置信息，我们可以看到仪器所配备的激光器及相应的滤光片信息

我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

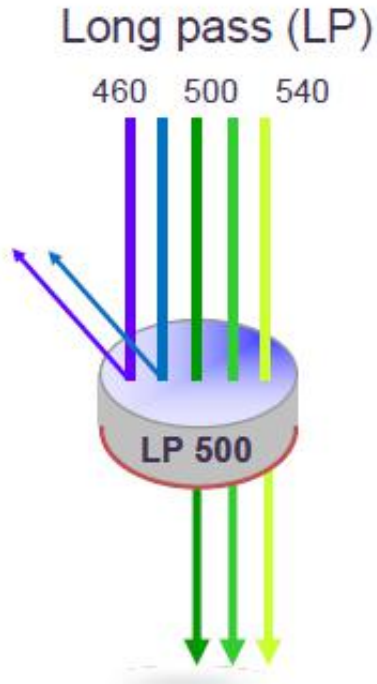
Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service reused herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

光学系统-配置表

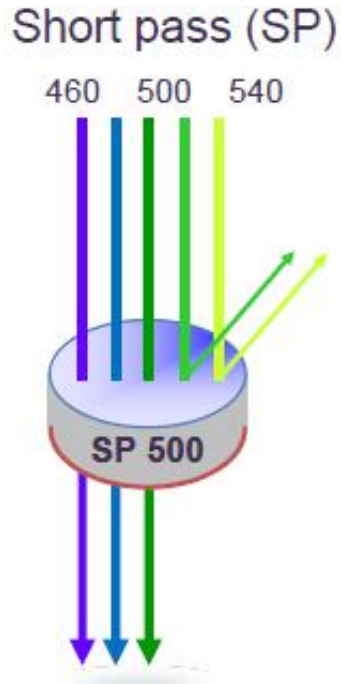


光学系统-滤光片

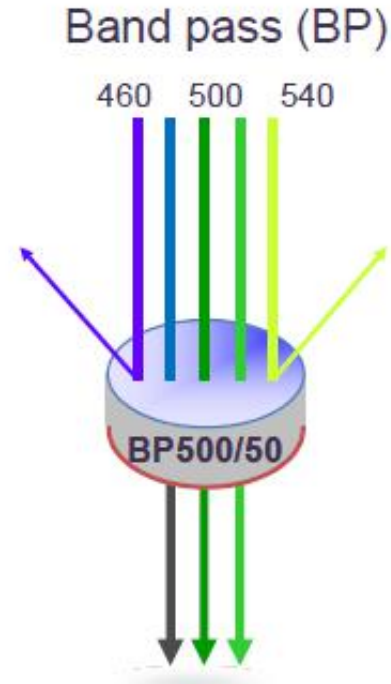
长通滤光片



短通滤光片

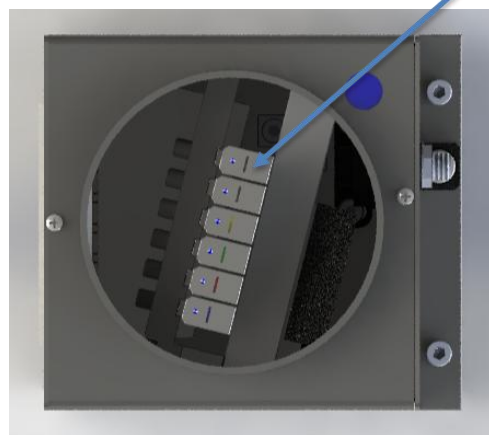
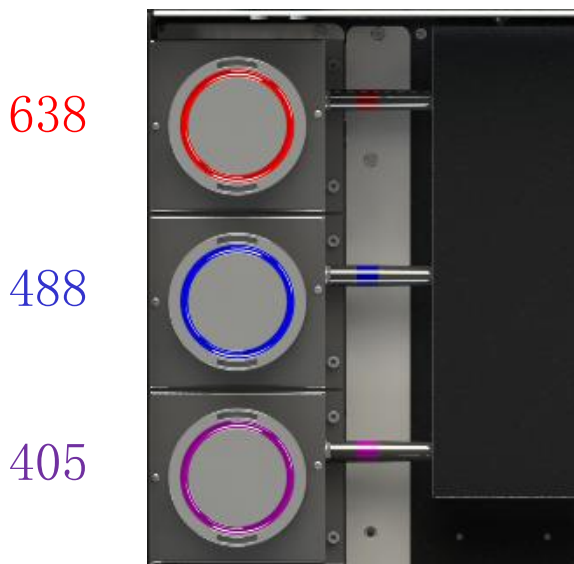


带通滤光片



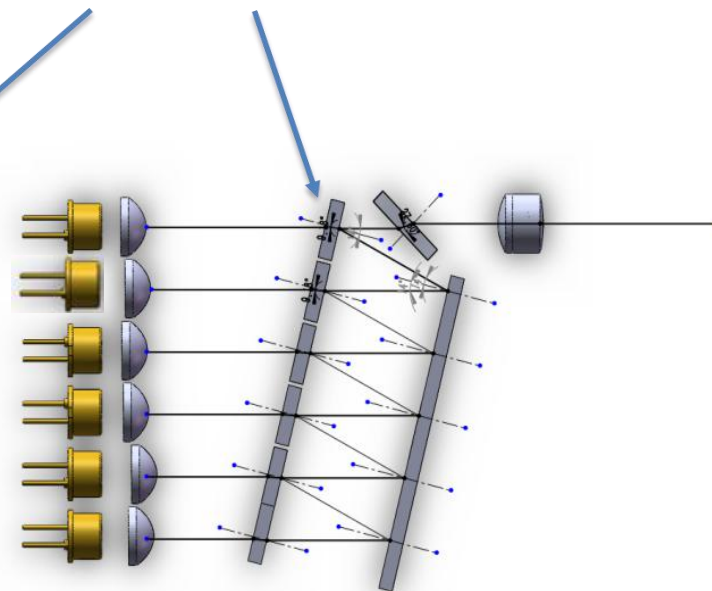
光学系统-光收集和检测

多激光多色检测



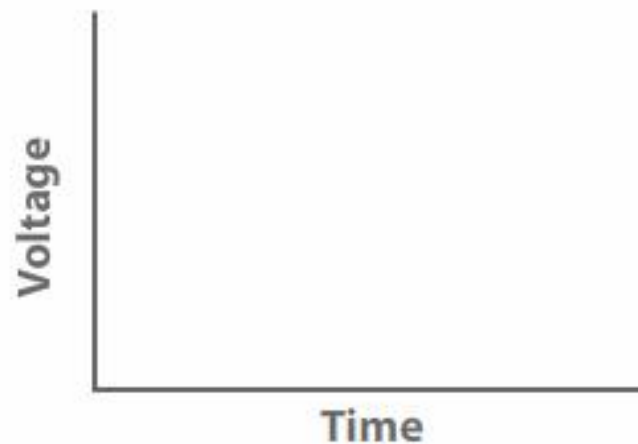
WDM

滤光片



FAPD

电子系统-电(脉冲)信号的产生



我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service names used herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

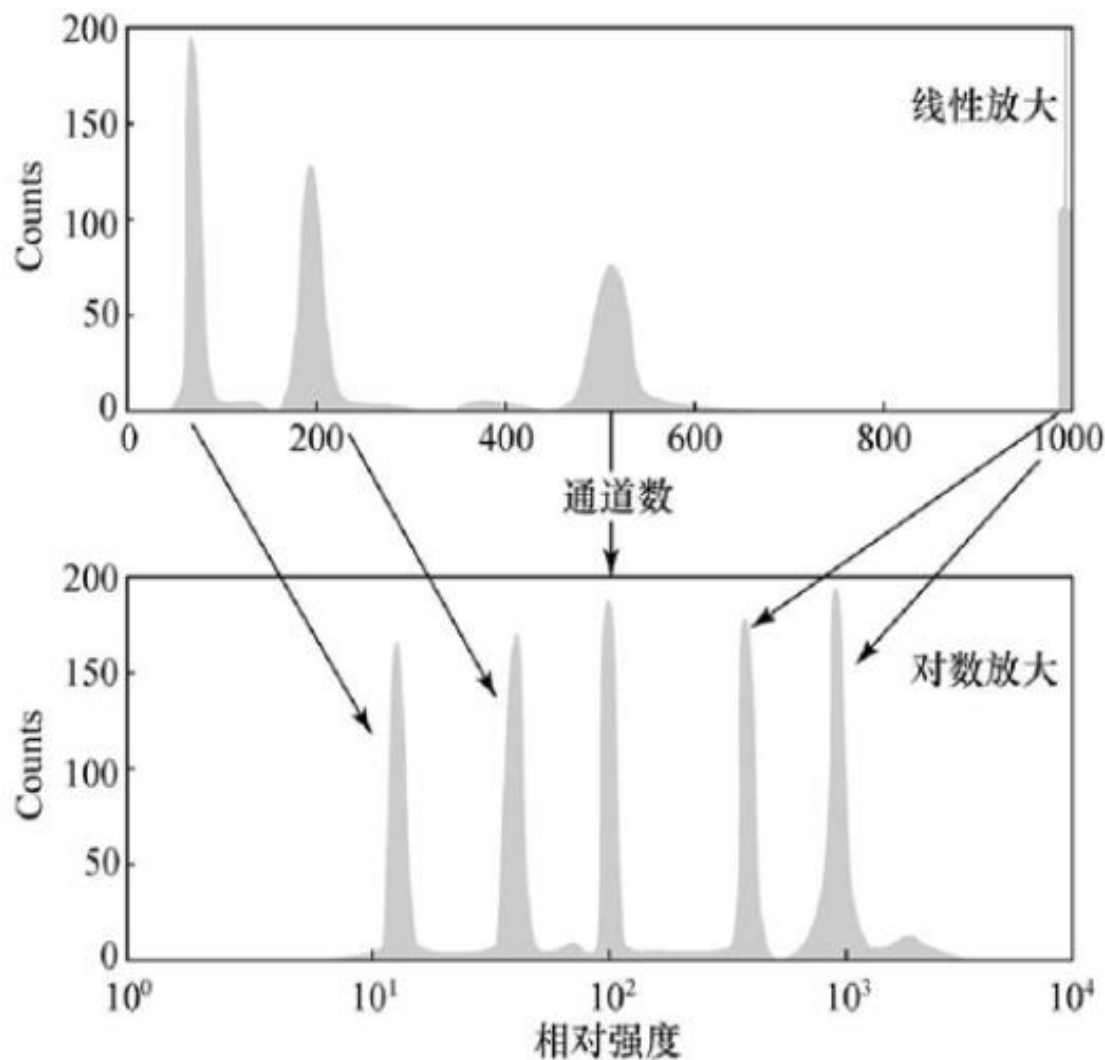
电子系统-电(脉冲)信号的放大

线性放大lin:

✓ 较小范围内做精确测量;

对数放大log:

✓ 检测较大范围内的光信号的强弱;



名词解读

我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service names used herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

流式细胞术检测的参数

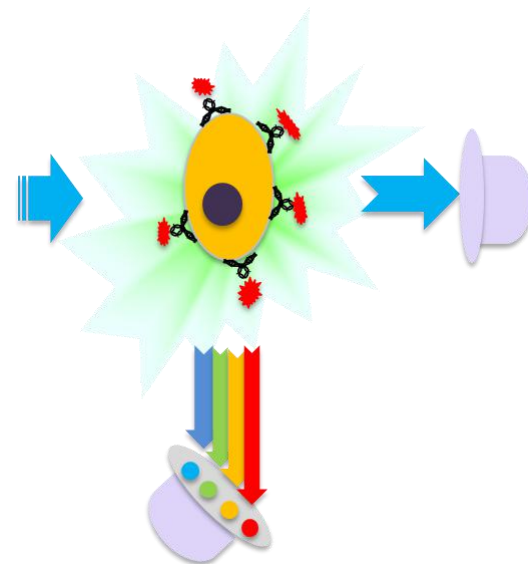
- 物理参数

FSC: 前向散射光 (表征细胞大小)

SSC: 侧向散射光 (表征细胞颗粒复杂度)

- 荧光参数

细胞自发荧光, 荧光蛋白, 细胞所携带的流式抗体所发出的荧光



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**；

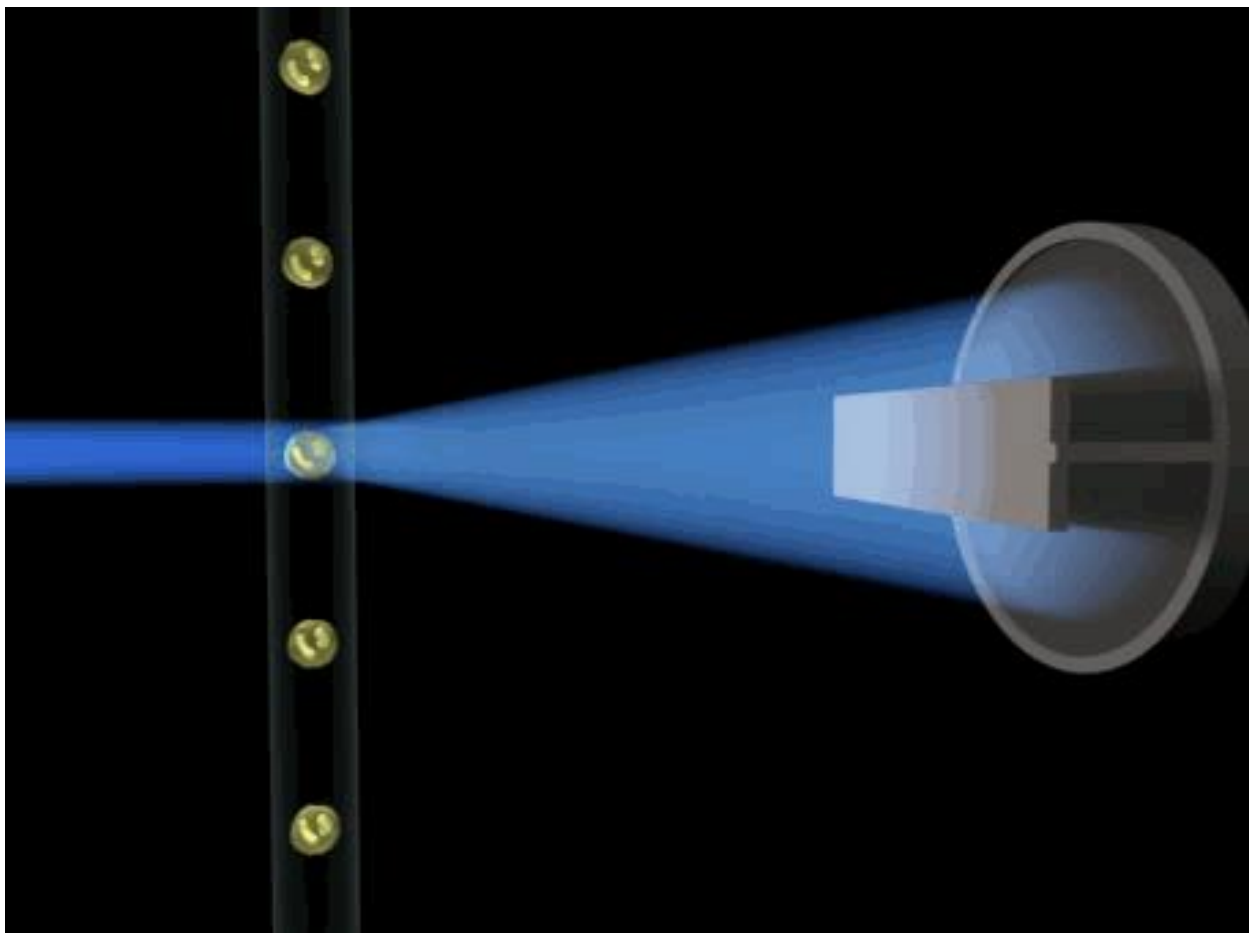
散射光

- 散射光信号由细胞（颗粒）本身及其内容物对激光的折射产生，主要反映了细胞（颗粒）的物理特征如**大小或内部复杂程度**。

散射光



前向散射光(FSC)

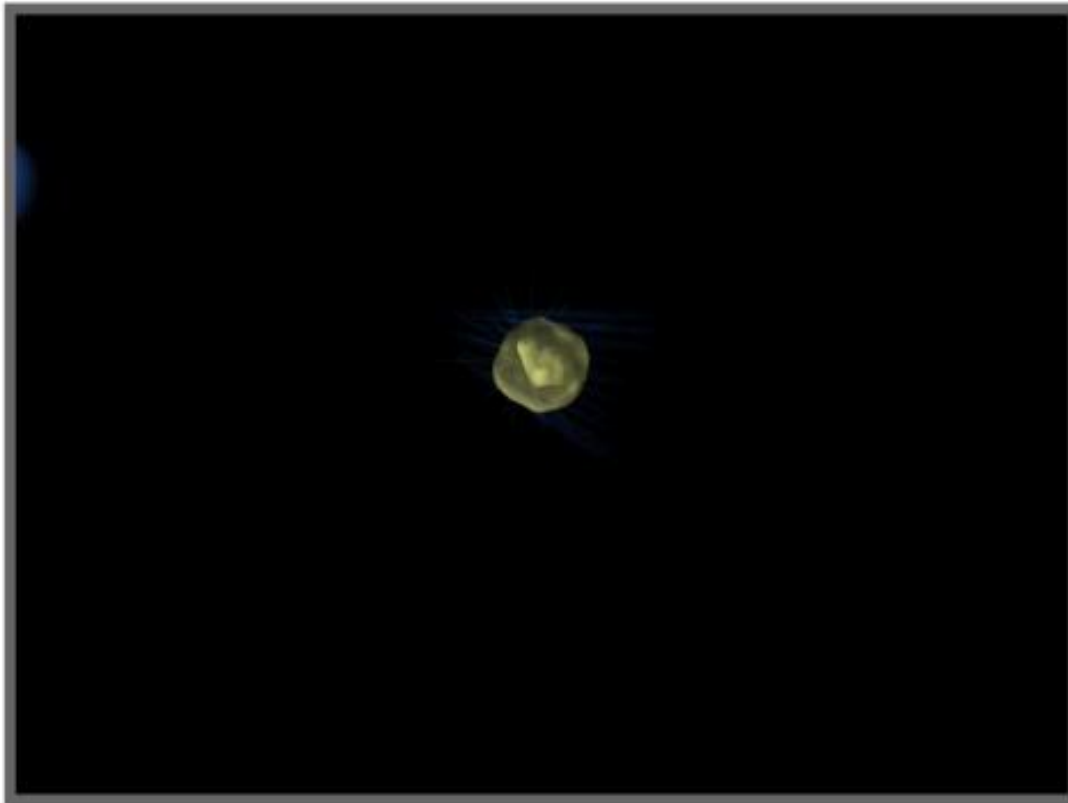


我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

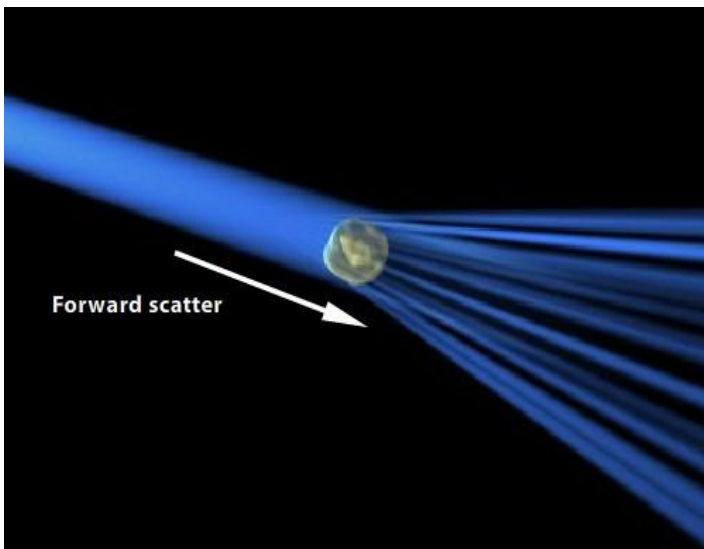
Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service names used herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

侧向散射光(SSC)



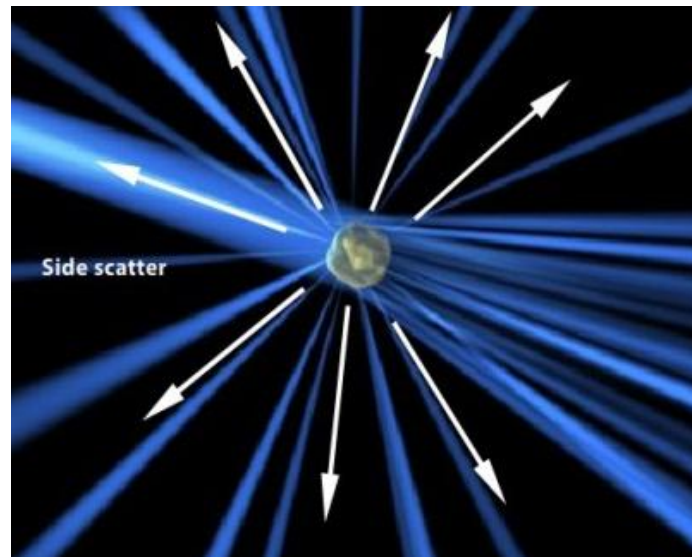
总结

前向散射光(FS)



反映细胞大小

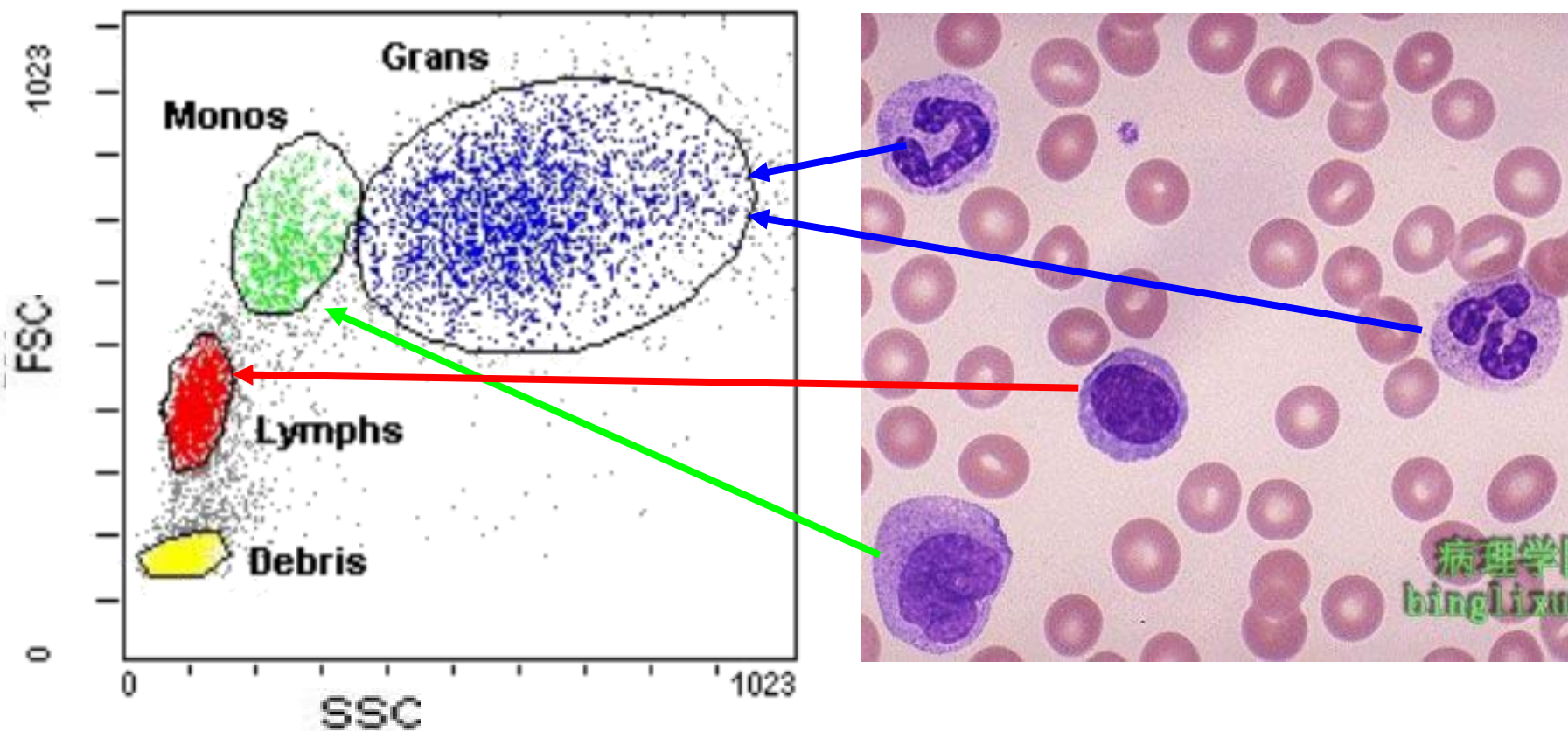
侧向散射光(SS)



反映细胞折光率

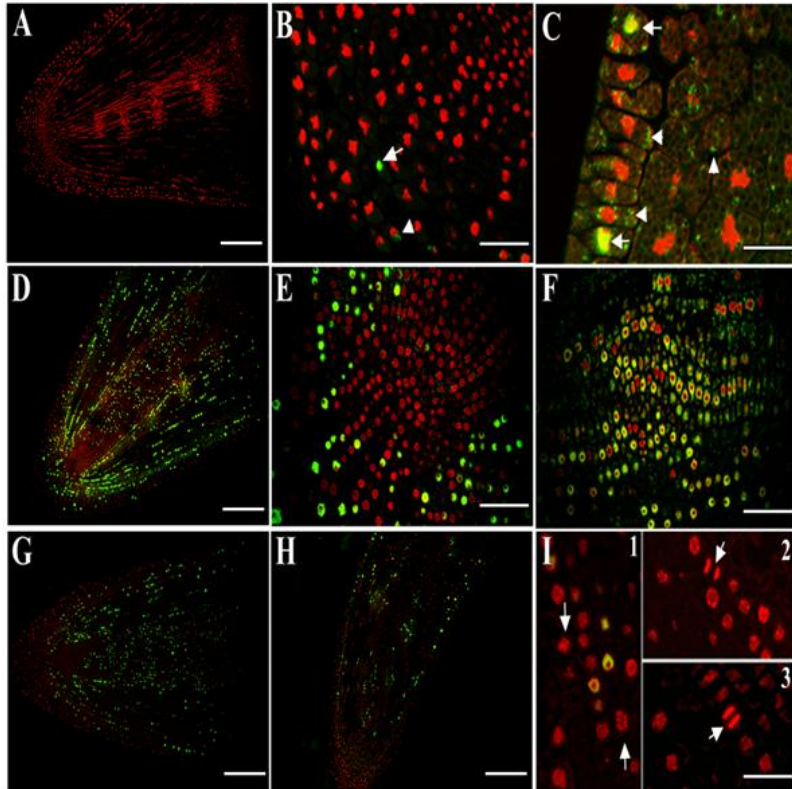
散射光的散点图

人外周全血细胞散射光双参数点图（溶红后）

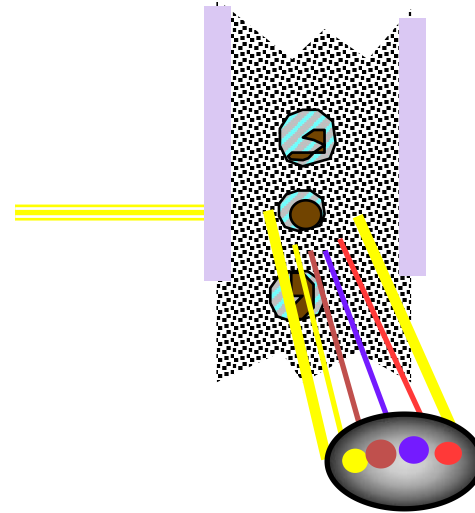
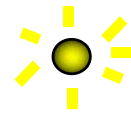


可以根据细胞的大小和颗粒度这两个基本特征，对细胞进行初步的分群或分类

荧光信号



Laser



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

细胞自发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。

荧光素

某些物质在特定波长范围内的光线照射下，可发出波长比照射光波长的光线，即荧光。
受激发后能产生荧光的物质称**荧光物质或荧光素**。

激发光谱 (Excitation, Ex) :

是指能特异性地激发某种荧光素的一定波长范围内的光线，也称为吸收光谱。

吸收波峰 (最大吸收波长) : **Ex-Max**

发射光谱 (Emission) :

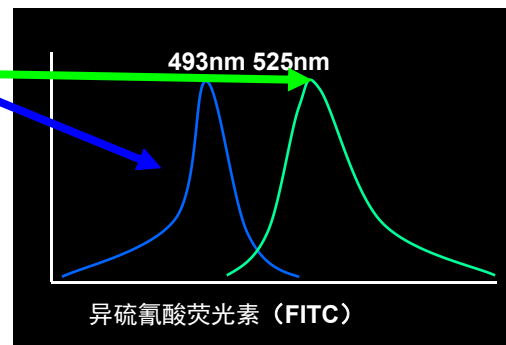
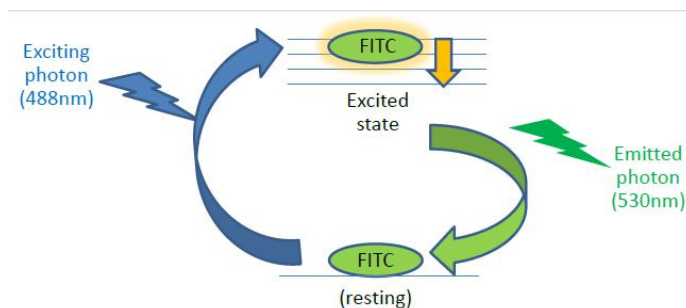
是指某一波长激发光引起荧光素发射的一定波长范围内的荧光。

















发射波峰 (最大发射波长) : **Em-Max**

荧光素的使用:

选择正确的激光器

确定所需荧光探测器 (PMT)

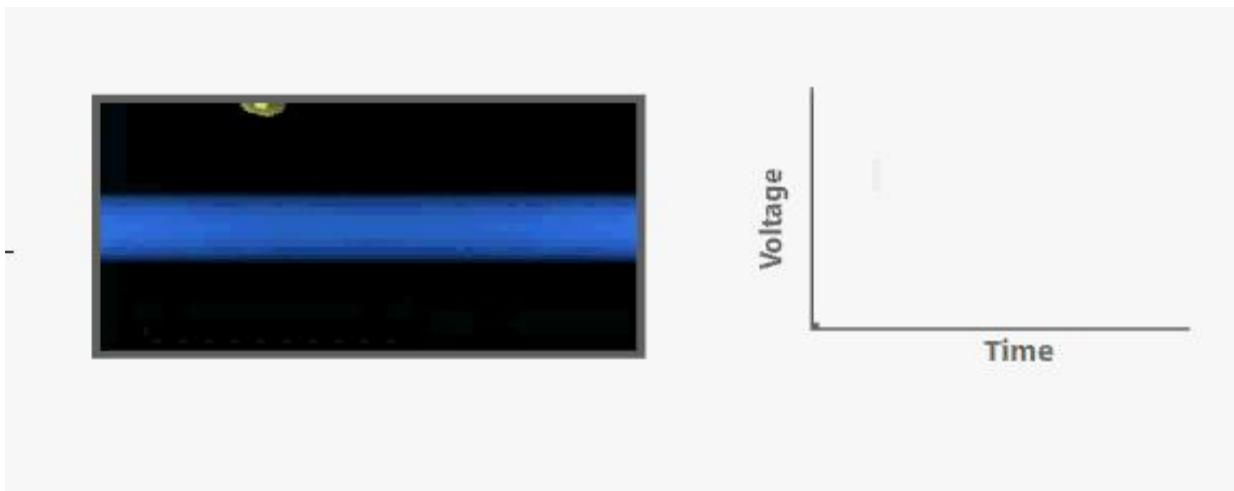
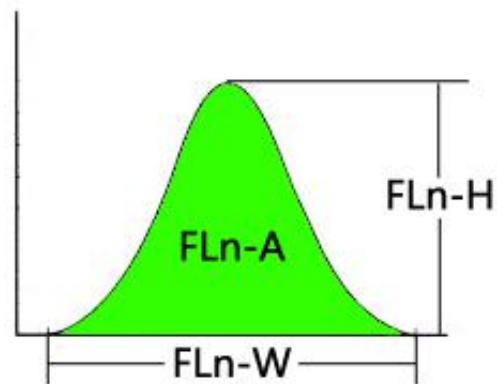


Laser	Fluorescent Channel	CytoFLEX Channel Names	Commonly used Fluorescent Dyes
 488 nm	 525/40 BP	FITC	FITC, Alexa Fluor™ 488, CFSE, Fluo-3
	 585/42 BP	PE	PE, PI
	 610/20 BP	ECD	ECD, PE-Texas Red®, PE-CF594, PI
	 690/50 BP	PC5.5	PC5.5, PC5, PerCP, PerCP-Cy5.5, PI, DRAQ7™
	 780/60 BP	PC7	PC7, DRAQ7™
 638 nm	 660/10 BP	APC	APC, Alexa Fluor™ 647, eFluor™ 660, Cy5
	 712/25 BP	APC-A700	APC-A700, Alexa Fluor™ 700, Cy5.5, DRAQ7™
	 780/60 BP	APC-A750	APC-A750, APC-Cy7, APC-H7, APC- eFluor™ 780, DRAQ7™
 405 nm	 450/45 BP	PB450	Pacific Blue™ dye, V450, eFluor™ 450, BV421
	 525/40 BP	KO525	Krome Orange, AmCyan, V500, BV510
	 610/20 BP	Violet610	BV605, Qdot® 605
	 660/10 BP	Violet660	BV650, Qdot® 655
	 780/60 BP	Violet780	BV785, Qdot® 800

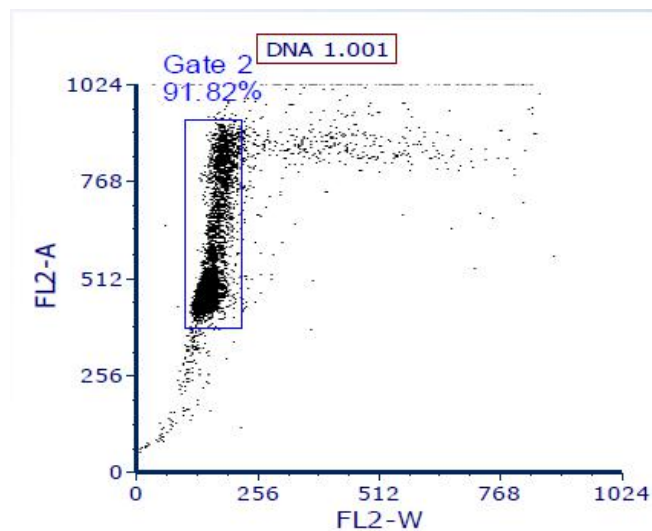
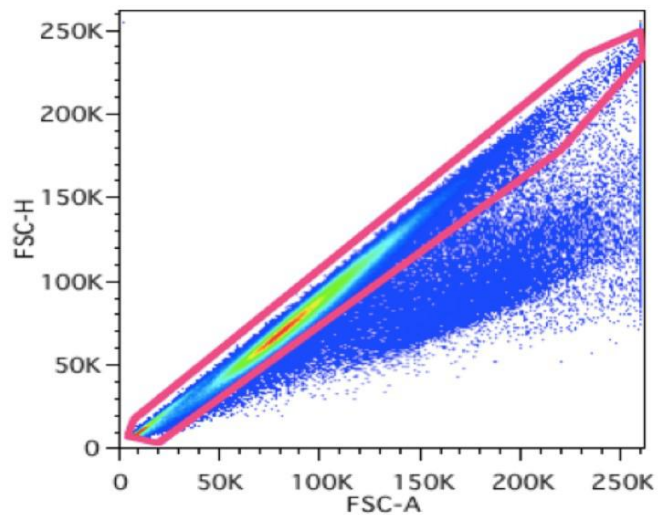


A/H/W

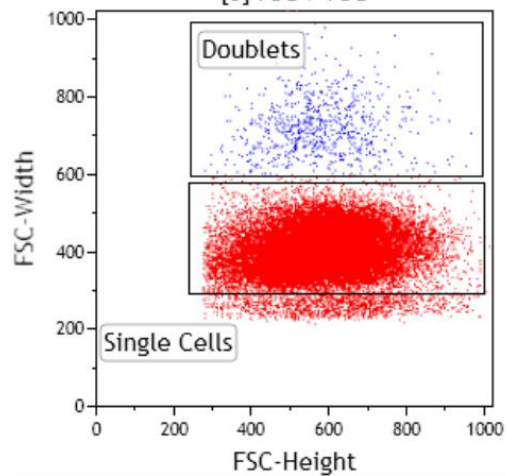
Log (对数) { **A**rea/Lin 面积
Lin (线性) { **H**igh/Peak 峰高
Width 峰宽



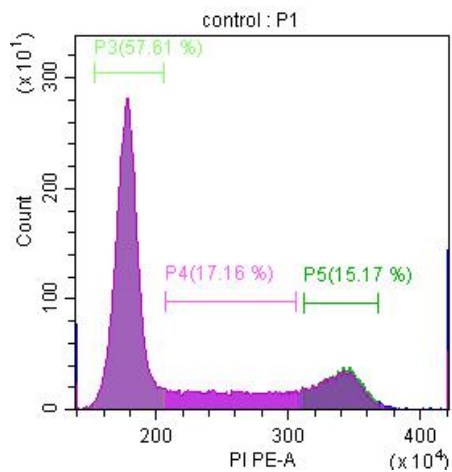
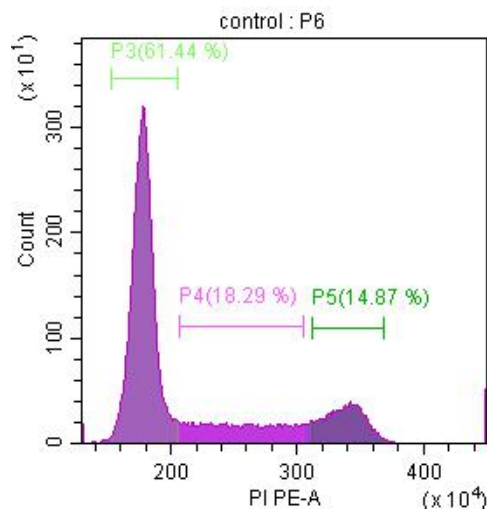
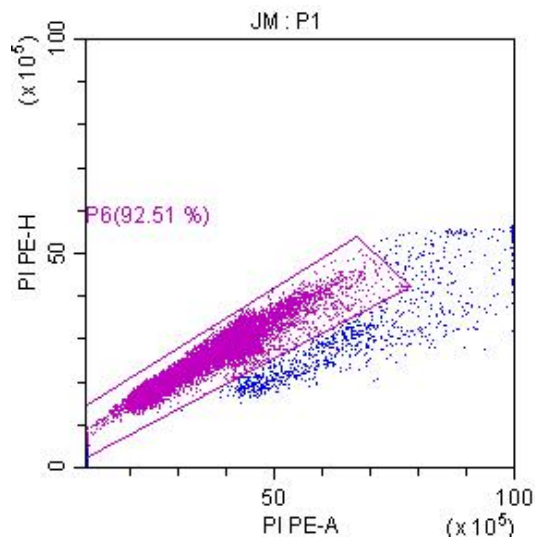
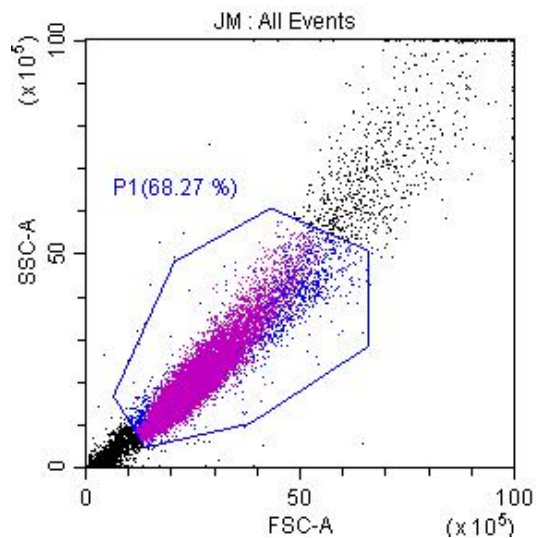
粘连体



数据集 10: cne2-r-m-
[J] FSC / FSC



粘连体的排除



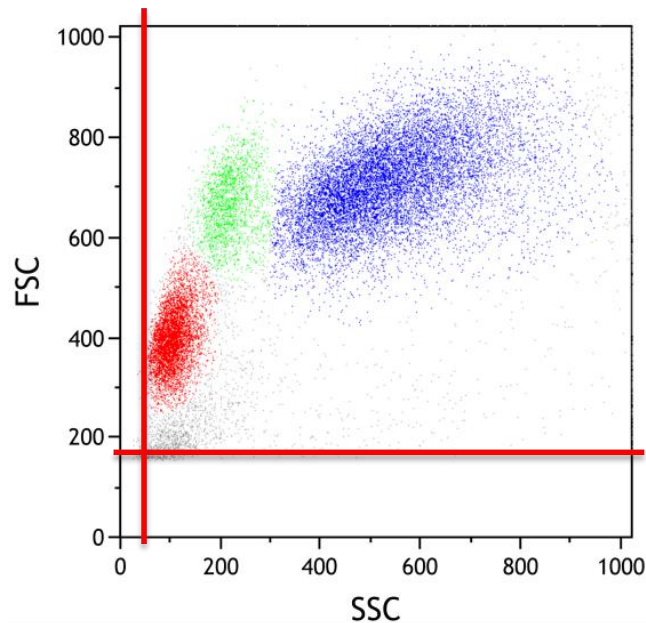
我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service reused herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

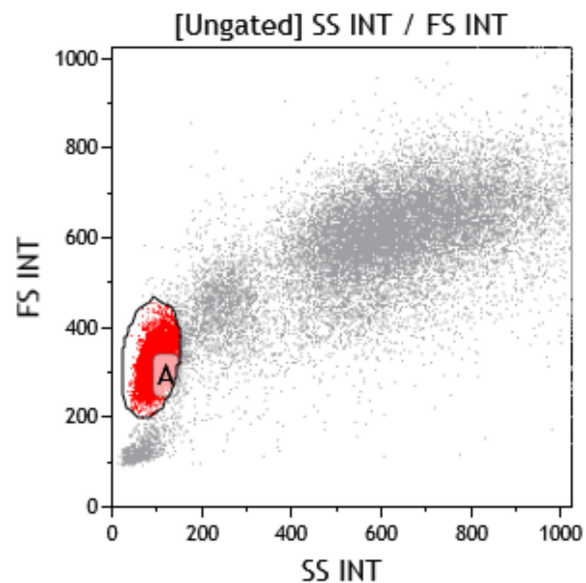
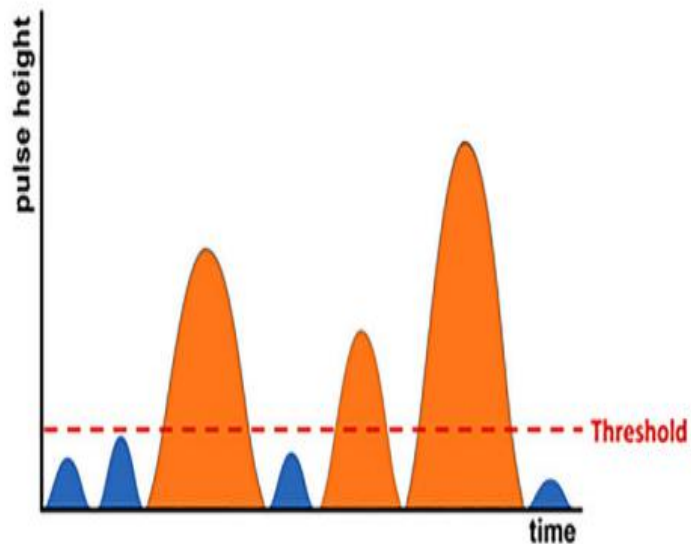
阈值：

- 数据采集的前提条件所选择的信号被称为阈值或触发信号，阈值可以量化，大于该阈值的细胞信号才会被收集，以排除不必要杂质的干扰，提高信噪比



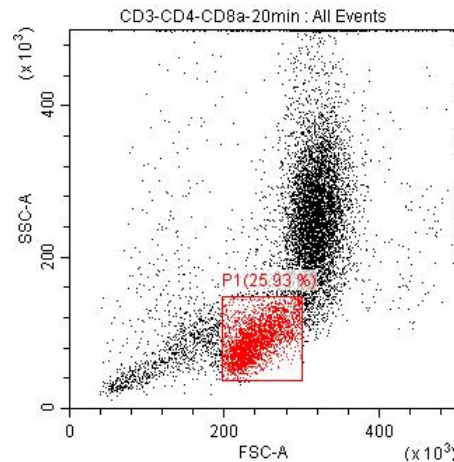
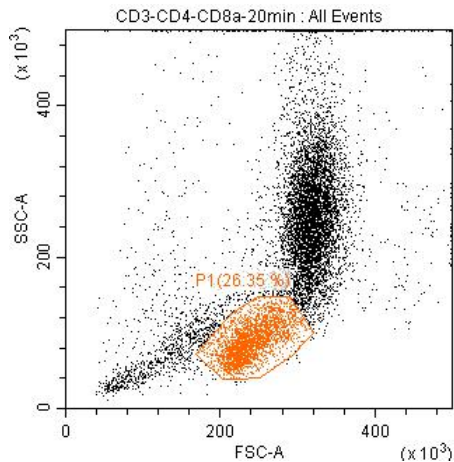
阈值

- 散射光设阈值：去掉大部分碎片，建议保留一点碎片信号



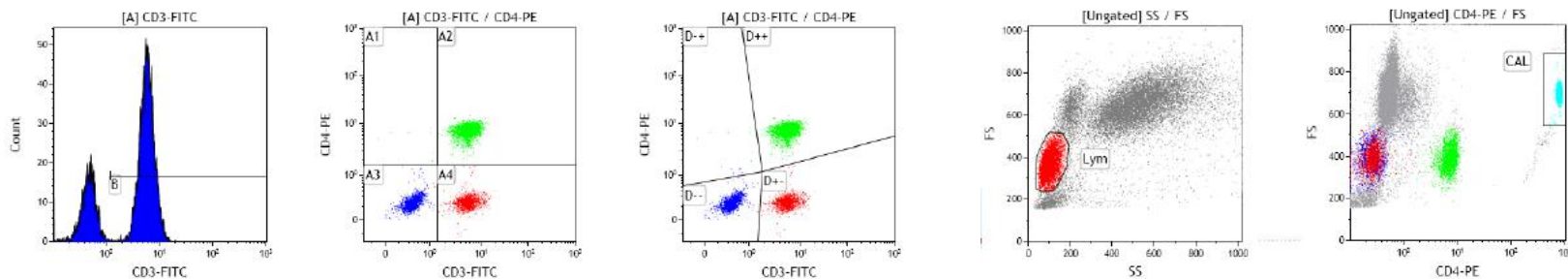
门 “Gate”

- 圈门：流式图中根据需要圈定一群细胞；
- 设门：将门内的细胞应用在其他图中进行进一步的分析，目的在于排除其他细胞的干扰，对目的细胞群进行更加细分的分析。
- 门的种类很多，包括水平门、十字门、铰链门、多边形们、矩形门、椭圆型门等等，门的名称及门内细胞群的颜色都可以自己定义。

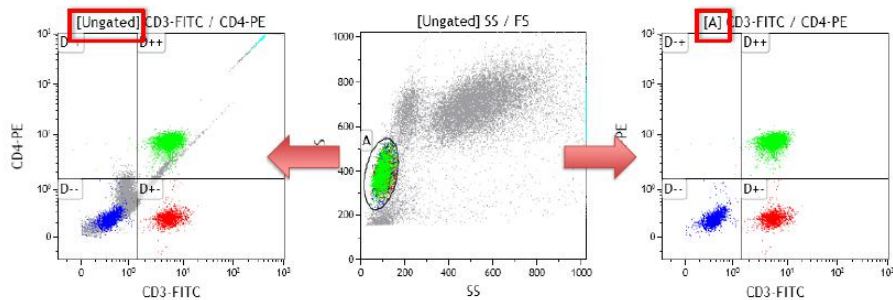


圈门/设门

圈门：在流式图中根据需要圈定一群细胞。

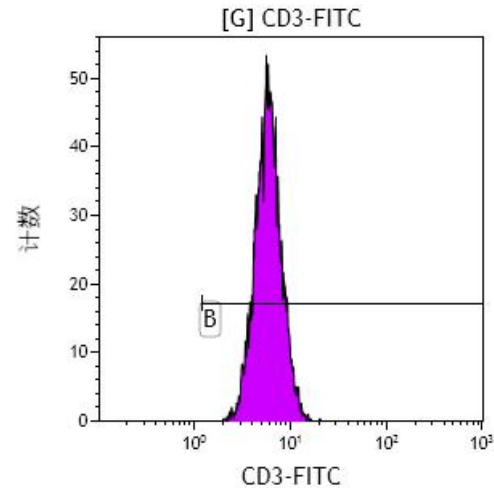
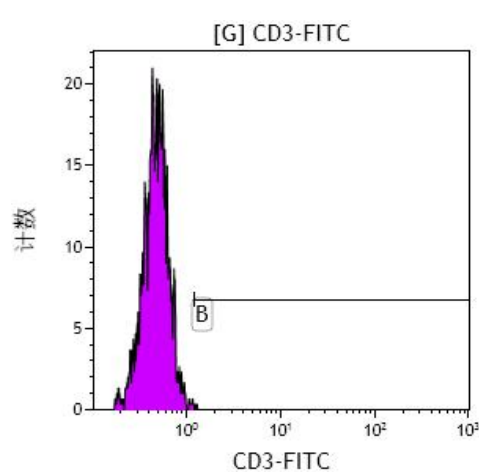
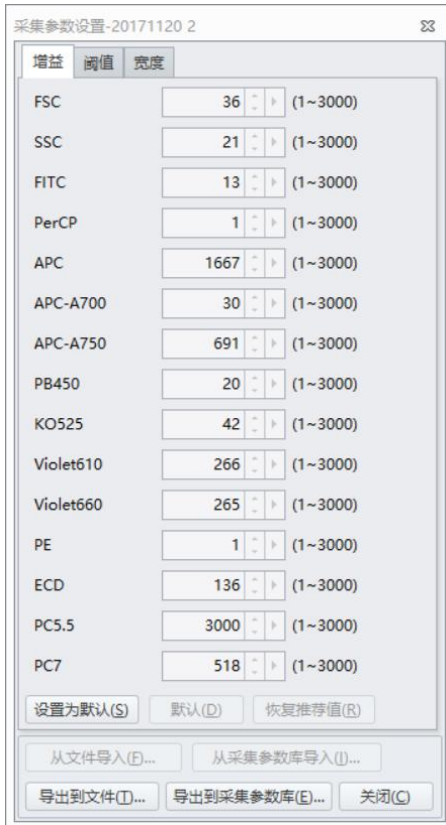


设门：将门内的细胞应用在其他图中进行进一步的分析。



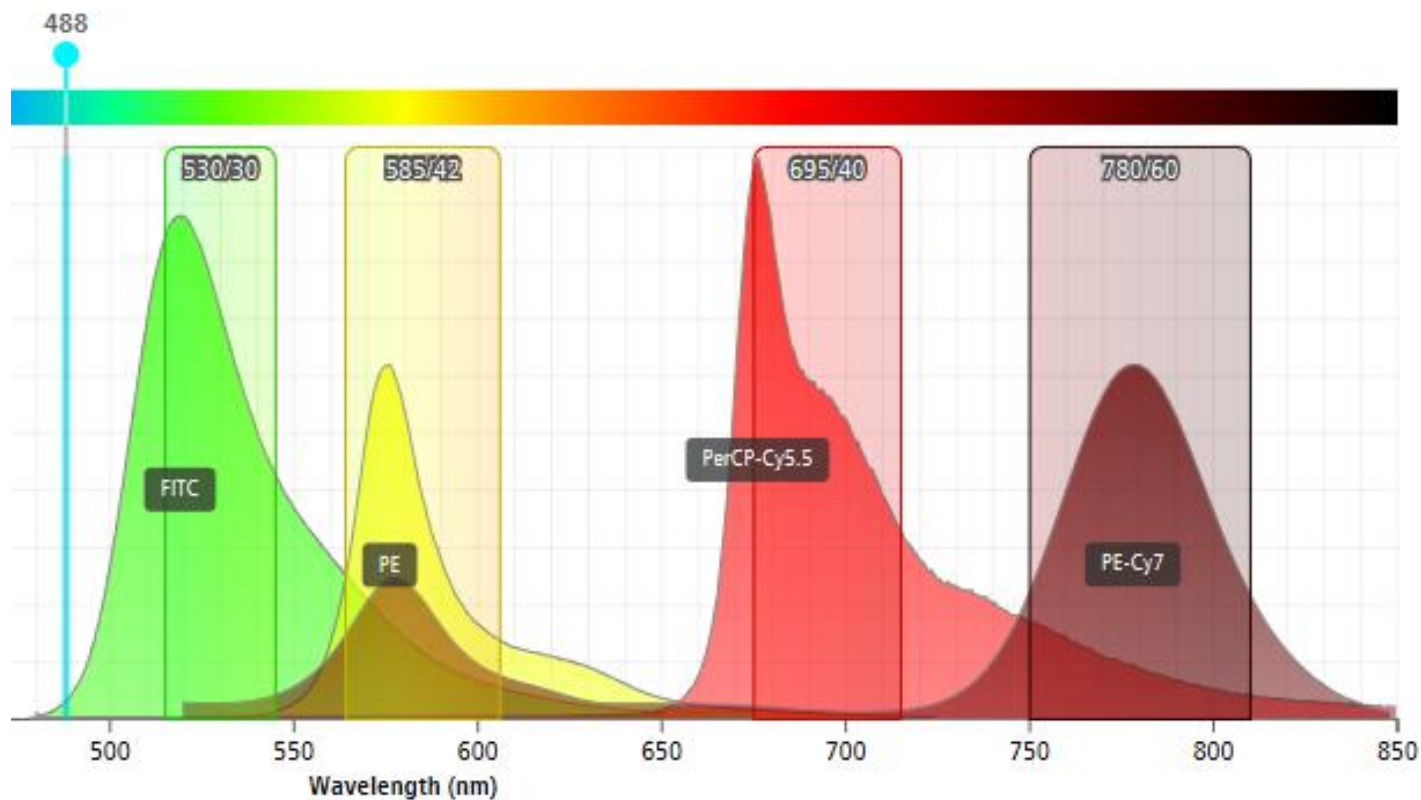
电压及增益：

- 目的：调节检测器的信号扩增程度，信号随着电压或增益的增加而增强。
- 作用：通过电压及增益的调节区分信号强弱不同的细胞。



荧光补偿

光谱重叠所引起的荧光渗漏是我们需要调荧光补偿的核心原理

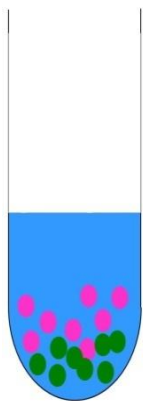


我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

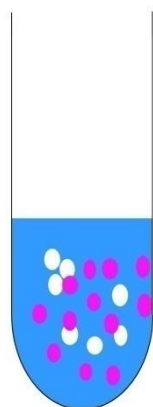
我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service reused herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

补偿的调节方法



细胞+抗体



细胞+该荧光的其它抗体



补偿微球 (Comp beads) + 抗体

我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

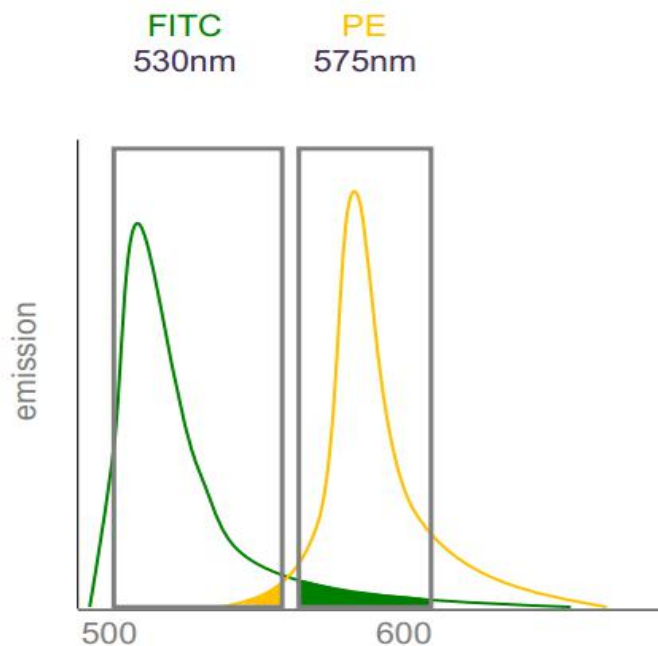
Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service names used herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

补偿的调节方法

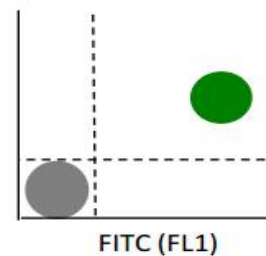
• 所有补偿调为“0”

• 调节电压，用同型对照或阴性对照，使阴性群位于“左下角”

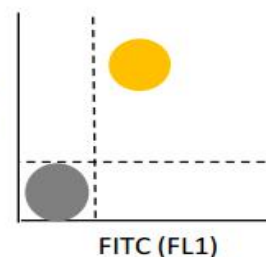
• 依单阳群体调节荧光补偿



FITC only sample



PE only sample



我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service reused herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

补偿的调节方法

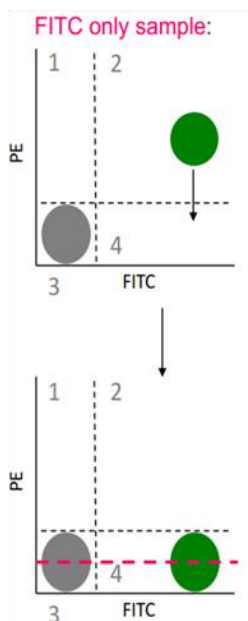
例如：FITC 与 PE 荧光补偿的调节

从PE通道中去除FITC的荧光信号：

1. 检测两管样品：
空白管； FITC 单标管

Region	Percent	MeanX	MeanY
1	0.0	*****	*****
2	0.0	*****	*****
3	60.00	0.3	0.24
4	40.00	31	0.23

相同的
Mean/Median值



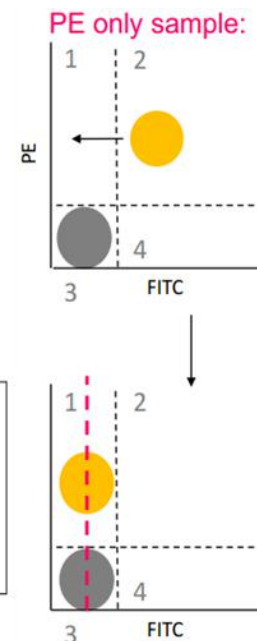
例如：FITC 与 PE 荧光补偿的调节

从FITC通道中去除PE的荧光信号：

1. 检测两管样品：
空白管； PE 单标管

Region	Percent	MeanX	MeanY
1	45.0	0.27	19.6
2	0.0	*****	*****
3	55.0	0.2	0.3
4	0.0	*****	*****

相同的
Mean/Median
值



补偿实验

图 6.1 补偿之前

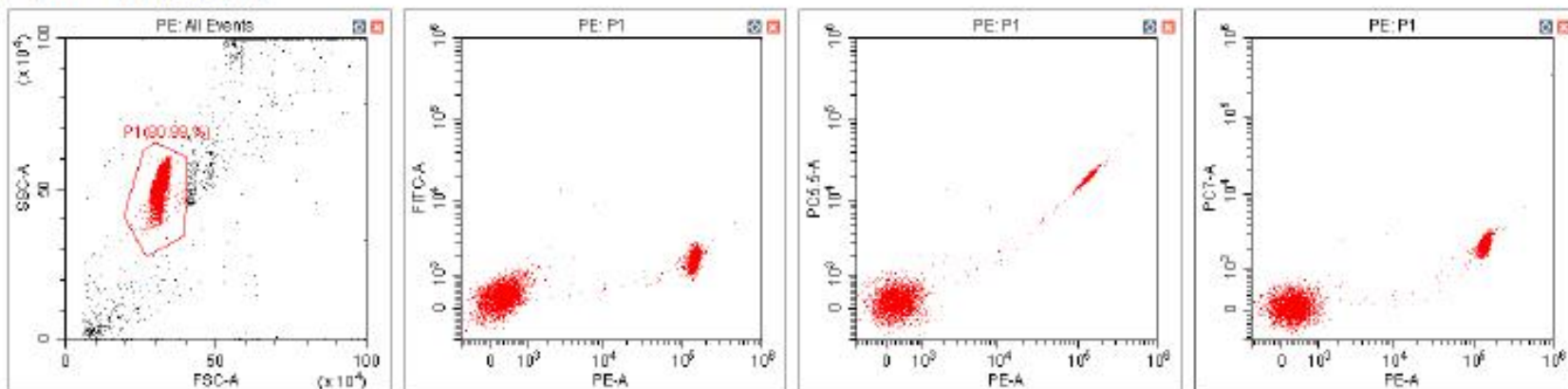
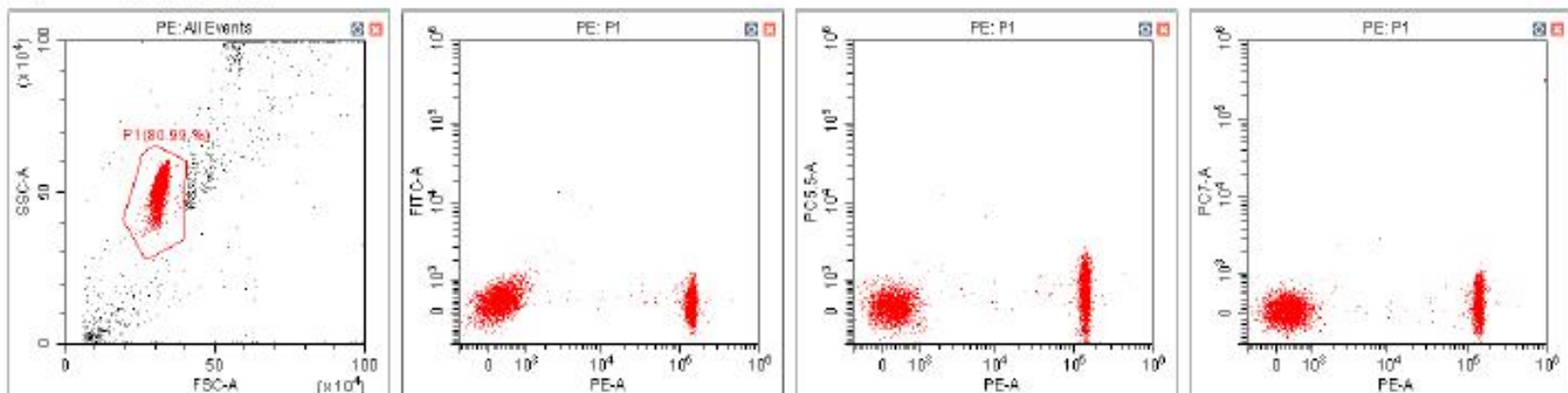


图 6.2 补偿之后

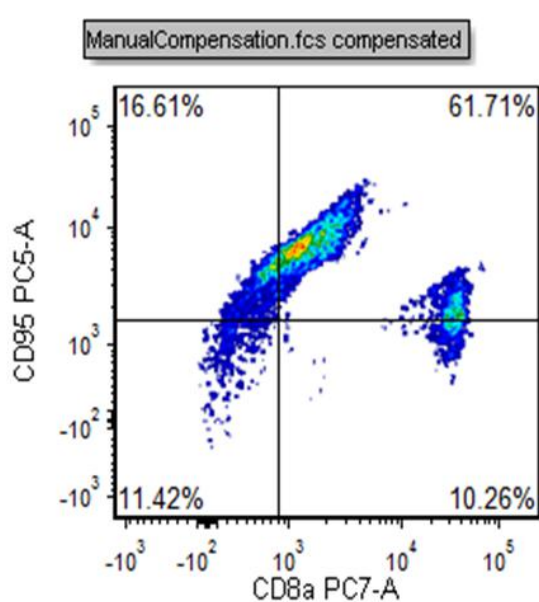


我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

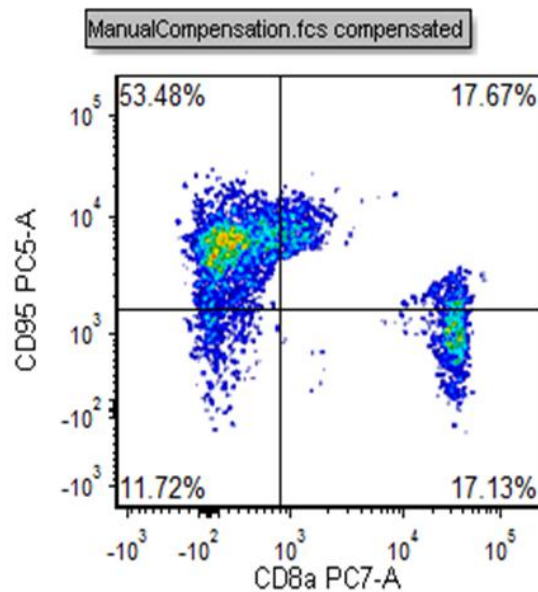
我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service reused herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

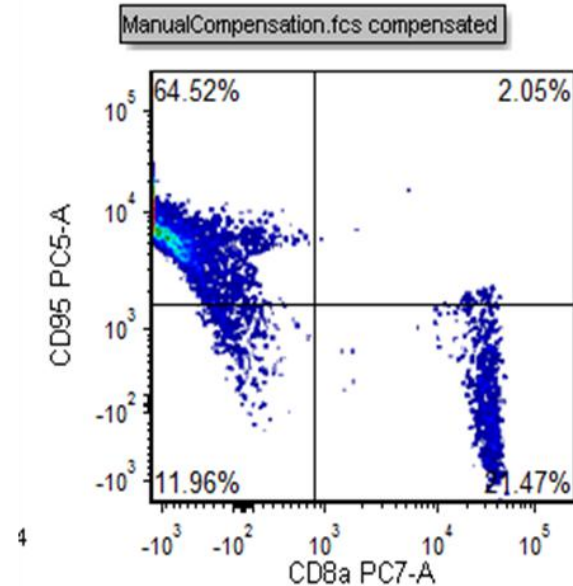
补偿的调节方法



补偿不足



补偿



过补偿

我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service reused herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

补偿矩阵

1

Autofl.	Channel	-R660-APC%	-R712-APCA7 00%	-R763-APCA7 50%	-V450-PB%	-V525-KO%	-V610%	-V660%	-IR840-A70%	-IR885-ITC%	-R525-FITC%	-R595-PC5.5%	-R763-PC7%	
0.00	R660-APC		7.91	24.43	0.00	0.00	0.00	8.23	0.00	0.19	0.00	0.00	0.57	0.00
0.00	R712-AP...	42.86		13.10	0.00	0.02	0.02	5.95	0.18	1.42	0.00	0.00	17.04	0.13
0.00	R763-AP...	12.23	29.87		0.00	0.04	0.00	1.17	1.85	1.10	0.01	0.00	3.81	5.44
0.00	V450-PB	0.00	0.00	0.00		0.78	2.13	5.54	0.00	0.68	0.00	0.00	0.00	0.00
0.00	V525-KO	0.00	0.00	0.00	51.96		0.36	1.06	0.00	3.06	3.58	0.04	0.00	0.00
0.00	V610	0.74	0.04	0.21	3.45	60.01		70.47	0.00	2.63	0.59	5.50	0.26	0.51
0.00	V660	18.41	1.39	4.05	0.31	7.80	22.57		0.00	6.50	0.06	0.56	0.55	0.06
0.00	IR840-A7...	0.00	0.02	7.73	0.02	0.00	0.00	0.00		32.22	0.00	0.00	0.00	3.48
0.00	IR885	0.00	0.00	3.35	0.01	0.00	0.00	0.00	2.74		0.01	0.00	0.00	0.74
0.00	R525-FITC	0.00	0.00	0.00	0.00	0.55	0.00	0.00	0.07	2.49		0.89	0.31	0.89
0.00	R595-PE	0.00	0.00	0.03	0.00	0.52	3.32	0.11	0.00	3.37	25.94		6.56	13.81
0.00	R660-PC...	2.38	2.16	0.89	0.01	0.04	1.01	0.69	0.14	0.90	0.74	3.82		21.8
0.00	R763-PC7	0.43	1.02	2.80	0.10	0.00	0.15	0.10	0.51	0.43	0.08	0.35	24.87	

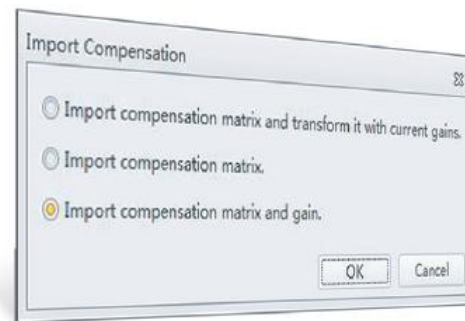
查看补偿矩阵，评估实验中各种荧光染料之间的溢出效应。将所得数值保存到库或矩阵中备用

2

Fluorescence	Compensation Keyword	Label	Keyword	Lot Num	Unit	Height	Area
FITC	Test 1 2016-12-21 08:58:50		Test 1			1346	0.73
PE	Test 1 2016-12-21 08:58:50						
ECD	Test 1 2016-12-21 08:58:50						
PC5.5	Test 1 2016-12-21 08:58:50						
PC7	Test 1 2016-12-21 08:58:50						
APC	Test 1 2016-12-21 08:58:50						
APC-A700	Test 1 2016-12-21 08:58:50						
APC-A750	Test 1 2016-12-21 08:58:50						
PE450	Test 1 2016-12-21 08:58:50						
W0323	Test 1 2016-12-21 08:58:50						
Violet405	Test 1 2016-12-21 08:58:50						

补偿库存储先前采样的溢出值和采样过程使用的增益。可从库中选择数值创建新的矩阵用于以后的实验。

3



导入补偿矩阵时，三个选项可选。

流式在科研中的常规应用

我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service names used herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

流式检测的基础？

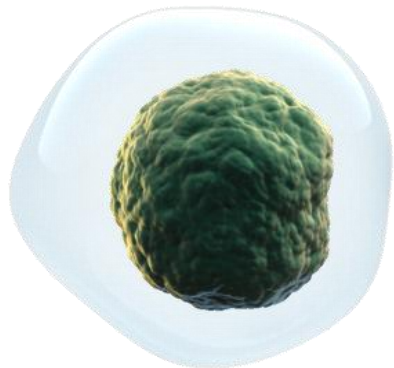
- 检测的是单个细胞或颗粒
- 检测的是光学信号

流式应用的范围？

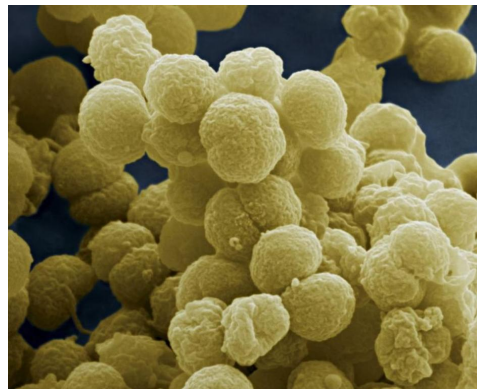
- 具备荧光：抗体，染料，荧光分子.....
- 能制备为单细胞(颗粒)悬液

流式应用-检测对象

细胞



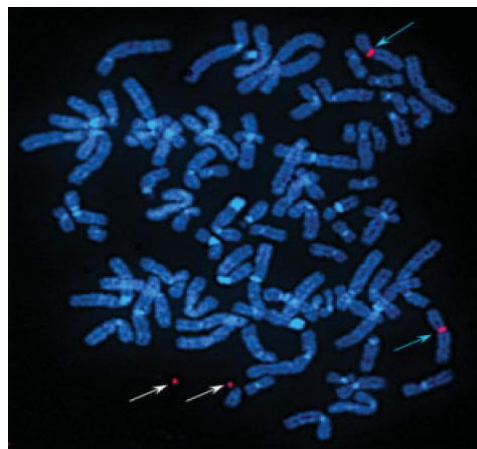
细菌



微藻



染色体



单个的生物颗粒、可溶性细胞因子等

流式应用

- 基础的生物学功能研究

- 细胞活性、存活率研究
- 细胞凋亡、凋亡通路相关蛋白研究
- 细胞增殖活性研究
- 细胞周期、DNA倍体分析和周期蛋白、细胞周期通路研究
- 细胞生理功能研究（细胞内pH值、细胞内钙流、膜电位）
- 细胞防御功能研究（吞噬功能、呼吸氧爆发）

- 免疫功能研究（包括淋巴细胞亚群分析、细胞绝对计数、细胞活化、细胞因子、调节性T细胞、树突细胞、抗原特异性T细胞、Th17细胞等）

- 干细胞研究（SP,IPS,胚胎干细胞,肿瘤干细胞,造血干细胞,间充质干细胞分析/分选）

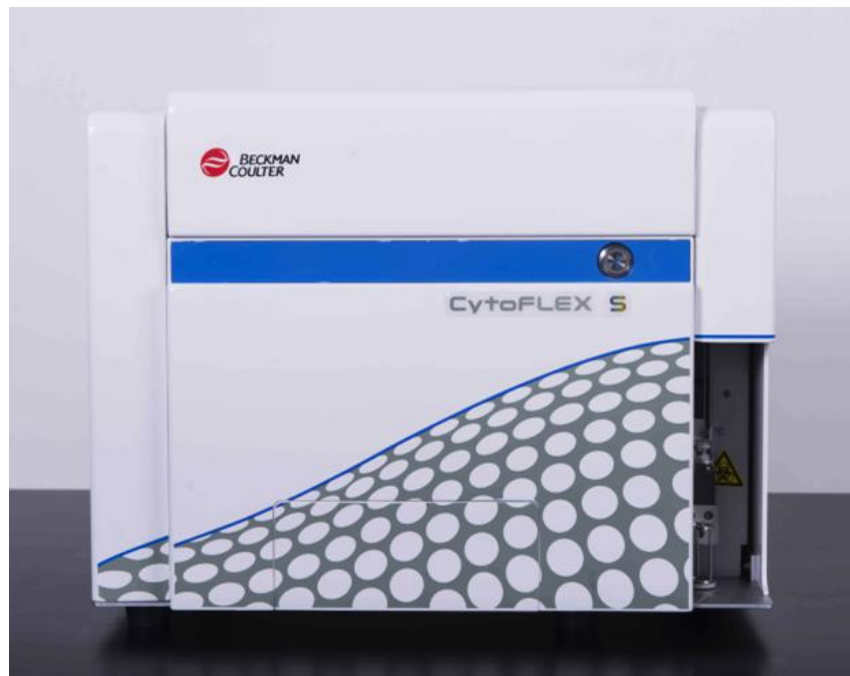
- 肿瘤相关研究（循环肿瘤细胞、肿瘤相关基因表达、肿瘤发病机制、抗肿瘤药物作用机制和疗效评价、肿瘤多药耐药机制等）

流式应用

- 药物筛选（功能性化合物筛选、药物机制、药理学研究、药物毒副作用研究）
- 抗体研发中应用（克隆筛选、特异性评价、活性评价、功能性研究、基因工程抗体研究）
- 端粒分析（细胞衰老、肿瘤、感染疾病、自身免疫疾病研究）
- 磷酸化蛋白的检测及信号传导通路的研究
- 蛋白质相互作用（荧光FRET分析，CFP/YFP）
- 微生物鉴定、活性分析
- 环境生态研究：海洋\土壤\大气等生物学研究
- 植物学（倍体分析、光合作用、生态毒理等）
- 食品工业（食品安全、营养评价）
- 农畜牧学（优良育种、疾病预防机制研究等）

流式细胞术常见科研应用

- 细胞周期分析
- DNA倍体分析
- 细胞凋亡分析
- 细胞增殖分析
- 抗原表达分析
- 线粒体膜电位分析
- 钙离子流分析

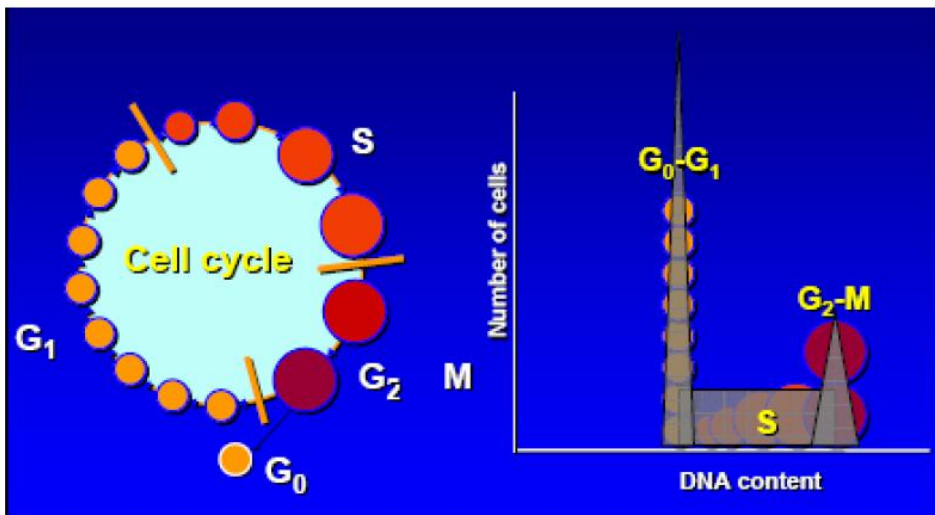


我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service reused herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

细胞周期检测与分析——DNA单染法



4N

2N

染料	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)	是否需要固定	是否需要 RNA酶	常用检测项目
PI	488	620	需要	需要 (CG)	周期
7AAD	488	635~675	需要	需要 (CG)	细胞死活鉴定
DAPI	405/355	461	需要	不需要	周期
Hoechst33258	405	460	需要	不需要	周期
DRAQ7	640	700	需要	不需要	细胞死活鉴定
Hoechst33342	405		不需要	不需要	周期
DRAQ5	640	700	不需要	不需要	周期

我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service reused herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

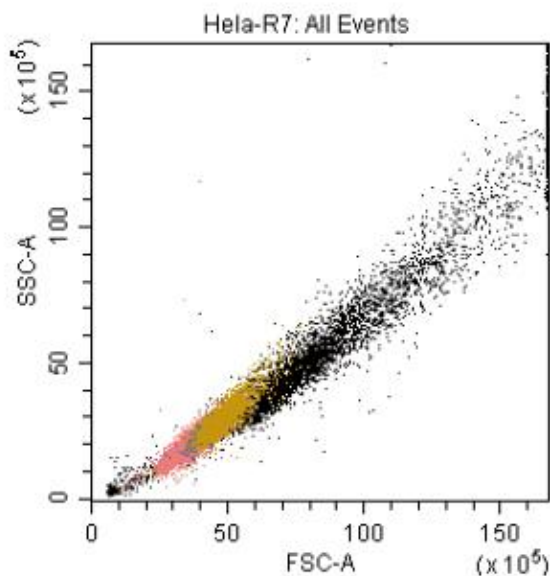
细胞周期检测与分析——DNA单染法

实验流程

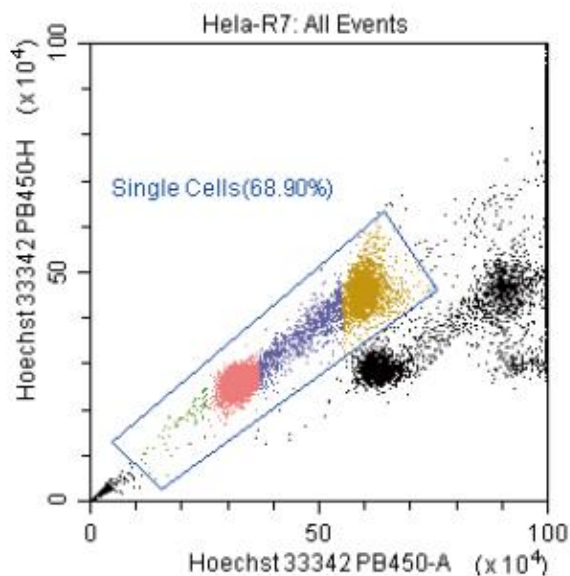
1. 细胞固定：300g离心5min，收集细胞沉淀，弃上清，用**预冷PBS**洗涤两次，弃上清，**逐滴加入-20°C预冷的70%乙醇**，边加边摇匀，置于**-20°C冰箱固定4h以上**（PerFix-nc Buffer 1，15min）。
2. 细胞染色：300g离心5min，弃上清，用2mL的PBS洗涤2次，（注意避免Dnase污染）加入0.5ml **PI（1mg/ml）和Rnase（2mg/ml）** 室温避光孵育15min。
3. 用300目尼龙网膜**过滤**样本后上机。PI具有很强的粘附性，容易使细胞聚团！
4. **低速**上机分析

细胞周期检测与分析——DNA单染法

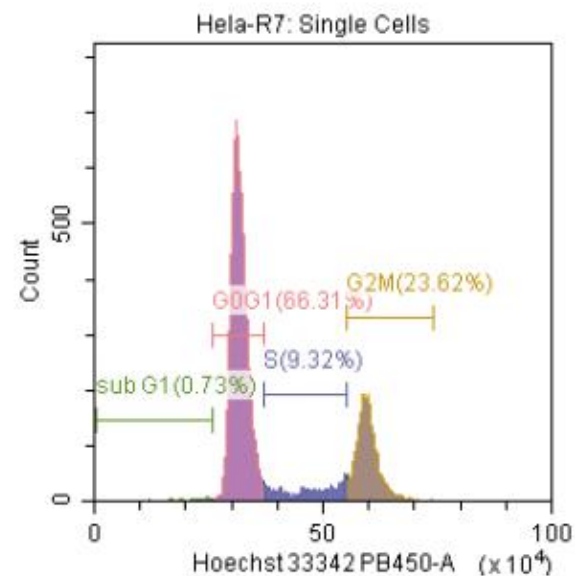
数据分析



- X: SS Y: FS
- 前向触发
- 将电压调至合适位置, 使所测细胞均可见



- X: Hoechst-A
- Y: Hoechst-H
- 改图主要用于排除粘连体



- 单参: Hoechst-A
- 电压调至合适位置, 最好将整个周期图调至中间, 适合软件拟合

细胞周期检测与分析——DNA单染法

注意事项

- 进样速度：一般检测细胞浓度调整为 $2^5 - 2^6$ /ml，**进样速度为低速**。若峰形较宽，可能就是进样速度太快，另外仪器质控定期做，尽可能排除因机器设置引起的峰形加宽，1小时内上机，染色与检测的时间过长容易造成CV增大
- 通过W和A或者H和A**去除粘连**
- 不同于蛋白染料和细胞之间的牢固结合，DNA与染料的结合是一种结合态和游离态之间松散的平衡，不是很牢固，洗涤会造成染料丢失，降低核酸的特异性荧光，造成测量值变小，因此，DNA染色时**一定不要洗涤**。
- **配70-75%酒精一定要用纯水**，PBS会有盐析出，对细胞会有机械损伤。
- 如果加乙醇过程中产生大量絮状物，说明细胞状态差，或制备过程中部分或大多数细胞损伤，细胞破裂，DNA释放缠绕细胞，造成团块。这种样品需要重新制备。
- 对于有**GFP的细胞**，用乙醇处理后，容易导致胞内可溶性的GFP在破膜后漏出，从而使GFP荧光降低或缺失。可以细胞先用0.5%多聚甲醛固定15min，然后以70%乙醇破膜，最后用含RNase的PI染液染色。



我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

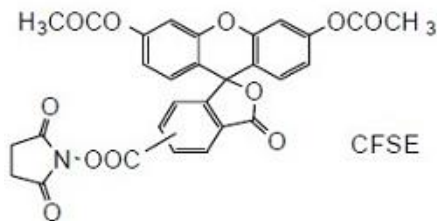
我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service names used herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

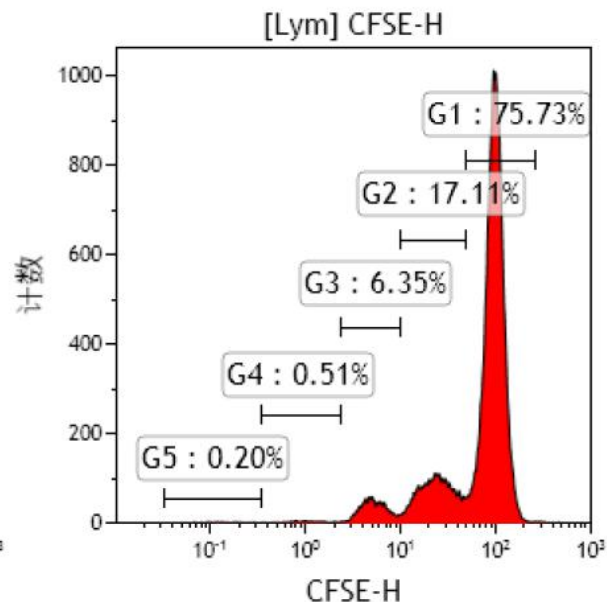
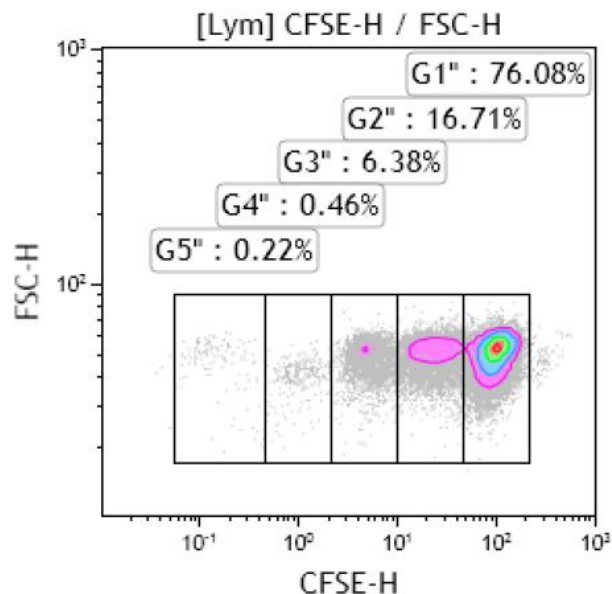


CFSE研究细胞增殖

由于 CFSE 的荧光强度会随着细胞的分裂而递减，CFSE 可分配至两个子代细胞中，因此，它通常被应用于细胞增殖研究领域之中。



羧基荧光素琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 是一种荧光细胞染料，它能够轻易渗透细胞，并通过琥珀酰亚胺基与细胞内分子进行共价结合。CFSE 可在细胞内存留较长时间，且进入后，也不会向其他细胞转移。



CFSE研究细胞增殖

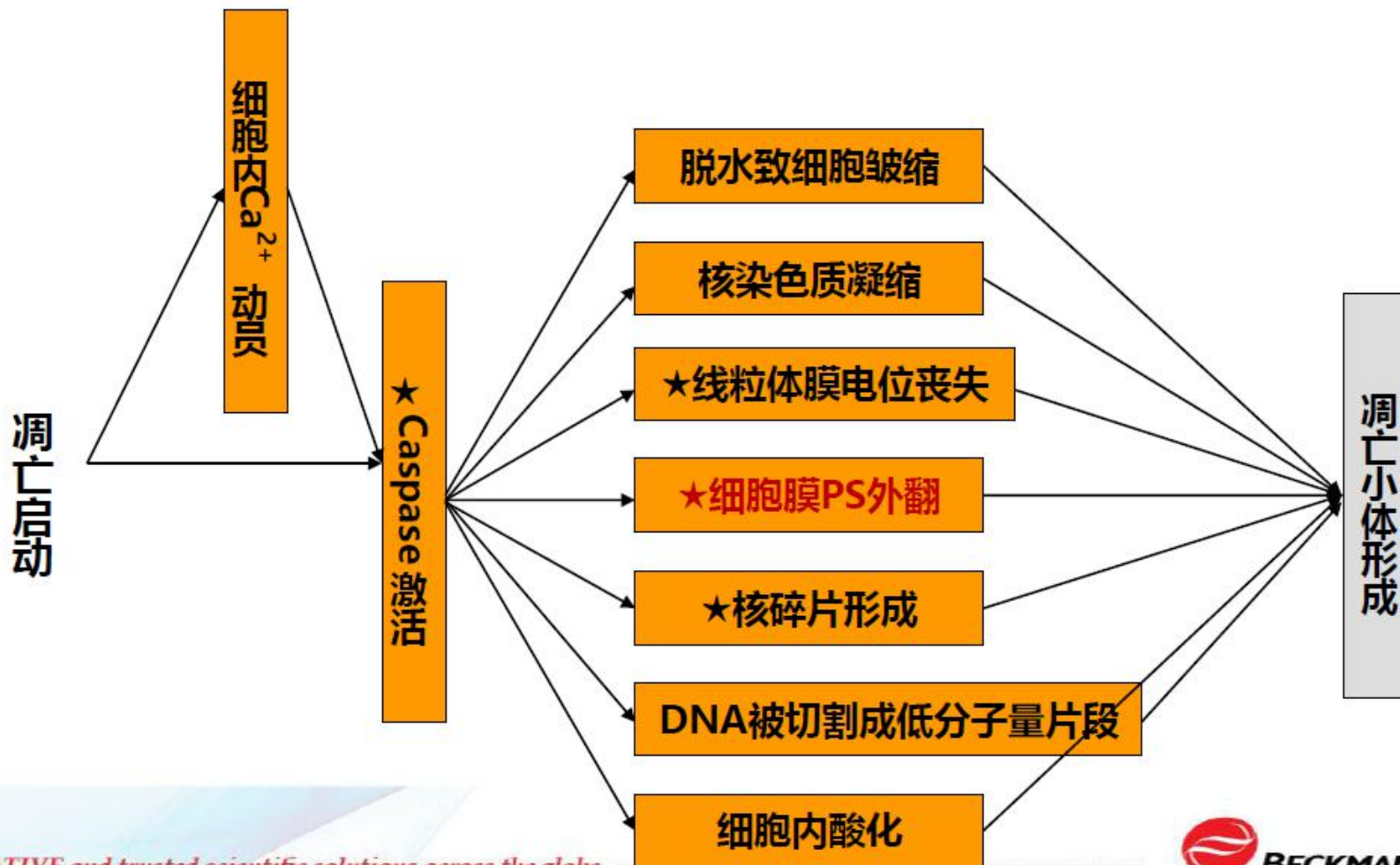
实验流程

1. 取 10^6 细胞悬液，DPBS洗涤细胞除去残留的血清蛋白后，DPBS重悬
2. 加CFSE（ $5 \mu\text{mol/L}$ ）， 37°C 孵育15min，离心收集细胞
3. 加入10%FBS终止反应，离心重悬于完全培养基，取一部分上机，其他继续培养
4. 培养后上机检测

注意事项

- 该方法不是跟踪细胞核的变化，而是胞浆中染料的倍比减少
- 通过将标记的细胞与未标记的对照细胞进行比较来确认细胞标记的亮度。另外在初始染CFSE时可以先测一下初始浓度得到起始位置
- 初始浓度太低，细胞标记的荧光强度不够，过高会导致细胞死亡。
- 可加染活性染料，排除死细胞干扰。

细胞凋亡检测与分析



细胞凋亡检测与分析

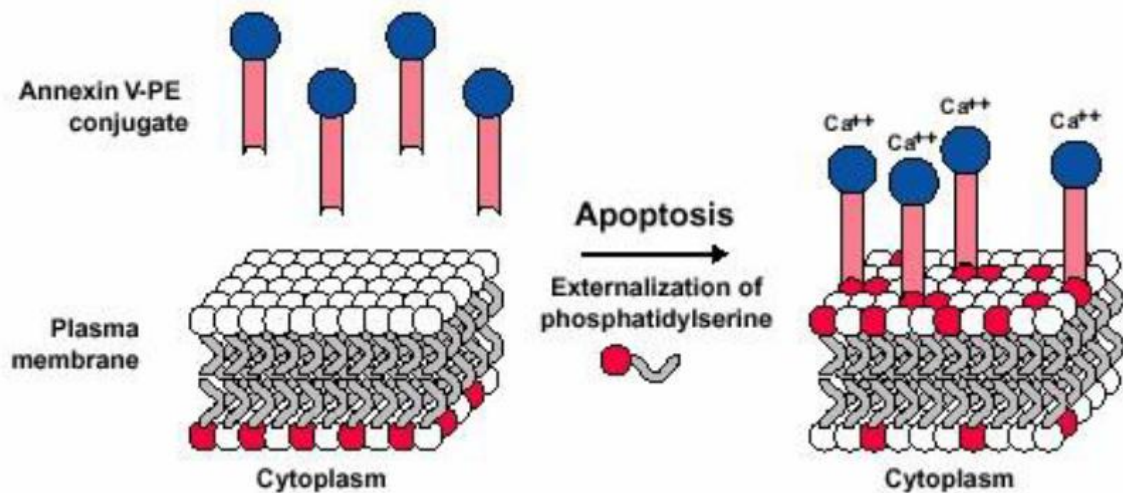
- **常用检测方法**

- 核酸染料单染法
- AV+PI双染法
- DNA断裂标记分析（TUNEL法，ISNT法）
- 线粒体膜电位法
- 特异性标记物（活性Caspase 3)检测法

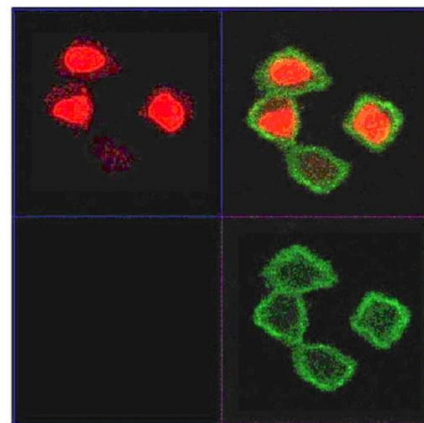
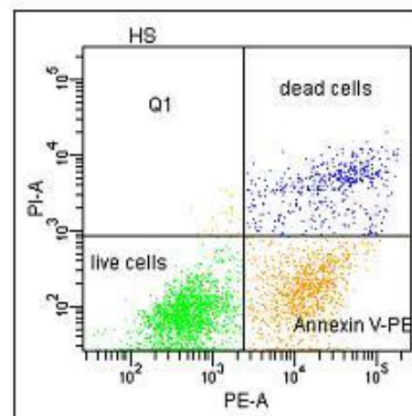
细胞凋亡检测与分析——AV+PI双染法

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.



我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service reused herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

细胞凋亡检测与分析——AV+PI双染法

实验流程

(1) 新鲜活细胞收集，采用1000转离心5分钟，弃去培养液。用PBS 2ml重悬细胞，1000转离心5分钟洗涤一次，弃上清，留沉淀。

(2) 用试剂盒专用buffer（含Ca²⁺）重悬细胞，细胞数 $(1\sim 10) \times 10^5$ 个细胞200ul细胞悬液，加入Annexin V 试剂5μl，**室温避光孵育15分钟**，然后加入10μl PI试剂，立即上机检测或冰箱内避光保存4小时内检测。

细胞凋亡检测与分析——AV+PI双染法

数据分析

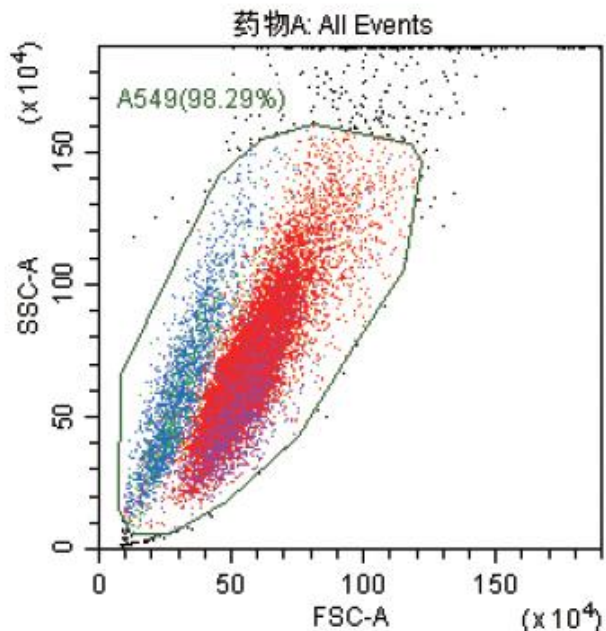


图 1

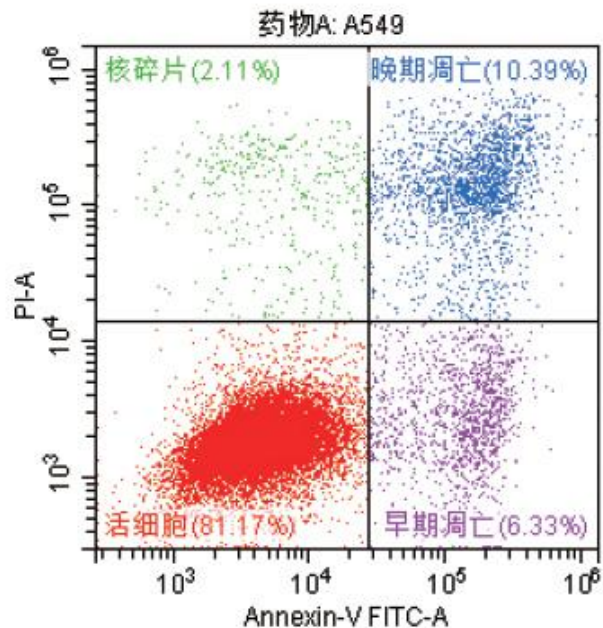


图 2

细胞凋亡时，胞浆浓缩，胞膜破裂，细胞体积减小，而胞内细胞器聚集，核酸断裂，胞内颗粒成分更加复杂，因此在流式图一中能够看到前向减小而侧向增大的一群凋亡细胞群体，从图二可以看出，加药刺激 A549 出现凋亡现象，早期凋亡和晚期凋亡分群明显，数据清晰，该结果充分体现仪器优异的检测灵敏性！

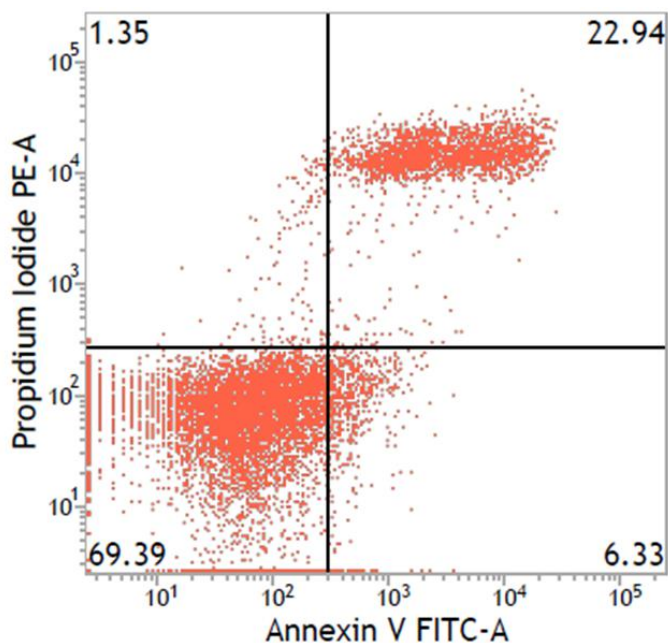
细胞凋亡检测与分析——AV+PI双染法

注意事项

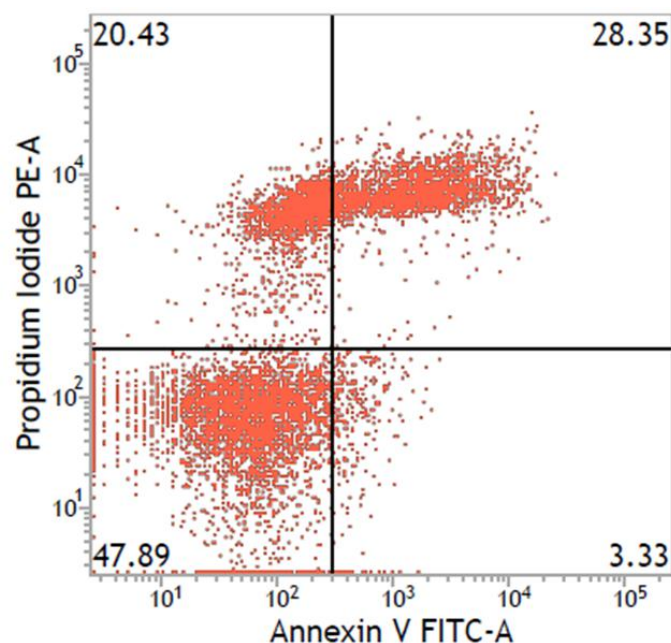
- ◆ 保证**细胞活性**：避免用力吹打，避免胰酶消化时间过长，缩短上机时间，可上机前5min再加核酸染料
- ◆ 必须**活细胞**检测，不能用能破坏细胞膜完整性的固定剂和穿透剂固定或穿膜
- ◆ **EDTA**会螯合**钙离子**，尽量避免使用。
- ◆ 药物、病毒、质粒可能对细胞**本底荧光**都有影响。
- ◆ 左上象限一般是由于处理方式不当，或处理时间太久导致的非凋亡途径的细胞死亡，左上象限出现大量细胞，需要优化处理的**浓度**和**时间梯度**，以及优化**细胞培养**，**细胞消化**流程。
- ◆ 如果样品来源于血液，请务必除去血液中的**血小板**。因为血小板含有PS，能与Annexin V结合，从而干扰实验结果。

细胞凋亡检测与分析——AV+PI双染法

注意事项



正常漩涡器混匀后检测



200ul枪头反复吹打20次后检测

我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service names used herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

细胞凋亡检测与分析——AV+PI双染法

注意事项

空白对照：诱导凋亡的细胞不加荧光试剂

调电压

单染对照：诱导凋亡的细胞（FITC/PI）

调补偿 2管

阴性对照：正常细胞加该实验的所有荧光试剂

确定正常细胞状态，排除假阳性

阳性对照：诱导凋亡的细胞加该实验的所有荧光试剂

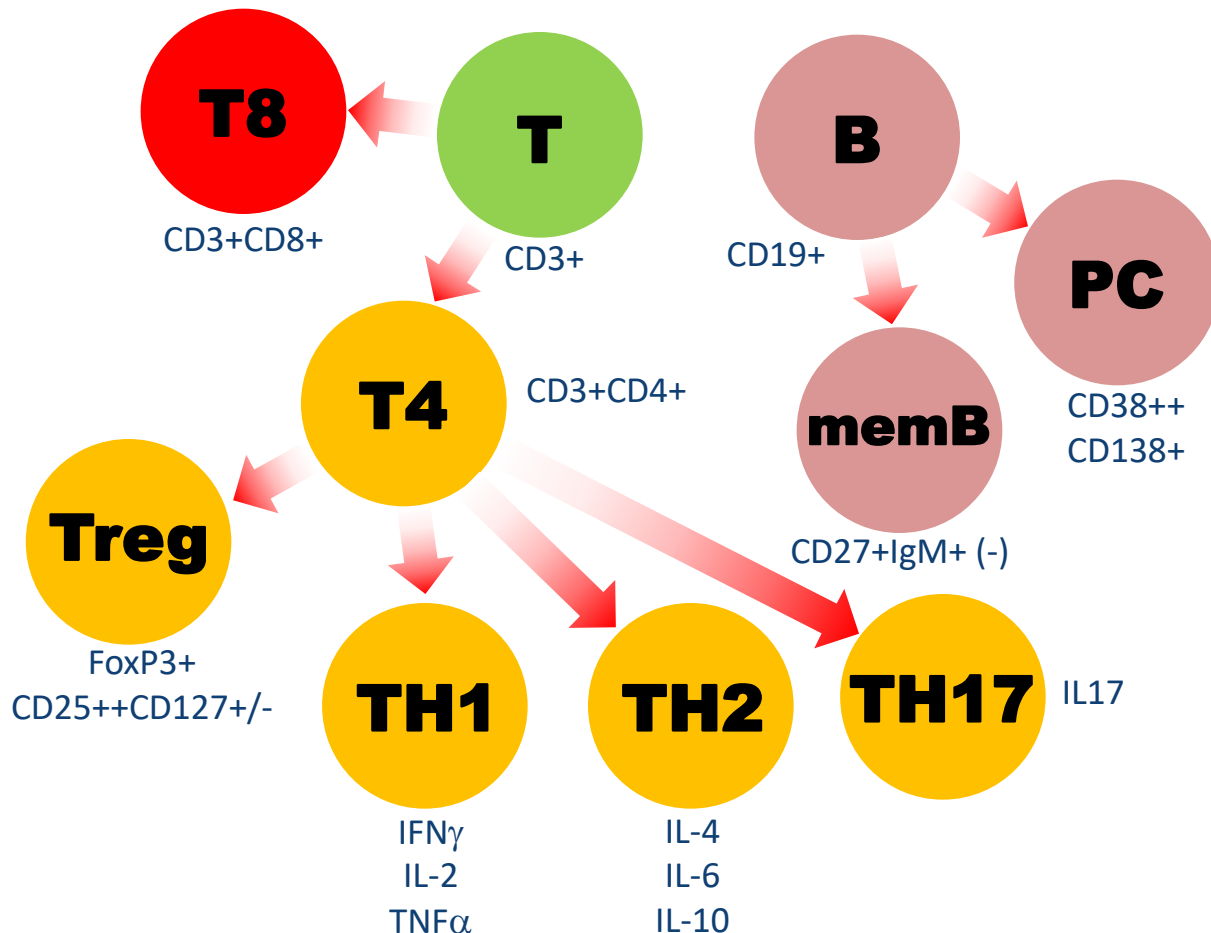
确认试剂、仪器、操作没有问题

细胞表型分析

Innate Immune Response
(no antigen specificity, no memory)



Adaptive Immune Response
(specificity to antigens after presentation, memory compartment)



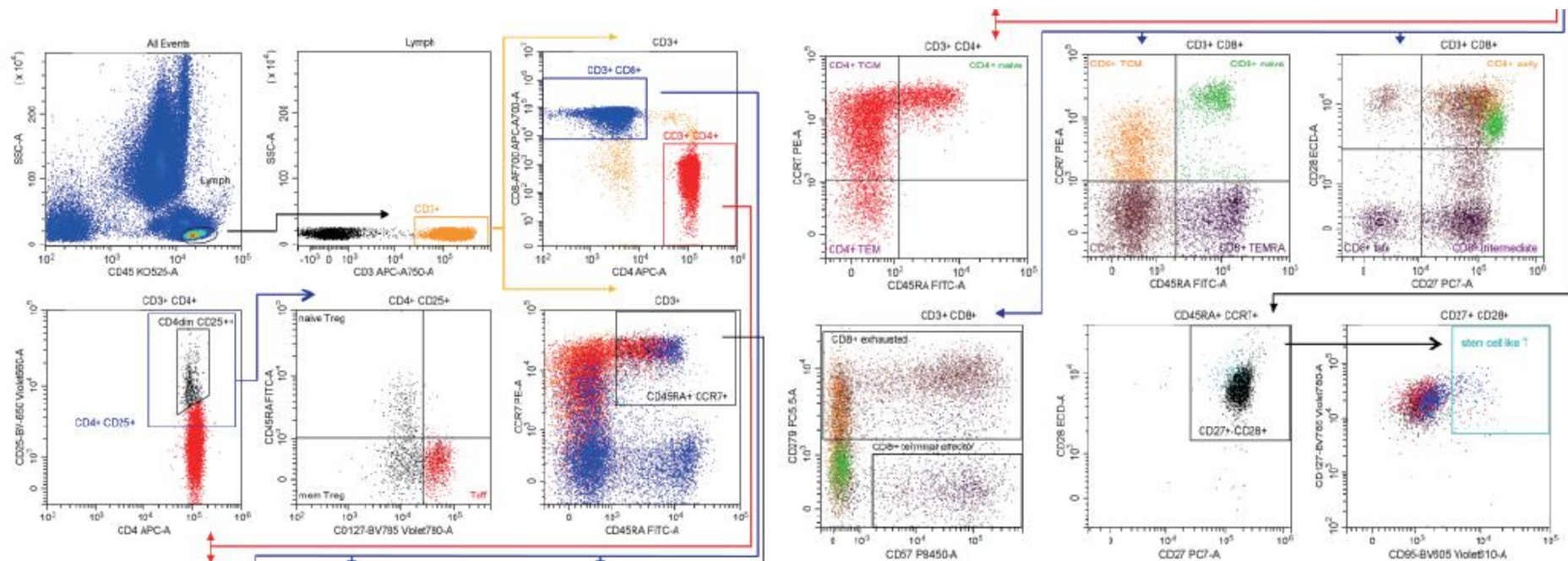
我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service reused herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

13 色 T细胞亚群分析

利用13 色DuraClone 干粉试剂对人类 T 细胞亚群进行鉴定分析，还能够最大程度降低样品制备的工作量。



我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service reused herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

流式数据分析与方案优化

我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

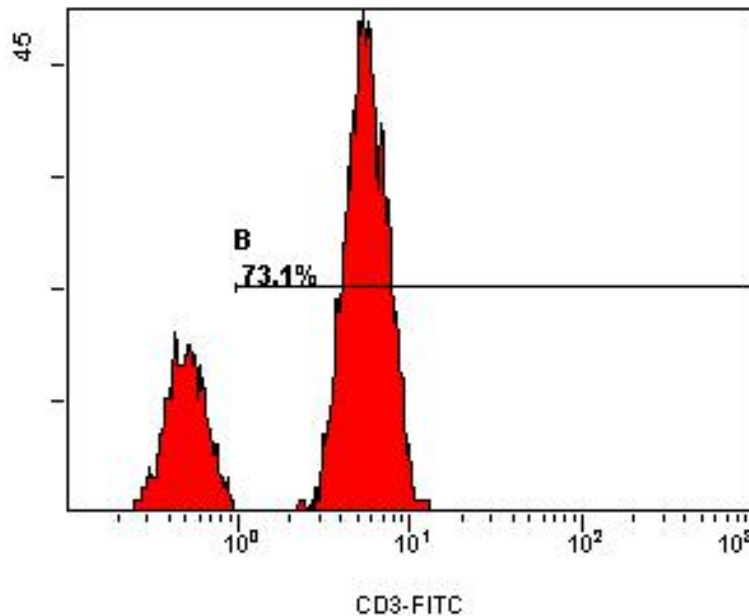
我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service names used herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

数据分析-直方图

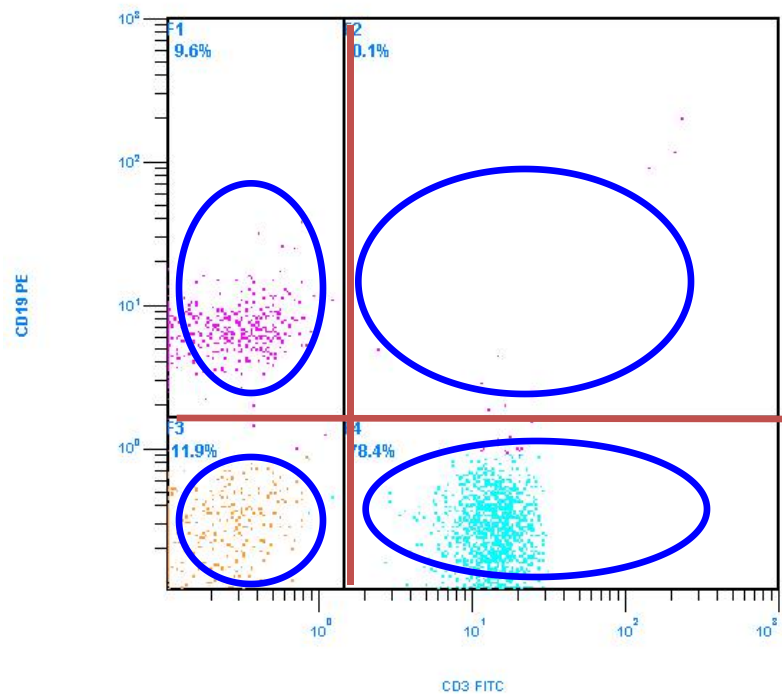
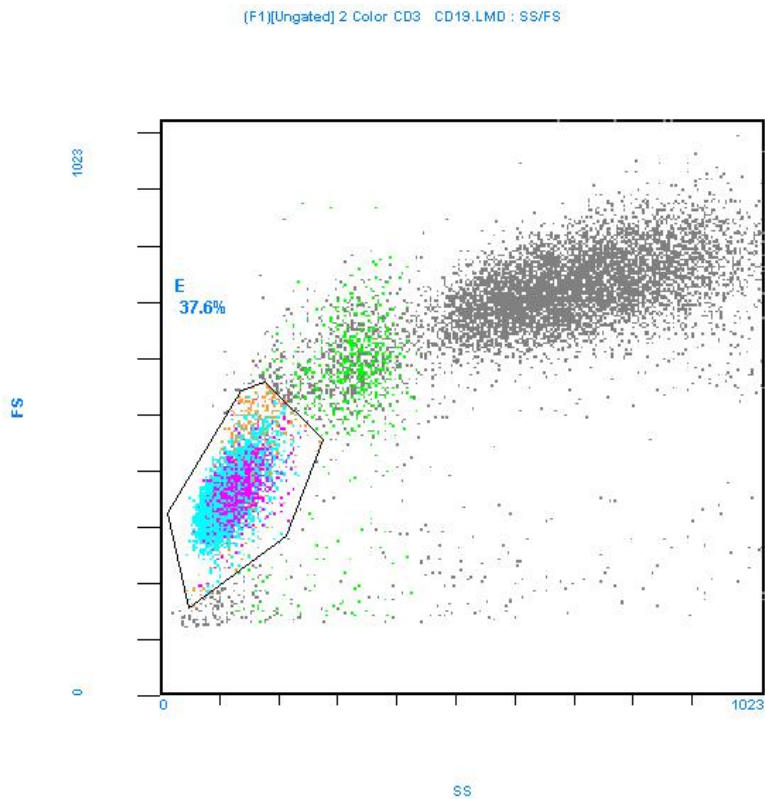
- 直方图分析（Histogram Plot）

横坐标表示散射光或荧光信号相对强度值，其单位是道数，
纵坐标表示细胞数



数据分析-双参数图

散点图分析



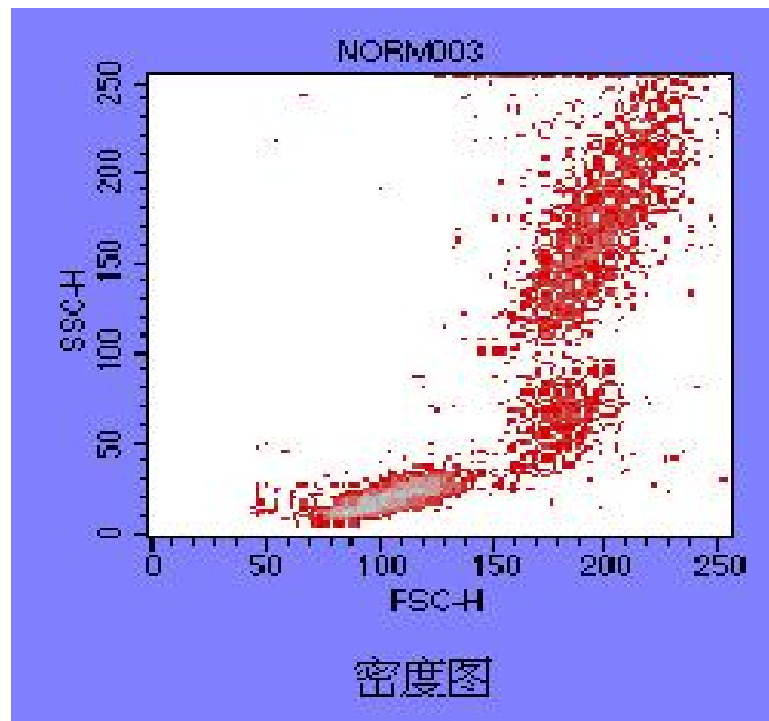
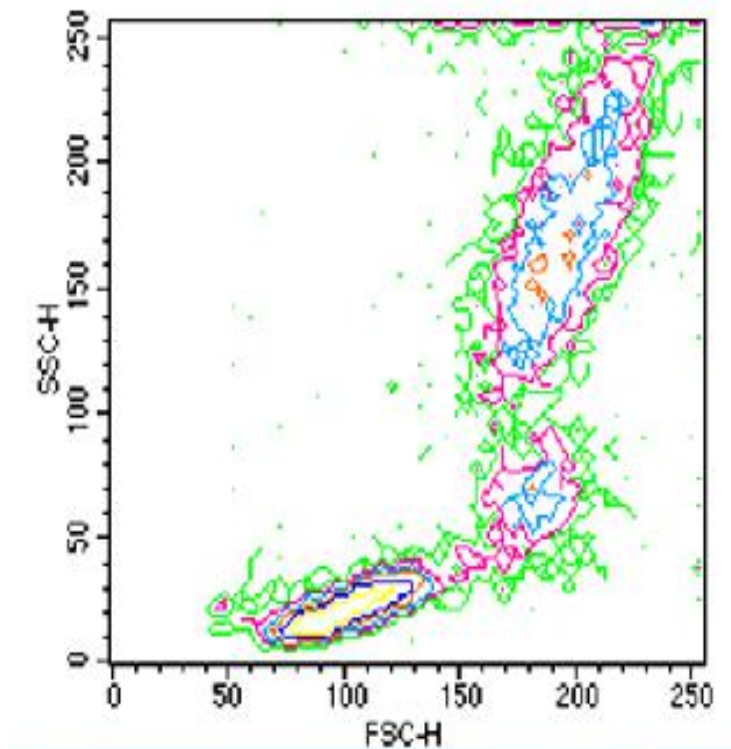
我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service names used herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States and other countries.

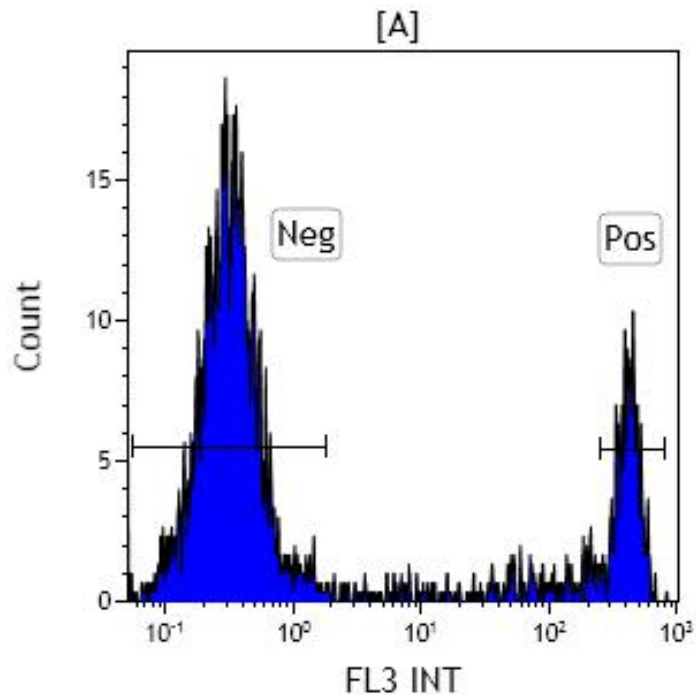
数据分析-双参数图

- 等高图和密度图：适用于获取细胞数量较大，细胞分群不易辨别时



荧光电压的优化

- 染色指数SI: 多色染色中, 评估阳性细胞群和阴性细胞群的分离 (考虑阴性群体的spreading)



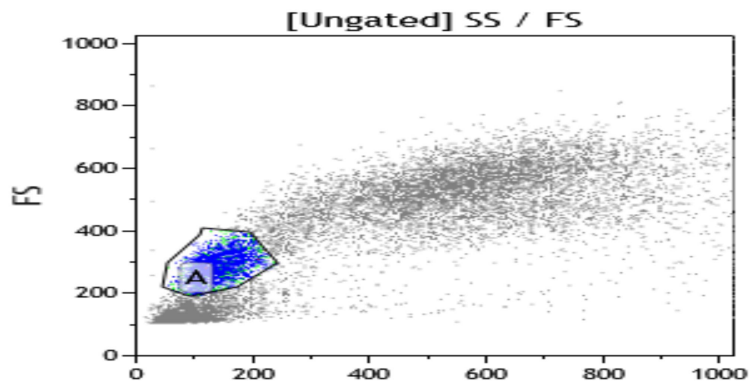
Gate	X-Mean	X-Stdev
All	78,37	161,02
Neg	0,37	0,23
Pos	420,15	82,32

Staining Index:

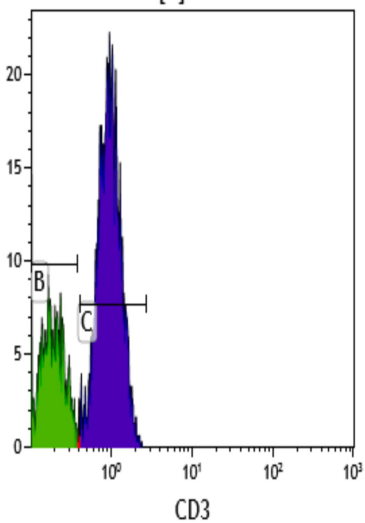
$$(MFI(pos)-MFI(neg))/2*SD(neg),$$
$$(420.15-0.37)/2*0.23 = \underline{913}$$

荧光电压的优化

➤ 调节荧光通道电压获得最佳染色指数



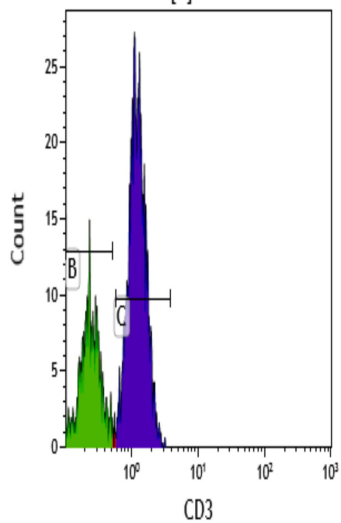
[A] CD3



电压=304v

SI=5.786

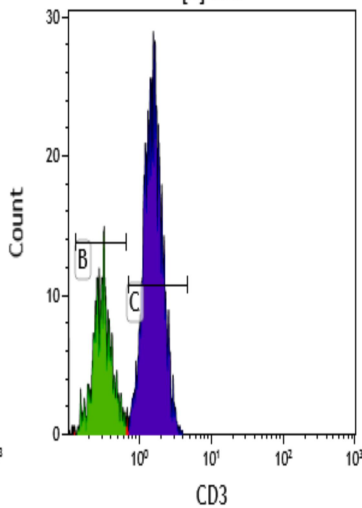
[A] CD3



电压=314v

SI=6.375

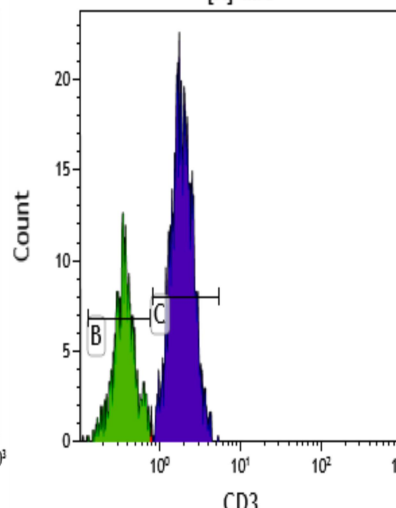
[A] CD3



电压=324v

SI=6.450

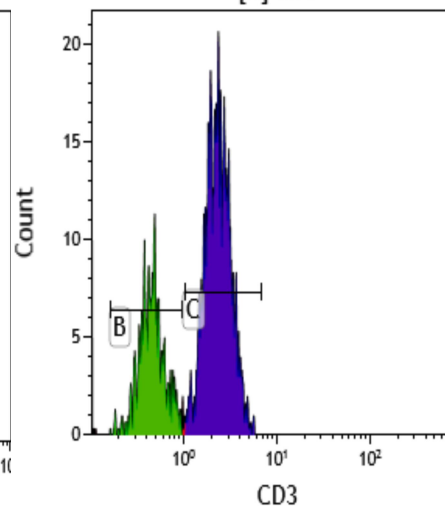
[A] CD3



电压=334v

SI=6.667

[A] CD3



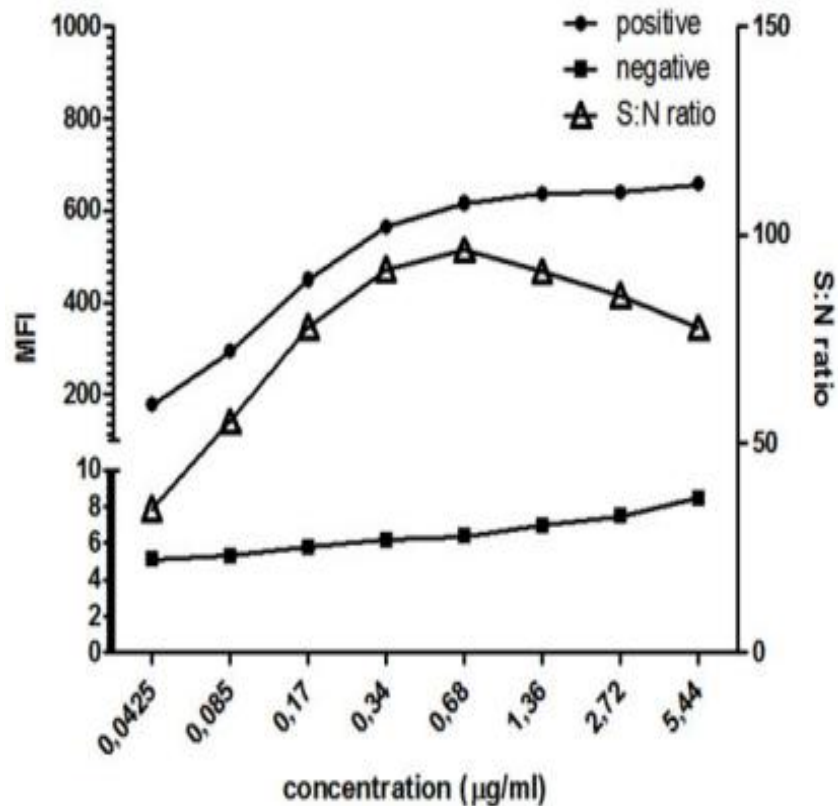
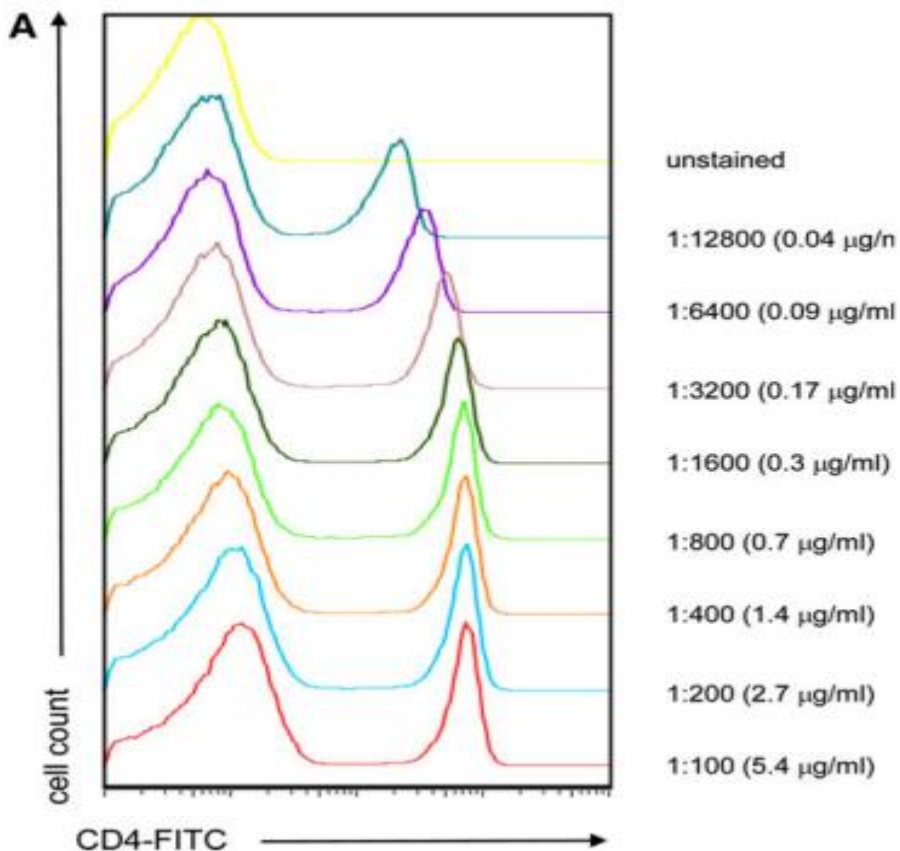
电压=344v

SI=6.567

我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者
我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

抗体浓度滴定

➤ 得到最佳的信噪比



摘自 Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies

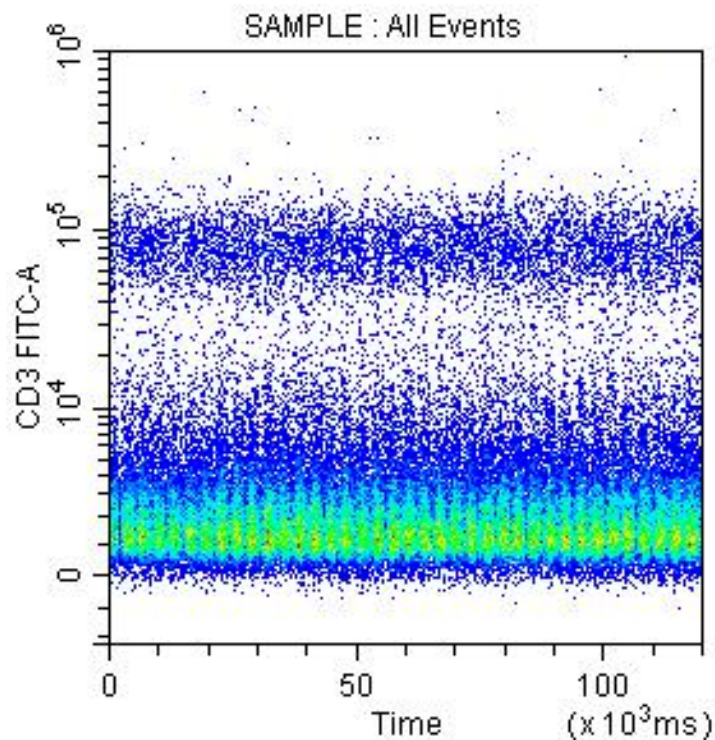
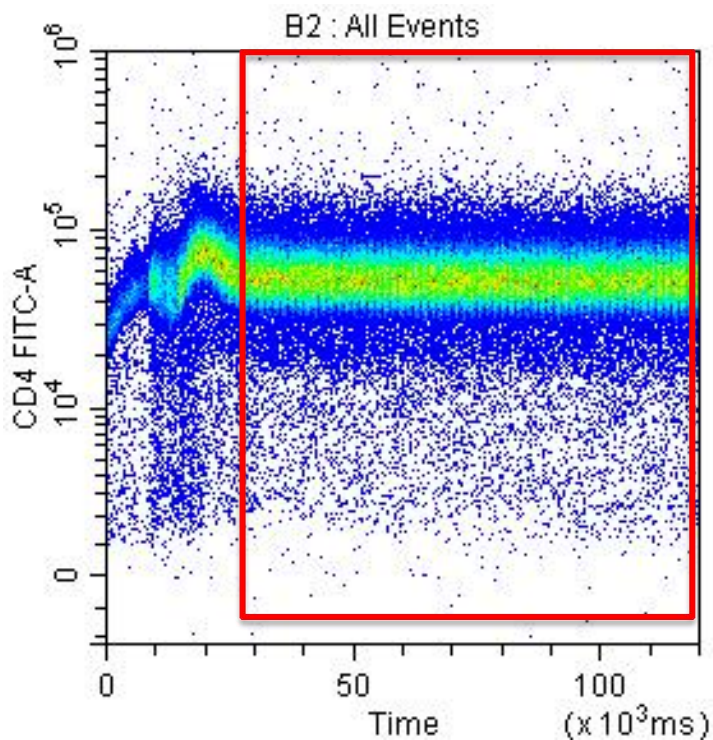
我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service reused herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

液流稳定

➤ FL VS time图：液流的稳定，避免气泡以及堵塞等的影响



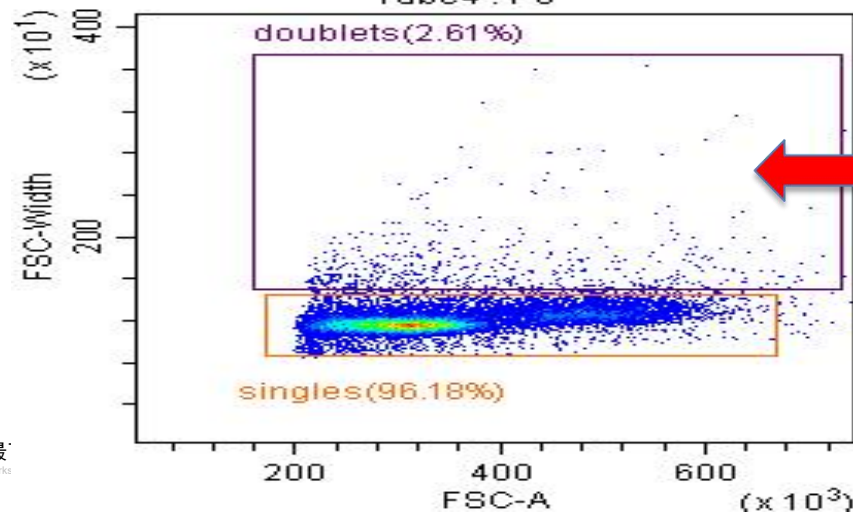
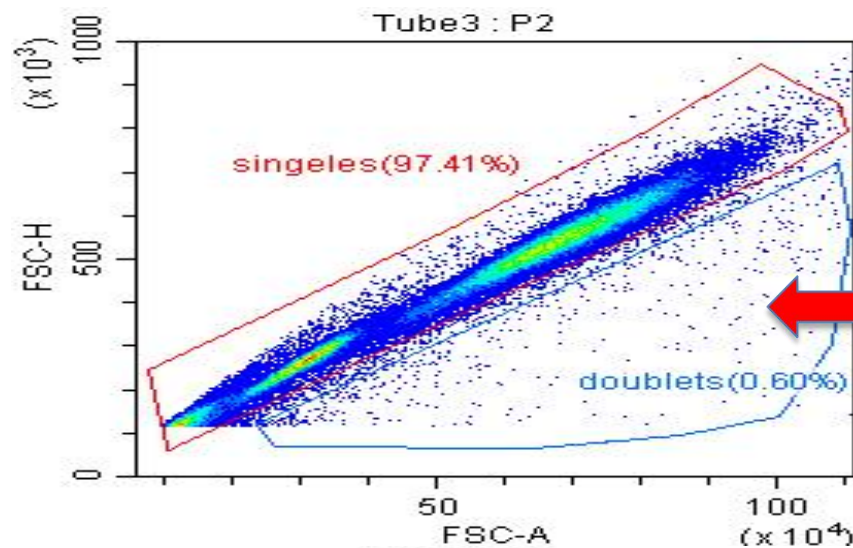
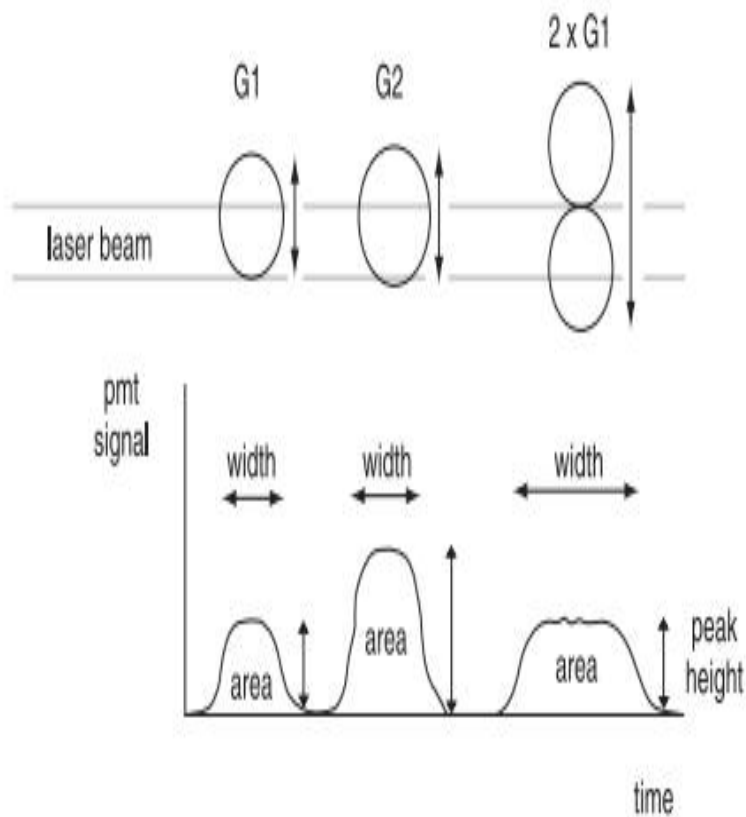
我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service names used herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

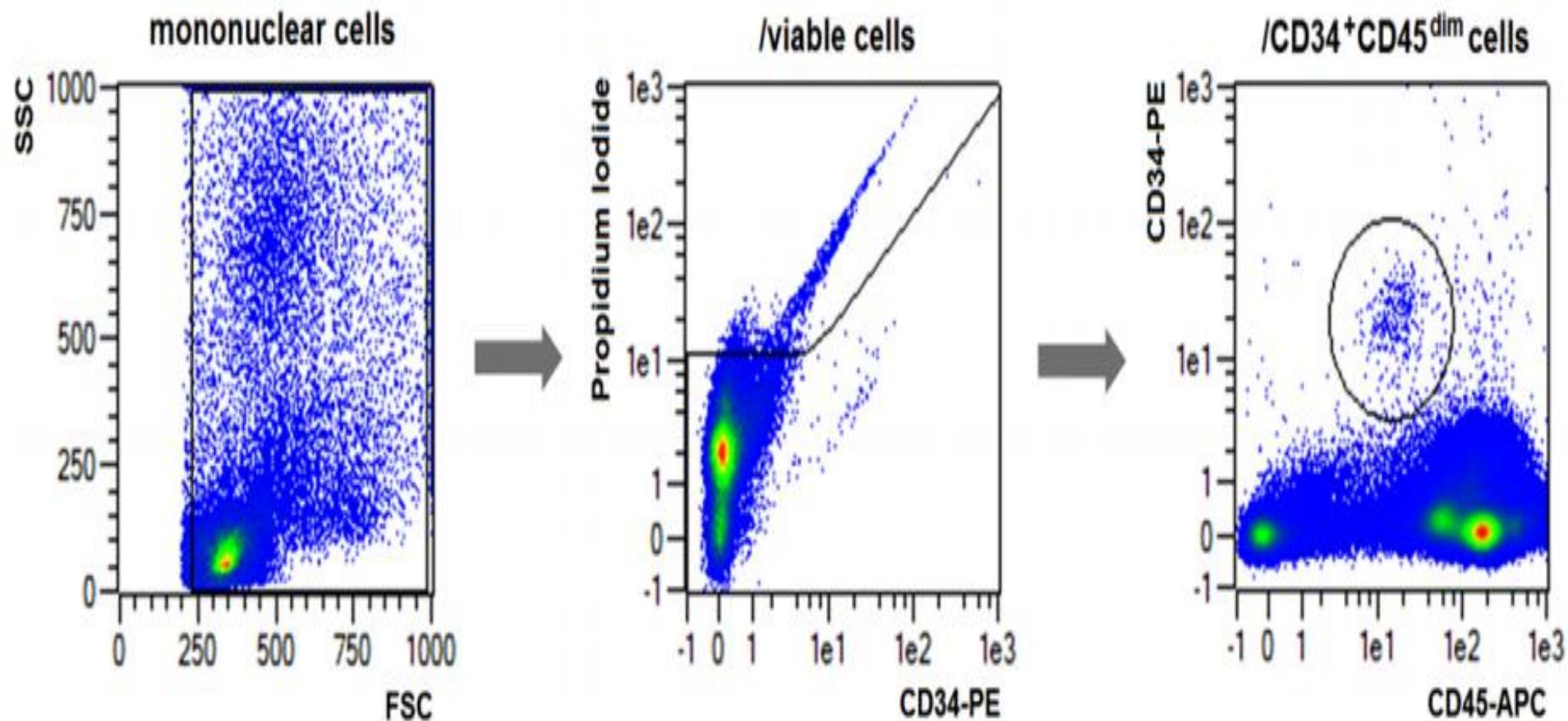
去除粘连体

- ✓ 通过散射光或者荧光的A-H或者A-W参数去除粘连体



死细胞

➤ 通过PI,7-AAD以及DAPI等荧光素标记死细胞

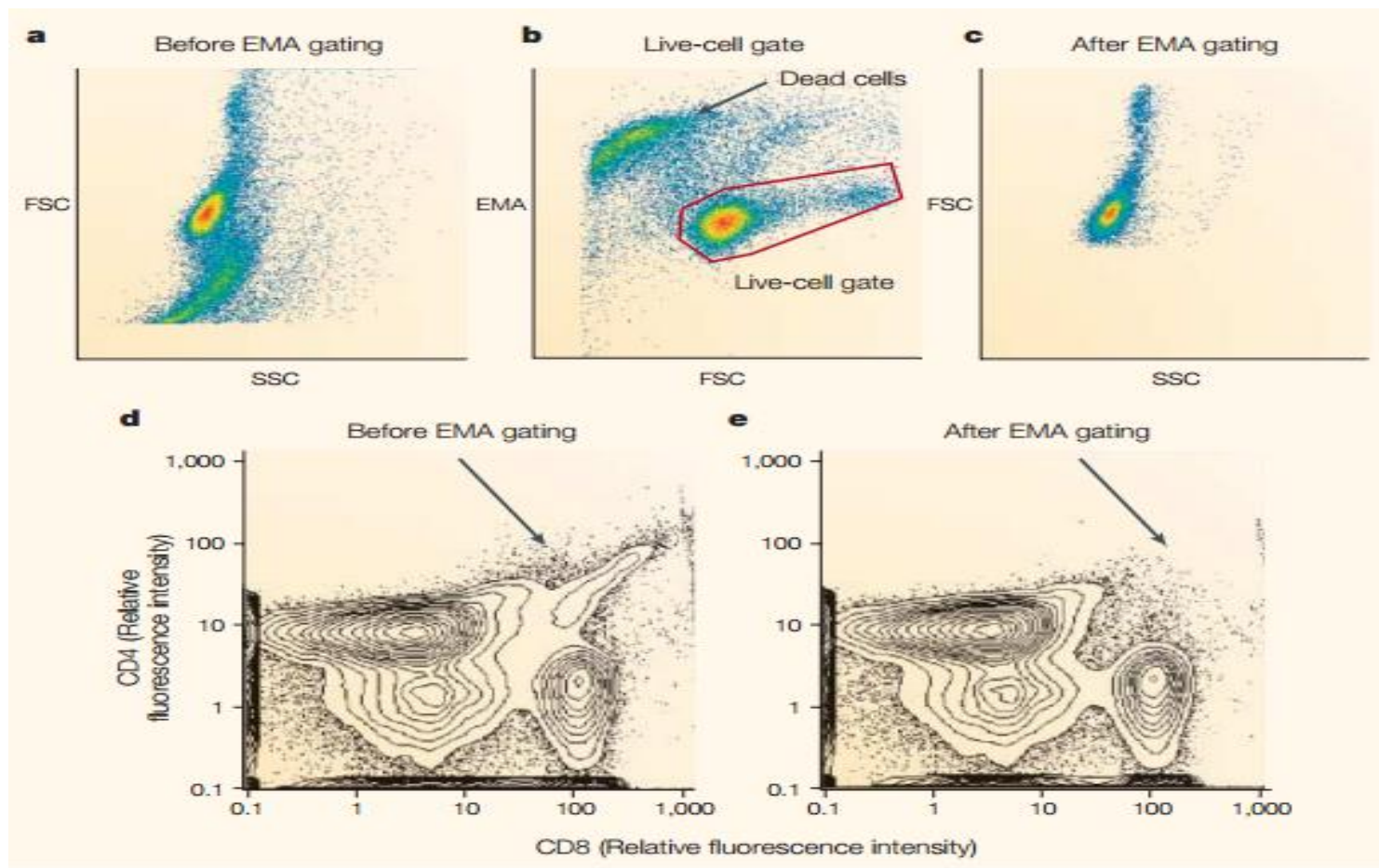


我们的使命：赋能中国每一位生命科学家工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service names used herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

死细胞



排除死细胞后，CD4+CD8+双阳群基本消失

我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service reused herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

细胞收集数目

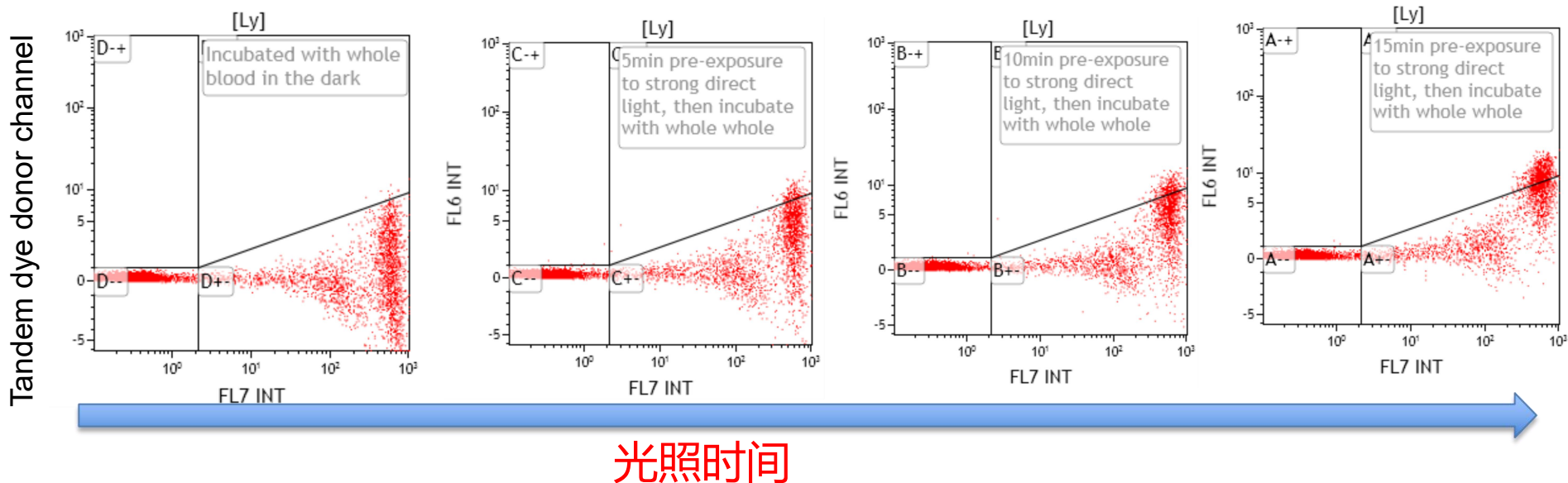
➤ 停止条件针对目的细胞，非All events

Table 1. Total Number of Events to Collect

Frequency of Rare Events (1/X)	Desired Coefficient of Variation % (Rare Events Required)			
	30 (11)	10 (100)	5 (400)	3 (1,111)
20	222	2,000	8,000	22,222
50	556	5,000	20,000	55,556
100	1,111	10,000	40,000	111,111
1,000	11,111	100,000	400,000	1,111,111
10,000	111,111	1,000,000	4,000,000	11,111,111
100,000	1,111,111	10,000,000	40,000,000	111,111,111
1,000,000	11,111,111	100,000,000	400,000,000	1,111,111,111

偶联荧光染料的降解

- 偶联荧光染料，比如PE-CY7，APC-CY7等，对光敏感
- 对光敏感度:波长越长，越敏感
PC7 > PC5.5 > PC5
APC-Cy7 > AA700



我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service names used herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

仪器维护

- 质控

建议每次开机后都进行，保证一周1-2次

- 每日清洗

每次开机后都要进行

- 深度清洗

每月1-2次，每次做完染料实验（比如PI）后，深度清洗液每2个月更换。

August 24,
2021

Beckman帮您拓展流式应用

小贝学习中心

[Resources.mybeckman.cn/learningcenter](https://resources.mybeckman.cn/learningcenter)

- 产品指南
IFU / 快速入门指南 / 操作视频
- 应用分享
- 小贝开讲 – 课程预告与回放



微信公众号

[beckman_LS](https://weixin.qq.com/r/beckman_LS)

- 热门应用
- CD分子、离心材质等查询
- 设备保修
- 人工客服



网上商城

shop.mybeckman.cn

- 官网自营平台
- 30s完成下单
- 现货48h发货
- 实时订单跟踪



我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service names used herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

感谢聆听！

我们的使命：赋能中国每一位生命科学工作者

我们的愿景：持续改进和创新，助力生命科学研究与医药健康产业发展，成为最可信赖的合作伙伴，服务健康中国2030！

Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service names used herein are the trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States & other countries.

