

流式细胞术基础指南

开启流式细胞术的实用方法



目录

	1. 流式细胞仪的原理	4
	液流系统	4
	光学系统和检测	4
	信号和脉冲处理	6
	电荷式分选	7
	2. 荧光原理	9
	荧光染料和光	9
	荧光	9
	为何使用荧光标记物?	10
	哪些荧光染料可以用于流式细胞术?	10
	荧光补偿	12
	3. 数据分析	14
	门和区域	14
	单参数或单变量直方图	15
	双参数图	16
	反向设门以确认门控策略	17
	4. 流式细胞术中的各种对照	18
	未染色对照	18
	同型对照	18
	同抗对照	19
	死活对照	19
	Fc 封闭对照	21
	荧光减一对照	22
	细胞内染色对照	23
	生物对照	23
	5. 优化实验	24
	样品制备	24
	自发荧光	25
	活细胞/死细胞排除	25
	粘连体辨别	26
	收集统计上相关数量的细胞	26
	细胞内抗原的透化和固定	27
	6. 多色组合方案构建	28
	信号分辨率	28
	优化多色方案构建的规则	28
	实验设计	28
	仪器配置	28
	荧光染料分离	29

荧光染料特性	30
抗原密度	30
标记物表达模式	30
排除通道	30
抗体滴定	30
多色方案构建工具	31
常规流式细胞术多色组合方案示例	31
全光谱流式细胞术多色组合方案构建	35



7. 常见应用和新技术 39

免疫分型	39
细胞分选	40
调节型细胞死亡	40
细胞增殖	41
细胞周期	41
信号传导和蛋白磷酸化流式细胞分析技术 (Phosphoflow)	42
小颗粒检测	42
基因表达和转染	42
绝对定量	42
颗粒内化	43
荧光原位杂交和 RNA 检测	43
流式细胞术的创新	43



8. 通用方案 44

样品制备	44
流式细胞术细胞制备方案	44
液氮保存的组织培养细胞的制备	44
悬浮液中组织培养细胞的制备	45
贴壁组织培养细胞系的制备	45
人外周血单核细胞的制备	45
腹腔巨噬细胞、骨髓、胸腺和脾细胞的制备	46
用于流式细胞术的细胞染色	46
细胞和血液表面表位的直接免疫荧光染色	46
细胞和血液表面表位的间接免疫荧光染色	47
细胞内抗原和细胞因子的直接染色: Leucoperm 辅助试剂法	47
血液中胞内细胞因子的直接免疫荧光染色	48
用于细胞周期分析的碘化丙啶染色	49
用于细胞周期分析和细胞凋亡的 BrdU 染色	49
用 StarBright 染料对细胞进行直接免疫荧光染色	50



9. 故障排除 51

故障排除指南	51
--------	----



附录 53

1. 流式细胞仪的原理

流式细胞仪由液流系统、光学系统和电子系统组成。本章解释了每个系统的作用，以及各系统如何协同工作。您还将了解电荷式流式细胞分选的基础知识。

液流系统

流式细胞术的基本原理之一是能够检测单个粒子通过一束或多束激光束时的特性。当样品进入流式细胞仪时，粒子会在样品管路的三维空间中随机分布，管路直径明显比大多数细胞的直径大。因此，必须通过流体动力学聚焦技术将样品排列成单粒流，由仪器的检测系统分别对其进行检测。

液流系统由一个核心管组成，样品液从该管注入，被外部鞘液包裹。由于鞘层（在喷嘴或石英杯中）变窄，流体速度增加。样品被注入核心管后，通过伯努利效应聚焦（图 1）。由此，可形成单列粒子流，即为流体动力学聚焦。在层流状态下，样本流和鞘液不会混合。

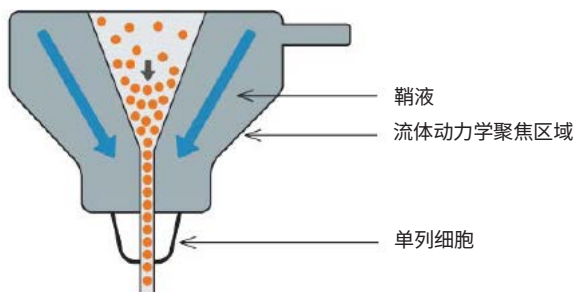


图 1. 流体动力学聚焦形成单列粒子流。

如果没有流体动力学聚焦，石英杯（通常为 $250 \times 250 \mu\text{m}$ 或 $180 \times 480 \mu\text{m}$ ）或仪器喷嘴（通常为 $70\text{-}130 \mu\text{m}$ ）将无法产生聚焦的细胞流，也就无法进行单细胞分析。有了流体动力学聚焦，细胞便能以单列形式通过激光束，即检测点，从而可进行单细胞分析。

光学系统和检测

在流体动力学聚焦之后，每个粒子通过一个或多个聚焦的激光束。荧光团标记的粒子发射出的散射光或荧光提供了有关粒子特性的信息。激光是流式细胞术中最常用的光源。

激光以特定的频率产生单一波长的光（激光束）。它们的波长从深紫外线（UV）到红外线（IR）不等，并且具有不同的功率级别范围（光子输出/时间通常以 mW 为单位）。

与粒子相互作用后，光沿前向散射且通常与激光束轴偏移最多 20° ，由光电倍增管（PMT）或光电二极管收集，这被称为前向角散射（FSC）通道。然而，该角度可能会根据您的仪器而变化，从而导致不同机器之间 FSC 信号变化。这种 FSC 测量可以估算粒径，因为较大的粒子比较小的粒子折射更多的光。但是，这取决于多种因素，例如样品、激光波长、收集角度、样品的折射率和鞘液。小颗粒的检测是一个很好的示例，当小颗粒小于照明源的波长时（例如使用 488 nm 激光照射 200 nm 外泌体），光不一定会前向散射。因此，前向角散射可能无法很好地估计粒径。

与激光束成 90° 角测量的光称为侧向角散射光 (SSC)。SSC 可以提供有关细胞或粒子相对复杂性 (例如, 粒度和内部结构) 的信息; 但是, 与前向角散射光一样, 这可能取决于多种因素。FSC 和 SSC 对于每个粒子都是唯一的, 并且两者的结合可用于大致区分异质群体中的细胞类型, 例如外周血中的淋巴细胞、单核细胞和粒细胞。然而, FSC 和 SSC 的特征因样品类型和样品制备的质量而有所不同, 因此通常需要荧光标记来获得更详细的信息。

在不同波长下进行的荧光测量可以提供有关荧光团标记的细胞表面受体或细胞内分子 (例如 DNA 和细胞因子) 的定量和定性数据。大多数流式细胞仪使用单独的通道和检测器来检测发射的光, 其数量因仪器和制造商而异。检测器为 PMT 或光电二极管, 通常为雪崩光电二极管 (APD)。PMT 是最常用的检测器, 但 APD 因其成本原因和在检测更长波长时具有更高的灵敏度而变得越来越受欢迎。

在常规的流式细胞仪中, 例如 Bio-Rad ZE5 流式细胞分析仪, 检测信号的特异性由滤光片控制, 该滤光片在透射 (通过) 其他波长的同时阻挡某些波长。共有三种主要的滤光片类型。长通滤光片允许高于截止波长的光通过, 短通滤光片允许低于特定波长的光通过, 带通滤光片在指定的窄波长范围 (称为带宽) 内透射光。二向色滤光片可以通过相位反射来阻挡光线, 从而允许某些特定波长的光通过并阻断其他波长的光 (图 2)。

当与入射光成一定角度放置时, 二向色滤光片也是一面反射镜。这种类型的滤光片具有两个功能。首先, 它允许特定波长沿前向通过。其次, 它能以 90° 角反射光线。这使得光路能够通过一系列滤光片。通过对滤光片进行精确选择和排列, 可以同时检测到多个信号 (图 3)。

请访问 [bio-rad.com/CellAnalysis](https://www.bio-rad.com/CellAnalysis), 以了解 ZE5 流式细胞分析仪的灵活配置如何帮助您设计具有高速和高灵敏度的复杂实验。

575 nm 短通滤光片



520 nm 长通滤光片



630/20 nm 带通滤光片



540 nm 二向色短通反射镜

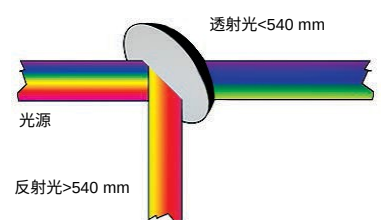


图 2. 不同类型的滤光片。

流式细胞仪的原理	
荧光原理	
数据分析	
流式细胞术中的各种对照	
优化实验	
多色组合方案构建	
常见应用和新技术	
通用方案	
故障排除	
附录	

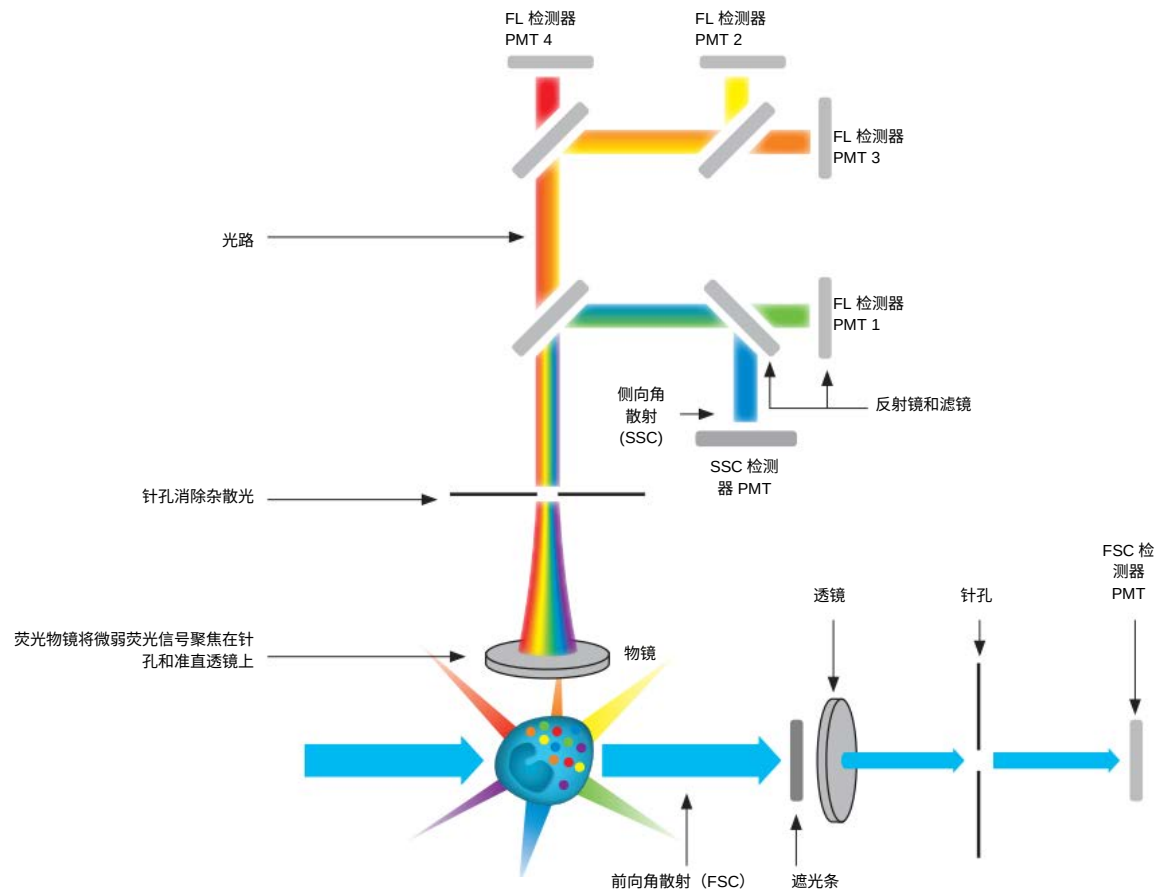


图 3. 典型流式细胞仪设置的示意图。蓝色箭头代表光路。FL，荧光；FSC，前向角散射；PMT，光电倍增管；SSC，侧向角散射。

全光谱流式细胞术

全光谱流式细胞术（通常称为光谱流式细胞术）不使用滤光片分配来自每个激光器的发射光。相反，所有发射光均通过一系列检测器捕获（每个激光 16-32 个）从而获得染料的全光谱信息。这可以从多个激光器中捕获标记在细胞上所有荧光染料的整个光谱图。然后通过光谱解析将每个染料的光谱图分开，以确认来自每种荧光染料的信号比例。

信号和脉冲处理

当粒子通过检测点并产生信号时，在对应的检测器中会产生脉冲。这些脉冲反映了粒子被一个或多个激光激发产生的信号。可以通过绘制信号-时间关系图来标绘这些脉冲。

当粒子进入激光束时，它将产生散射光和荧光信号，这些信号最终将表现为来自 PMT 阳极的电子流（电流）。

电流的大小与击中光电阴极的光子数量成正比，因此也与粒子产生的散射或荧光信号的强度成正比。当粒子进入激光束时，PMT 的输出将开始上升，当粒子位于激光束中心时达到峰值输出（图 4）。

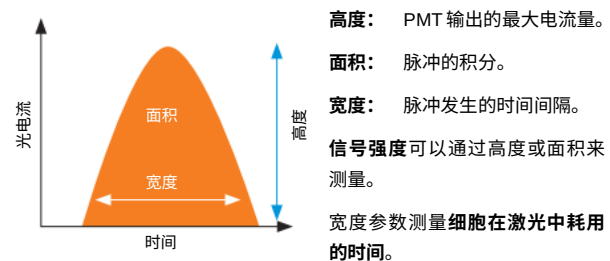


图 4. 通过测量脉冲的高度、面积和宽度来量化脉冲。

此时，粒子被完全照亮（激光束的光子在激光束焦点的中心处于最高密度），并将产生最大数量的光信号。当粒子从激光束中流出时，PMT 的电流输出将回落到基线。这种脉冲的产生称为事件。

然而，并非所有生成的信号都对应于目标粒子。为了避免处理不需要的信号，需要根据称为触发通道的专用检测器的信号强度（阈值）来做出决定。该决定基于触发参数和阈值水平。PMT 或 APD 非常灵敏，可以检测与实验数据无关的各种来源的信号，包括杂散光、灰尘、非常小的粒子和碎片。系统中这些脉冲的数量可能比实验粒子产生的脉冲数量高几个数量级。将这些纳入数据集中将带来高水平的背景，并在很大程度上掩盖相关数据点，以及使电子设备处理相关信号的能力过载。因此，设定一个阈值是可取且有必要的，低于该阈值的非必须数据不会被检测到。阈值的设定为指定一个参数作为记录事件（通常是前向角散射）的触发条件，并将该参数中的某个水平设置为阈值。在所有检测器中，任何未能超过阈值水平的脉冲都将被忽略（图 5A）；任何超过阈值水平的脉冲均完全由电子设备处理（图 5B）。

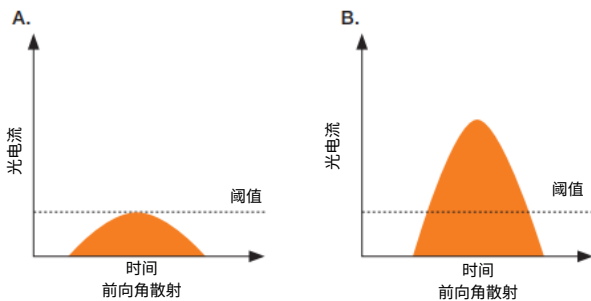


图 5. 信号辨别。A，被忽略的信号；B，完全处理的信号。

随着脉冲的产生，它们的定量对于在图上显示、分析和解释荧光信号是必要的。这是信号处理电子设备的工作。目前大多数流式细胞仪均为数字系统。来自 PMT 或 APD 的模拟电流首先由模数转换器（ADC）数字化或分解成离散的数字信号。这个过程称为采样。

实时收集检测的瞬时信号，并将其储存为数字值。这些瞬时信号一起构成了来自粒子的整个脉冲和光信号。电子设备通过计算整个脉冲的高度、面积和宽度来量化整个脉冲。使用高度和面积（或使用其最大值和积分）测量信号强度，因为它们的大小和与 PMT 相互作用的光子数量成正比。另一方面，宽度与粒子在激光束中耗用的时间成正比，可用于区分单个粒子或相互作用紧密的粒子和粘连体。

尽管数据是以线性形式收集的，但在荧光研究中数据显示通常是对数形式，因为对数信号收集会囊括弱信号并压缩强信号，从而得到易于在直方图上显示的分布。当必须评价荧光信号的细微差异时，就需要线性显示，例如在 DNA 分析中，荧光强度可能仅增加一倍。

每个检测器的测量值称为参数。每个参数都可以在直方图上以高度、面积和宽度值显示，并在流式细胞术软件中以点图显示。这些参数用于测量荧光强度、比较各类群体以及指定分选决策。

电荷式分选

细胞分选仪（例如，Bio-Rad S3e 细胞分选仪）可分离通过流式细胞术鉴定的细胞。基于液滴的细胞分选仪首先分析粒子，还需具有可以产生液滴的硬件以及将所需粒子偏转或引导到收集管中的方法。可通过使用喷嘴在一段时间内以最佳振幅（单位：伏特）的频率（单位：循环/秒，Hz）振动来形成液滴。这通常是由压电晶体产生的。与流式细胞分析仪一样，目前可以使用常规和全光谱流式细胞仪进行分选。

有两种类型的电荷式流式细胞分选仪，其不同之处在于激光束检测粒子的位置。空气激发（sense-in-air）的分选仪在粒子离开喷嘴并进入液流中时照亮微粒。在石英杯激发的分选仪中，粒子在进入液流之前先在石英杯中照亮。粒子在检测点被照亮后，其继续沿液流向下移动。当粒子通过激光束时，在检测点收集到的粒子数据被发送到计算机，计算机决定该粒子是否符合用户所需粒子定义的标准。

当粒子继续沿着液流向下移动时，液流最终分裂成液滴，目标粒子被捕获在液滴中。将喷嘴以高频振动来防止断点出现在距在喷嘴任意距离处，并维持液滴大小一致。

分选的最关键参数之一是测量检测点与确切液滴断点之间所用的时间。所用时间和因此产生的距离称为液滴延迟。当粒子到达最后一个相连的液滴时，整个液流在喷嘴处被加电。当包含目标粒子的液滴分裂时，液滴会带电。然后液滴通过电场并偏转至管或板中。不带电粒子进入废液孔中（图 6）。

细胞分选的速度取决于几个因素，包括射流直径和液滴形成的速率。典型的喷嘴直径为 70-130 μm ，每秒可产生 10,000-90,000 个液滴。断点的稳定性决定了分选的准确性。

在分析 DNA、蛋白质或细胞功能的下游实验中，细胞分选通常用于分离细胞群和单个细胞。通常根据造血干细胞中的 CD34 等标记物或活性来纯化细胞，例如在群体或单细胞克隆中选择细胞用于进一步培养。请访问 [bio-rad.com/S3e](https://www.bio-rad.com/S3e)，以了解有关 Bio-Rad S3e 细胞分选仪的更多信息，这是第一款真正的智能化全自动流式细胞分选仪，可简化实验，新手和专业人士均可快速掌握。

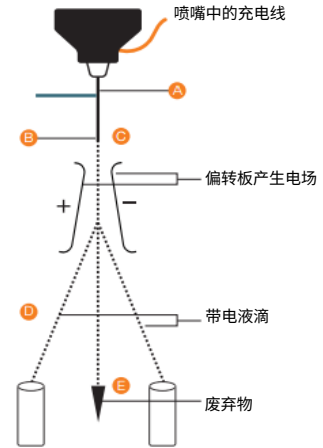


图 6. 流式分选。A，光学检测和光收集；B，液流分裂成液滴；C，当目标粒子通过断点时，液流和液滴带电；D，液滴通过静电场偏转；E，不带电液滴进入废液孔中。



2. 荧光原理

流式细胞术以荧光原理为基础，该原理将在本章中进行介绍。我们还介绍了用于流式细胞术的荧光染料，并解释了多色组合的荧光补偿。

荧光染料和光

荧光染料是用于检测诸如蛋白质或核酸等细胞分子表达的标记物。它们接受给定波长的光能(例如,来自激光的光能),并以更长的波长重新发射光能。这两个过程称为激发和发射。激发后的发射极为迅速,通常以纳秒计,被称为荧光。在考虑可用于流式细胞术的不同类型的荧光团之前,有必要了解光吸收和发射的原理。

光是一种电磁能,以波的形式传播。这些波既有频率又有长度,这些决定了光的颜色。人眼可见光为 UV 和 IR 辐射之间的窄波段(380-700 nm)(图 7)。例如,阳光包含紫外线和红外线光,尽管人眼不可见,但皮肤可以感受到温暖,并可使用光电检测器进行科学测量。可见光谱可以根据颜色进一步细分为:红色、橙色、黄色、绿色、蓝色和紫色。红光具有较长的波长和较低的能量,而紫光具有较短的波长和较高的能量。

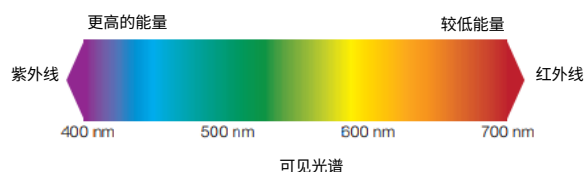


图 7. 电磁波谱。

荧光

当荧光团吸收光时,其电子会被激发,并从静止状态(S_0 ,图 8A)跃迁到最大能级,称为激发电子单重态(S_2)①。对于每个荧光团,此转换所需的能量不同。激发态的持续时间取决于荧光染料,通常持续 1-10 ns。

然后,荧光染料发生构象变化,电子下降到称为电子单重态(S_1)的较低、更稳定的能级,并且一些吸收的能量作为热量释放②。电子随后回到其静止状态(S_0),释放出剩余的能量($E_{\text{发射}}$)作为荧光③。发射和激发最大值波长之间的差值称为斯托克斯位移(图 8B)。对于单个荧光团,此循环可以重复数千次,从而可以回收荧光团,进而放大信号。

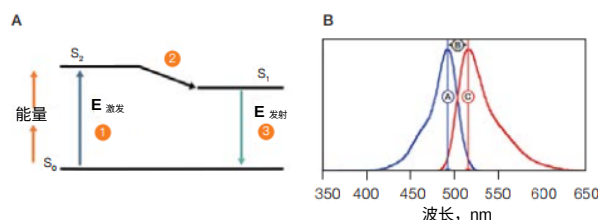


图 8. 斯托克斯位移。A, 在激发(1)时,荧光团中的电子从静止状态 S_0 跃迁到激发的电子单重态 S_2 。一些能量以热量的形式释放出来(2)。当电子返回其基态 S_0 时,剩余的能量以荧光的形式释放(3)。B, 荧光团的激发最大值(A)和发射最大值(B)之间的差值称为斯托克斯位移(C)。

荧光染料发出的光通常比激发它的能量少;因此,任何荧光染料的发射波长都比其激发波长更长(能量更低),因此对应于电磁波谱上的不同颜色。

激发波长对于荧光团吸收的光子总数至关重要。例如,异硫氰酸荧光素(FITC)吸收 400-530 nm 的光,但在 490 nm 波长的峰值处(或称为激发最大值)吸收效率最高。期望在其激发最大值处激发荧光团,因为吸收的光子数量越多,荧光发射就越强。吸收和发射波长最大时称为最大吸收波长和最大发射波长。

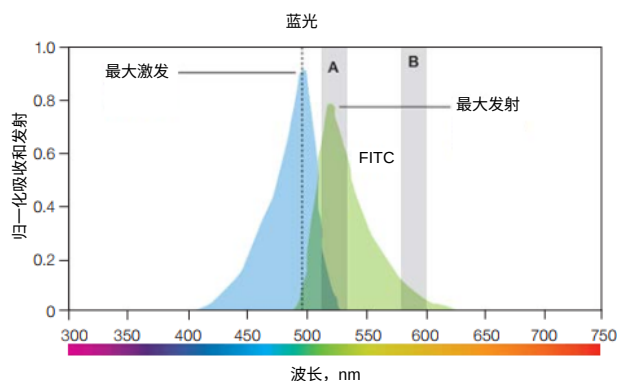


图 9. 显示 FITC 的光吸收和光发射的光谱图。A，信号极佳；B，弱信号；----，488 nm 激发激光线（蓝光）。FITC，异硫氰酸荧光素。

荧光团的最大吸收波长提示其最佳的激发激光。对于 FITC，其最大吸收波长落在蓝色光谱内。因此，通常使用接近 FITC 的 490 nm 吸收峰的 488 nm 蓝色激光来激发该荧光团。FITC 发出 475 至 650 nm 的荧光，在 525 nm 处达到峰值，落在绿色光谱内。仪器的设置决定染料检测的信号值。通过使用滤光片筛除通道 A（图 9）以外的所有光后，FITC 由通道 A 检测到的光为绿色（荧光颜色通常是指荧光团在其最高稳定激发态下发出的光的颜色）。然而，如果仅在通道 B 中（图 9）检测 FITC 荧光，其将显示为橙色，并且强度要弱得多，因此如何设置流式细胞仪来测量荧光将最终确定荧光染料的颜色。荧光团之间激发和发射光的颜色不同，可以使用光学滤光片将它们彼此分开。

为何使用荧光标记物？

荧光标记物的目的是直接定位至目标表位，从而可以检测其生物学和生化特性，例如荧光团偶联抗体。荧光标记物用途广泛，包括鉴定和定量不同的细胞群、细胞表面受体或细胞内靶点、细胞分选、免疫表型、钙流检测、测定核酸含量、测定酶活性以及研究细胞凋亡等。单个激光可以激发多个荧光团，通过使用滤光片，使得同时检测样本的多个参数成为可能，这构成了多色荧光研究的基础。

哪些荧光染料可以用于流式细胞术？

多种荧光染料可用于流式细胞术，并且目前可用的荧光染料种类在不断增加，我们在此不作逐一介绍。表 1 和表 2 描述了目前可从 [bio-rad-antibodies.com](https://www.bio-rad-antibodies.com) 获得的荧光染料。新的荧光团在不断添加，请访问 [bio-rad-antibodies.com/flow](https://www.bio-rad-antibodies.com/flow) 查看我们的最新产品。

单体染料和串联染料

FITC、藻红蛋白（PE）、别藻蓝蛋白（APC）和多甲藻素叶绿素蛋白（PerCP）等单体染料已经使用多年，并且目前已出现替代品，例如 Bio-Rad StarBright 染料，其具有更高的光稳定性和更亮的荧光。（请访问 [bio-rad-antibodies.com/StarBright](https://www.bio-rad-antibodies.com/StarBright) 了解更多信息。）此外，可选择的激光变得越来越便宜，因此由 355nm 激光激发的染料增加了多重标记的选择。

串联染料是将一种荧光染料共价偶联到另外一种荧光染料。当第一种染料（供体）被激发并达到其最大激发电子单重态时，其能量会转移到第二种染料（受体）上进而激发第二种染料，随后其发出荧光。该过程称为 Förster 共振能量转移（FRET）。该方法巧妙实现了更大的斯托克斯位移并因此增加激光器激发的荧光素数量。

串联染料对于多色流式研究非常有用，尤其是与单体荧光染料结合使用时。例如，Alexa Fluor (A) 488、PE、PerCP-Cyanine (Cy) 5.5 和 PE-Texas Red 均可在 488 nm 处激发，但分别会产生绿色、黄色、红色和红外发射光，这可随后使用单独的检测器进行测量。

荧光蛋白

荧光蛋白，例如绿色荧光蛋白（GFP），已成为许多科学领域了解蛋白质表达的不可或缺的工具。其他荧光蛋白，例如 mCherry 和黄色荧光蛋白（YFP），也已广泛用于流式细胞术和细胞分选。荧光蛋白通常共表达或表达为与目标蛋白的融合体。这些荧光蛋白的好处是可以定量活细胞中的细胞内标记物，而无需透化细胞膜。表 3 列出了常见的荧光蛋白和染料。

表 1. 单一染料。

荧光染料	激光, nm	荧光发射颜色	最大吸收, nm	最大发射, nm	相对亮度
StarBright UltraViolet 400 染料	355		335	394	3
StarBright UltraViolet 445 染料	355		347	440	3
StarBright UltraViolet 510 染料	355		340	513	3
StarBright UltraViolet 575 染料	355		340	569	4
StarBright UltraViolet 605 染料	355		340	609	4
StarBright UltraViolet 665 染料	355		340	669	4
StarBright UltraViolet 740 染料	355	红外线	344	743	4
StarBright UltraViolet 795 染料	355	红外线	340	792	2
DyLight 405	405		400	420	3
StarBright Violet 440 染料	405		383	436	5
Pacific Blue	405		401	452	1
StarBright Violet 475 染料	405		406	479	4
StarBright Violet 515 染料	405		402	516	5
StarBright Violet 570 染料	405		404	571	4
StarBright Violet 610 染料	405		403	607	5
StarBright Violet 670 染料	405		401	667	5
StarBright Violet 710 染料	405	红外线	402	713	5
StarBright Violet 760 染料	405	红外线	403	754	4
StarBright Violet 790 染料	405	红外线	402	782	4
DyLight 488	488		493	518	4
A488	488		493	519	3
FITC	488		490	525	3
PerCP	488		490	675	2
StarBright Blue 700 染料	488		473	703	5
DyLight 550	561		562	576	4
PE	488/561		496/562	578	5
APC	640		650	661	4
A647	640		650	665	4
DyLight 650	640		654	673	4
DyLight 680	640	红外线	692	712	3
A700	640	红外线	702	723	2

Axxx, Alexa Fluor; APC, 别藻蓝蛋白; FITC, 异硫氰酸荧光素; PE, 藻红蛋白; PerCP, 多甲藻素叶绿素蛋白。

表 2. 串联染料。

荧光染料	激光, nm	荧光发射颜色	最大吸收, nm	最大发射, nm	相对亮度
PerCP-Cy5.5	488		490	695	3
PE-A647	488/561		496/562	667	4
PE-Cy5	488/561		496/562	667	5
PE-Cy5.5	488/561		496/562	695	4
PE-A750	488/561	红外线	496/562	779	4
PE-Cy7	488/561	红外线	496/562	785	4
APC-Cy7	640	红外线	650	785	2

Axxx, Alexa Fluor; APC, 别藻蓝蛋白; Cy, 花青; PE, 藻红蛋白; PerCP, 多甲藻素叶绿素蛋白。

表 3. 荧光蛋白。

荧光染料	激光, nm	荧光发射颜色	最大吸收, nm	最大发射, nm	相对亮度
EBFP	405		383	445	2
CFP	405		439	476	2
GFP/EGFP	488		484	509	4
YFP	488		514	527	5
RFP	561		558	583	4
mCherry	561		587	610	3

CFP, 青色荧光蛋白; EBFP, 增强的蓝色荧光蛋白; EGFP, 增强的绿色荧光蛋白; GFP, 绿色荧光蛋白; RFP, 红色荧光蛋白; YFP, 黄色荧光蛋白。

荧光补偿

进行多色荧光研究时的一个考虑因素是荧光染料之间光谱重叠的可能性。由于流式细胞术中使用的荧光团发射多种能量和波长的光子,因此开发了一种称为补偿的数学方法来解决在多个检测器中对同一个荧光团的光子的测量问题。由于流式细胞术检测方法的特点,粒子的发射光不是在单个检测器中测量的,而是由仪器中多个相关检测器测量的。例如,两种最常见的荧光染料 FITC 和 PE 分别最大程度地发射绿色 (525 nm) 和黄色 (578 nm) 光子。但如图 10 所示,它们还发射更长波长的光子,所有这些光子都可以在仪器配置的相应检测器中检测到该荧光素的信号。

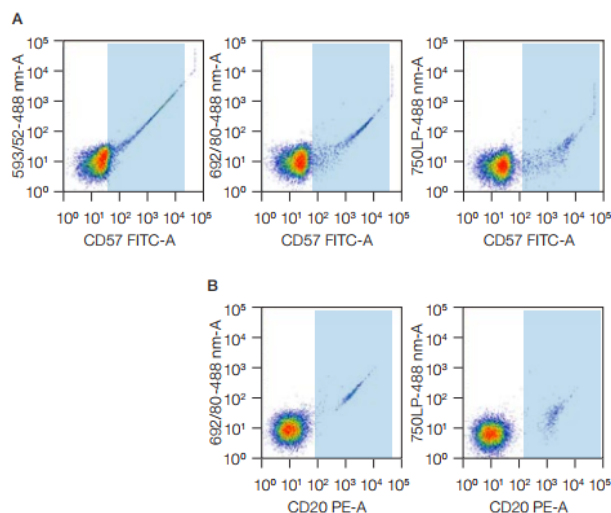


图 10. FITC 和 PE 溢出到其他通道。显示了门 (蓝色) 以鉴定 FITC 和 PE 阳性细胞及其溢出。**A**, FITC 染色的淋巴细胞;**B**, PE 染色的淋巴细胞。FITC, 异硫氰酸荧光素; LP, 长通; PE, 藻红蛋白。

在某些实验中,会同时使用多种荧光染料;例如, FITC 可以与 PE 结合使用。在这些情况下,必须确定每种荧光染料对给定检测器中信号的相对贡献。在图 11 中,您可以看到相邻的 PE 通道 (593/52 滤光片)、PerCP/PerCP-Cy5.5 通道 (692/80 滤光片),甚至 PE-Cy7 通道 (750LP 滤光片) 中均有一些 FITC 信号,所有这些都需要去除。随着更多荧光染料的添加,必须考虑每种额外染料的信号。在图 11 中,您可以看到当通过 488 nm 激光进行激发时,PE 在 PerCP/PerCP-Cy5.5 通道 (692/80 通道) 和 PE-Cy7 通道 (750LP 滤光片) 中也有荧光信号,也需要将其去除。

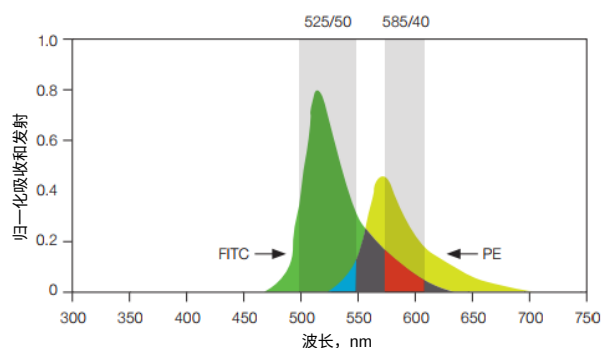


图 11. 荧光补偿。●, FITC 的发射光谱;●, PE 的发射光谱;●, 带通滤光片;●, 585/40 通道中检测到的 FITC 发射部分;●, 525/50 通道中检测到的 PE 发射部分;●, 525/50 和 585/40 通道均未检测到 FITC 和 PE 的重叠发射光谱图。FITC, 异硫氰酸荧光素; PE, 藻红蛋白。

在多色流式实验中,添加被 488nm 激发的另外一种染料 PerCP-Cy5.5, 由于该染料的检测通道是 692/80, 因此必须从该通道中减去 FITC 和 PE 信号才能够得到 PerCP-Cy5.5 准确的检测数据。

在图 12 中,您可以看到如何对 StarBright Violet 710 和 StarBright Violet 790 染料偶联的抗体染色的样品进行补偿。单染样品显示出光谱重叠的数量。当样品用两种荧光染料染色且不进行补偿调节时,会观察到双阳性群体。

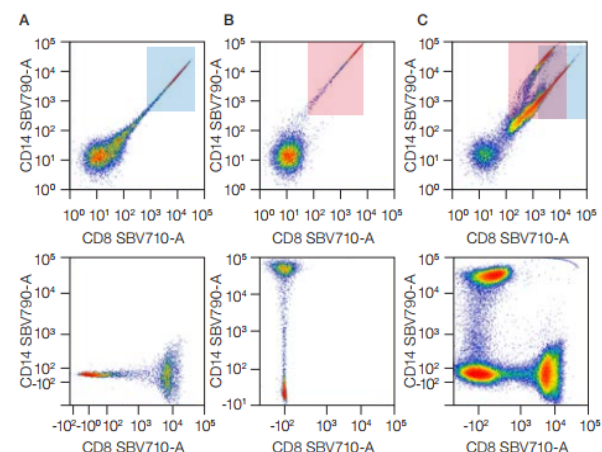


图 12. 荧光补偿校正光谱重叠。**A**, 用小鼠抗人 CD8: StarBright Violet 710 (CD8SBV710; #MCA1226SBV710) 染色的外周血。**B**, 用小鼠抗人 CD14: StarBright Violet 790 (CD14SBV790; #MCA1568SBV790) 染色的外周血。**C**, 双染色外周血。当未应用补偿时 (上图), 可以看到溢出, 并在经过补偿后消除 (下图)。SBV, StarBright Violet。

然而，当使用特定软件应用正确的补偿水平时，就会显示出真实的染色水平。软件计算溢出值并将其应用于数据以获得正确补偿的数据。补偿后，未观察到双阳性细胞，这是对于这些互斥标记所期望的结果。

您可以通过使用没有重叠发射光谱的荧光团来避免进行补偿。或者，您可以使用由不同激光激发的荧光染料组合（前提是激光在空间上是分开的），但是随着荧光染料数量的增加，这实际上是不可能的。我们已经使用四种不需要补偿的荧光染料创建了通用的人类免疫分型组合。它们可用于鉴定常见群体或作为构建更大、更复杂的组合的开端。请访问[“无补偿组合（No Compensation Panels）”](#)网页，以了解有关 B、T、NK 和髓样细胞组合的更多信息。

流式细胞仪的原理
荧光原理
数据分析
流式细胞术中的各种对照
优化实验
多色组合方案构建
常见应用和新技术
通用方案
故障排除
附录

3. 数据分析

了解如何分析您的数据对于成功进行流式实验至关重要。此外，由于流式细胞实验中会实时进行一些分析步骤，因此在开始实验之前制定计划非常重要。在本章中，您将学习如何在细胞数据分析中设置门和区域，以及如何反向设门（backgate）。我们还讲述了用于分析和展示流式数据的不同类型的图。

门和区域

流式细胞术数据分析从根本上是基于门控原理。将门和区域的界限设置在具有共同特征（通常是相同的前向角散射、侧向角散射和标记物表达）的细胞群体周围，以研究和量化这些群体。在这里，我们介绍如何理解常见的流式细胞术图。请访问 bio-rad-antibodies.com/gates-regions 下载有关此主题的便捷资源作为快速参考。

圈门的第一步通常是根据细胞的前向和侧向角散射特性来区分细胞群。前向角散射和侧向角散射分别用于估算细胞大小和粒度，但这可能取决于若干因素，例如样品、激光波长、样品收集、样品的角度折射率和鞘液。对于包含一种细胞类型的样品，区分细胞群可能相对简单，但对于包含多种细胞类型的样品，区分细胞群可能更为复杂。如图 13 所示，裂解红细胞后的全血中含有几种不同的细胞类型。密度图中蓝色/绿色/黄色/红色的颜色变化表示离散细胞群中的细胞数量的增加（图 13A）。粒细胞、单核细胞和淋巴细胞的光散射模式可以将它们与细胞碎片和死细胞区分开。后者通常具有较低的前向角散射水平，并突出显示在密度图的左下角。可以增加前向角散射阈值以避免收集这些事件，或者可以通过对目标群体进行圈门来消除。数据可以用荧光信号和 FSC/SSC 信号相结合的方式进行分析展示，如图中用 CD8SBV710（图 13B）和 CD14SBV790（图 13C）染色所示。前向和侧向角散射门控通常可用于去除具有增强自发荧光和非特异性结合抗体的死细胞。当然，添加活性染料是一种更可靠的方法。

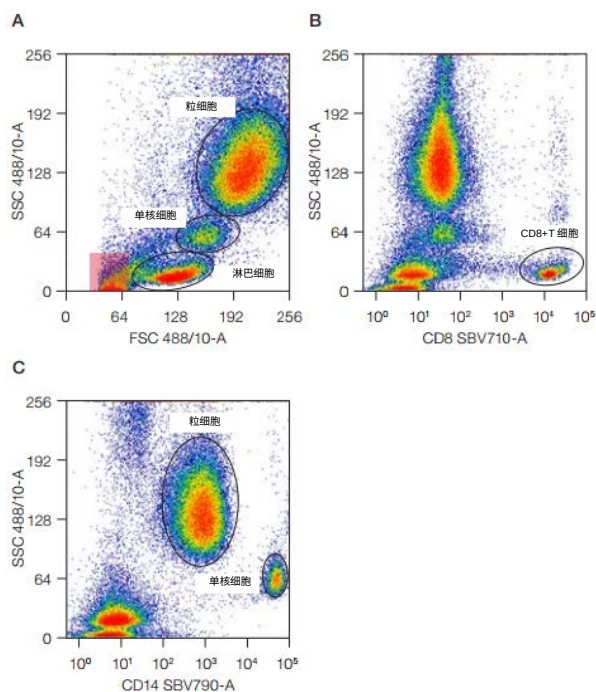


图 13. 裂红后的全血细胞分析。 **A**，SSC vs. FSC 密度图；**B**，SSC vs. CD8SBV710 荧光图；**C**，SSC vs. CD14SBV790 (#MCA1568SBV790) 荧光图。FSC，前向角散射；SBV，StarBright Violet；SSC，侧向角散射。

细胞事件也可以显示为无密度信息的点图,以及有无离群值的等高线图,以显示散射模式的相对强度。等高线图的示例如图 14 所示。尽管用户可以自由选择任何一种显示方式,但有时离散的细胞群在等高线图上更易于观察。

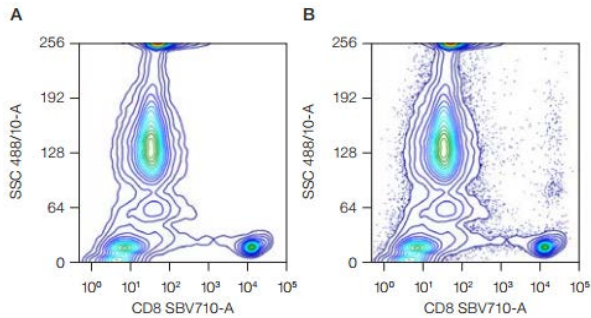


图 14. 用于分析裂红后全血细胞的等高线图。 **A**, SSC vs. 小鼠抗人 CD8: StarBright Violet 710 (CD8SBV710; #MCA1226SBV710), 无离群值; **B**, SSC vs. 小鼠抗人 CD8: StarBright Violet 710 (CD8SBV710), 有离群值。SSC, 侧向角散射; SBV, StarBright Violet。

单参数或单变量直方图

这些直方图在 x 轴上显示单个测量参数 (相关的荧光或光散射强度), 在 y 轴上显示事件数量 (细胞计数)。数据以直方图表示, 其中包括收集的所有数据或选定的 (门控) 群体。虽然简单, 但可用于评价样品中具有特定特征或表达目的标记物的细胞总数。具有所需特征的细胞称为阳性细胞群。示例见图 15B。对外周血细胞进行 CD4 染色, 然后使用前向角散射和侧向角散射对淋巴细胞进行圈门。两个峰可被理解为阳性和阴性细胞群。在该示例中, CD4 阳性 T 细胞占所圈淋巴细胞的 35% 左右。

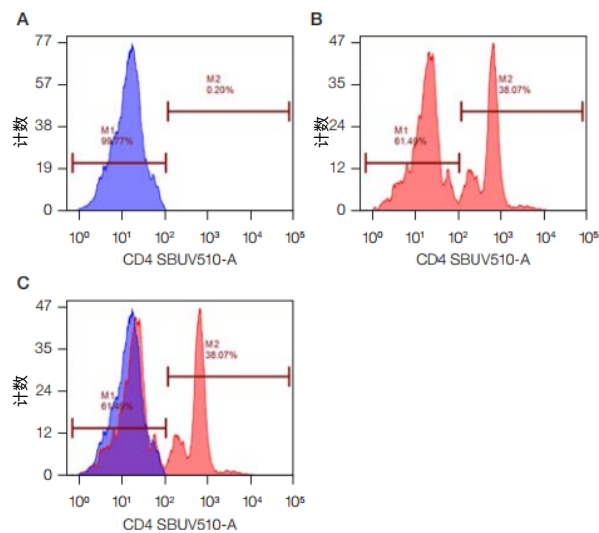


图 15. 单参数直方图。 **A**, 淋巴细胞门内的未染色细胞 (图 13A) 显示背景荧光的水平。 **B**, 用小鼠抗人 CD4: StarBright UltraViolet 510 (CD4SBV510) 染淋巴细胞门内的细胞 (图 13A) 以确定 CD4 表达。 **C**, 将对照 (未染色) 群体叠加到染色群体上, 以便于鉴定阳性细胞。M1, 标记物 1; M2, 标记物 2; SBUV, StarBright UltraViolet。

为了准确鉴定阳性细胞群, 在有合适的对照的情况下应该进行重复检测, 这会在第 4 章讨论。尤其是对没有阴性细胞群作为对照, 只观察到单个峰的样本进行重复检测时很有必要的; 但是, 由于细胞群体是混合的, 通常在流式细胞术中能观察到多个峰。图 15A 显示了对照直方图。在这种情况下, 蓝色的未染色外周血样品会叠加在染色的红色阳性细胞群上, 从而可以准确定义背景染色水平。

使用分析软件, 除了门内细胞的数量和百分比外, 还可以获得许多参数的测量值和统计数据。这包括诸如平均荧光强度 (MFI) 之类的测量值, 这个测量值允许您评价群体的亮度, 通常在荧光强度有少量增加或减少时使用。

双参数图

双参数图显示两个测量参数,一个在 x 轴上,一个在 y 轴上,细胞事件被展示为密度(或点)图。参数可以是荧光、FSC、SSC 或其组合,这取决于您想显示的内容。通过前向角散射和侧向角散射圈定淋巴细胞后(图 16A),用 CD3SBUV400 和 CD19SBUV605 对其进行染色,分别鉴定 T 和 B 细胞群。然后可以通过对不同的群体设置门或象限来量化 B 和 T 细胞的相对比例(图 16B 和 C)。

在这个例子中,大约有 5% 的 B 细胞和 78% 的 T 细胞(图 16B)。在将密度图分为四个象限的情况下,每个细胞群比例是直观的,可以让您明确每个标记物的单阳性细胞以及双阴性和双阳性细胞(图 16C)。对于 T 和 B 细胞,CD3 和 CD19 是互斥的表达,因此不存在双阳性细胞。当没有明显细胞分群或表达不互斥时,适当的对照将有助于确定阳性和阴性群体。

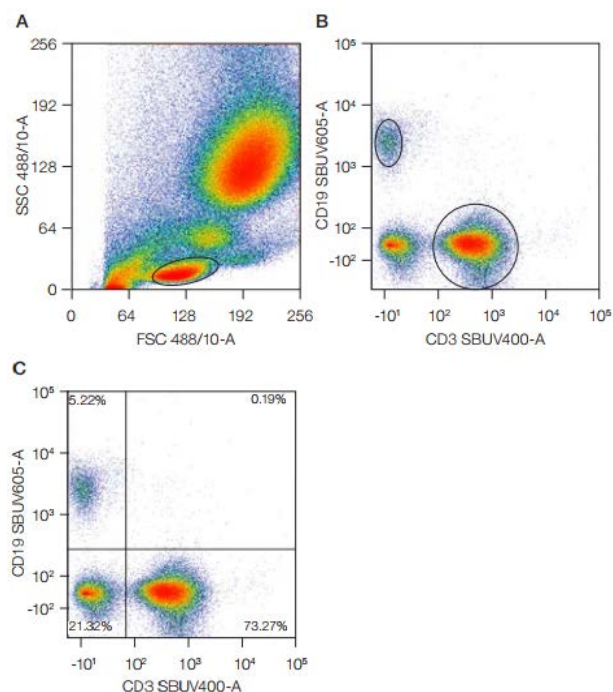


图 16. 双参数(双色荧光)密度图。裂红后的全血细胞用 CD3SBUV400 和小鼠抗人 CD19: StarBright UltraViolet 605 (CD19SBUV605) 染色。使用不同的圈门方法确定相对群体。**A**, SSC vs. FSC; **B**, CD19SBUV605 vs. CD3SBUV400; **C**, B 和 T 细胞群的相对定量。FSC, 前向角散射; SBUV, StarBright UltraViolet; SSC, 侧向角散射。

门控可以在数据集上多次使用,以提炼出目标群体。逻辑门控的简单原理可以反复应用,以进一步确定特定细胞类型上的表达模式。随着单个实验中标记物和荧光团数量的增加,这一点尤其有用。

图 17 显示了一个使用简易逻辑门控鉴定特定细胞群的多色实验示例。简言之,通过前向和侧向角散射鉴别并圈定淋巴细胞(图 17A)。鉴别出 CD3 阳性 T 细胞(图 17B),并通过 CD4 和 CD8 的表达来圈门(图 17C)。

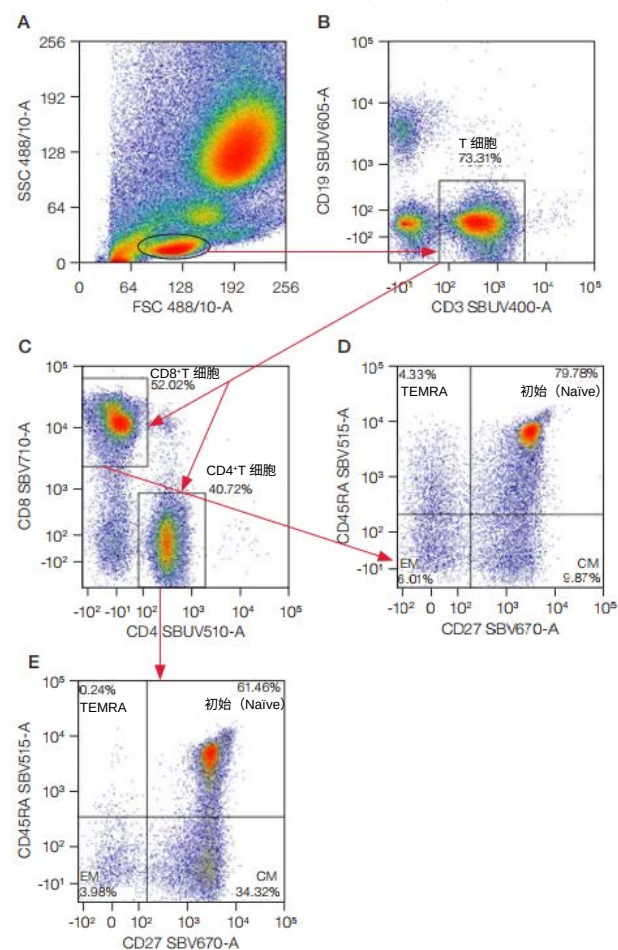


图 17. 用于鉴定特定 T 细胞亚群的逻辑门控。在含有 1% (w/v) BSA 的 PBS 中用 CD19SBUV605、CD3SBUV400、CD4SBUV510、CD8SBV710、小鼠抗人 CD45RA: StarBright Violet 515 (CD45RASBV515) 和小鼠抗人 CD27: StarBright Violet 670 (CD27SBV670) 对裂红后的全血细胞进行染色。箭头显示了鉴定不同 T 细胞亚群的门控策略。**A**, SSC vs. FSC; **B**, CD19SBUV605 vs. CD3SBUV400; **C**, CD8SBV710 vs. CD4SBUV510; **D**, CD45RASBV515 vs. CD27SBV670 (CD8 T 细胞); **E**, CD45RASBV515 vs. CD27SBV670 (CD4 T 细胞)。BSA, 牛血清白蛋白; CM, 中央记忆型; EM, 效应记忆型; FSC, 前向角散射; PBS, 磷酸盐缓冲生理盐水; SBUV, StarBright UltraViolet; SBV, StarBright Violet; SSC, 侧向角散射; TEMRA, CD45RA+效应记忆型 T 细胞。

随后在 CD4⁺ (图 17D) 和 CD8⁺ 群体 (图 17E) 中测定 CD45RA 和 CD27 的相对表达, 用于鉴定初始细胞、中央记忆型 (CM) 细胞、效应记忆型细胞 (EM) 和终末效应记忆型 RA⁺ 细胞 (TEMRA)。该原则可以在其他标记物上继续进行, 但值得注意的是, 随着细胞群体的定义变得更明确, 每个门内的细胞事件会更少, 这表明了收集足够的细胞来解答实验问题的重要性。

逻辑门控是鉴定目标细胞的最常见方法。然而, 随着实验中荧光数量的增加, 出现了数据分析的替代方法。这些大型数据集通常是在光谱流式细胞术中生成的, 其已经开发了 40 多种颜色的方案。这些替代分析方法将在第 6 章中讨论。

反向设门以确认门控策略

反向设门是验证染色方式或门控方法的有效方法。这可以分析在具有不同参数的点图上的门内鉴定的细胞。可用于以下方面: 不确定自己的设门、标记物表达水平、非特异性结合; 不确定是否鉴定出目标细胞或是否存在死亡细胞; 或者需要额外的信息来鉴定您的细胞。图 18 中可以看到一个简单的反向设门策略, 其中门 1 中的 CD3⁺ 细胞显示淋巴细胞的 FSC 和 SSC 特征, 门 3 中的 CD3-CD14^{hi} 细胞显示单核细胞的 FSC 和 SSC 特征, 门 2 中的 CD3-CD14^{lo} 细胞则显示粒细胞的 FSC 和 SSC 特征。

门控不再需要是一个繁杂的过程, 只需遵循几个简单的步骤, 您便可以迅速开始分析特定的细胞群。随着您增加染色剂和荧光团的数量, 您将能够鉴定更特异的细胞群。然而, 您需要确保使用正确的对照并具有足够的样品量, 因为随着荧光的增加, 背景和非特异性结合也会增加, 从而使数据更难分析。

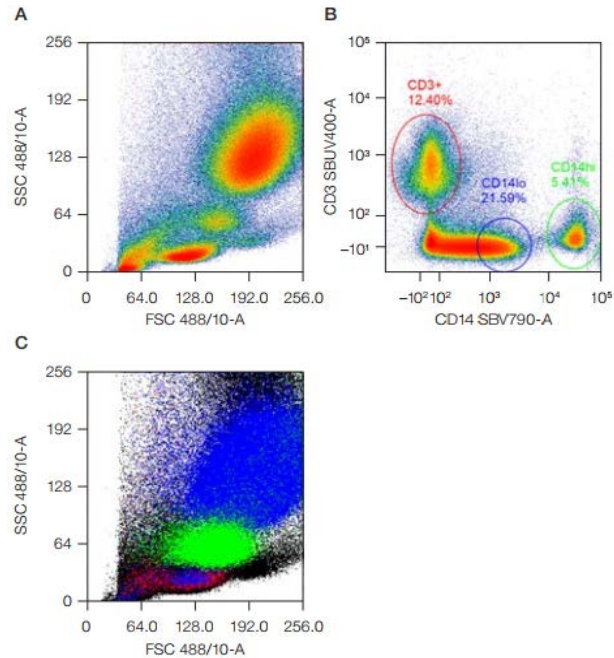


图 18. 用于鉴定白细胞亚群的反向设门。 A, 裂解红细胞后的全血细胞, B, 用 CD3SBUV400 和 CD14SBV790 染色。C, 绿色、蓝色和红色门中细胞的 FSC 和 SSC 特征。FSC, 前向角散射; SBUV, StarBright UltraViolet; SBV, StarBright Violet; SSC, 侧向角散射。



4. 流式细胞术中的各种对照

对照在任何实验中都是至关重要的，它能够可靠地将您的结果与背景变化和非特异性影响区分开来。有些对照也是流式细胞术特有的，应包含在每个实验中。这些包括未染色对照、死活对照和补偿对照。在这里，我们将讨论流式细胞术的一些必要的对照，这些对照将帮助您获得可供发表的数据。

未染色对照

在流式细胞术中首先要确定的对象之一是您的细胞群。使用未染色的细胞来设置仪器，以便能在 FSC 和 SSC 图上很容易观察到所有细胞。未染色的细胞也可用来设置 PMT 电压，这样您就可以区分微弱信号与自发荧光和电子噪声，同时将最亮的细胞保持在检测范围内。这在以往一直是通过改变 PMT 电压来完成的，以使未染色的细胞位于实验中使用的每个荧光参数的对数坐标的第一个刻度范围内（图 19）。使用来自未染色细胞的数据（图 19B），可以将来自染色细胞的信号与来自自发荧光的信号区分开。

最近，一种被称为电压滴定的用于设置 PMT 电压的替代方法已经得到普及。该方法使用具有多种荧光强度的荧光微球将 PMT 电压设置在其最佳灵敏度处。电压逐渐增加，最佳电压是在荧光强度最低的两个峰之间观察到最大差异之处。使用这种方法时，阴性群体不一定会位于对数坐标的第一个刻度范围内，并且高亮度信号可能会超出范围。因此，针对每个实验可能需要进行一些调整，但不应在实验中的样品之间进行调整。

同型对照

在流式细胞术中，染色的背景水平可能存在一些问题，尤其是对于稀有群体、低表达水平的细胞以及构建多色方案时。同型对照的抗体不能与所分析的细胞类型或样品上的抗原反应。同型对照用于表面染色，其作用是确认观察到的染色是由于特异性抗体与靶标结合，而不是假象所致。它们不应用于确定阳性细胞和阴性细胞或用于设门，并且可能不适用于细胞内染色。

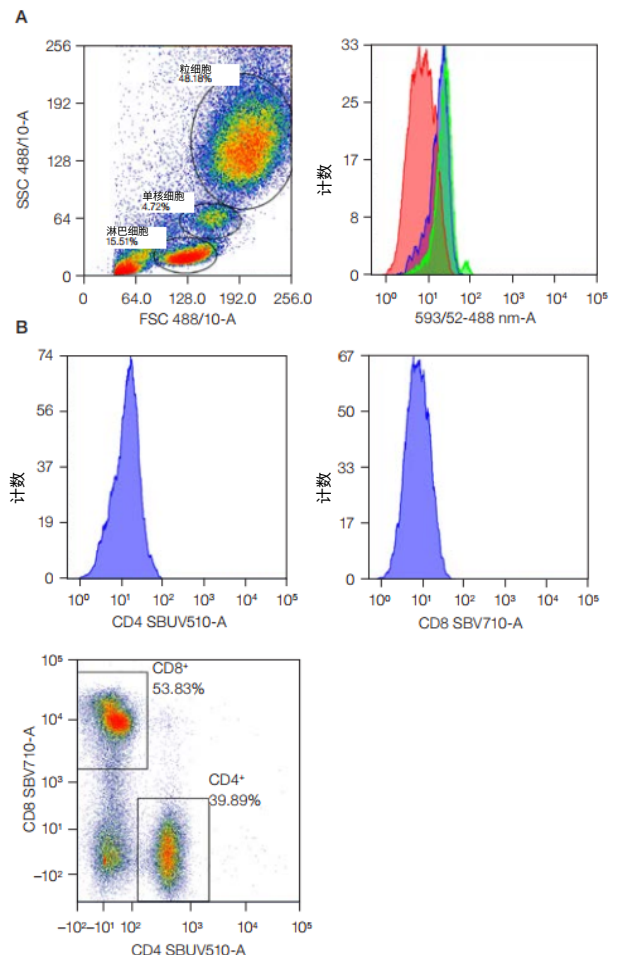


图 19. 未染色对照。A，未染色的外周血用于设置 FSC 和 SSC，以可视化目的细胞并显示三个标记群体（直方图图例：红色，淋巴细胞；蓝色，单核细胞；绿色，粒细胞）中的自发荧光。**B**，未染色的细胞（直方图）用于设置荧光通道的 PMT 电压，以便评价完全染色的细胞（在点图中）。FSC，前向角散射；PMT，光电倍增管；SBUV，StarBright UltraViolet；SBV，StarBright Violet；SSC，侧向角散射。

同型对照将：

- 确定抗体与单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞和 B 细胞上表达的 Fc 受体的非特异性结合 (Fc 受体可以被封闭以减少非特异性结合，稍后在本章解释)
- 确认观察到的染色是由于特异性结合而非假阳性导致
- 揭示抗体或荧光团，如 R-藻红蛋白 (RPE 或 PE) 和 FITC (Takizawa 等人，1993, Hulspas 等人，2009) 与细胞组分的其它非特异性结合

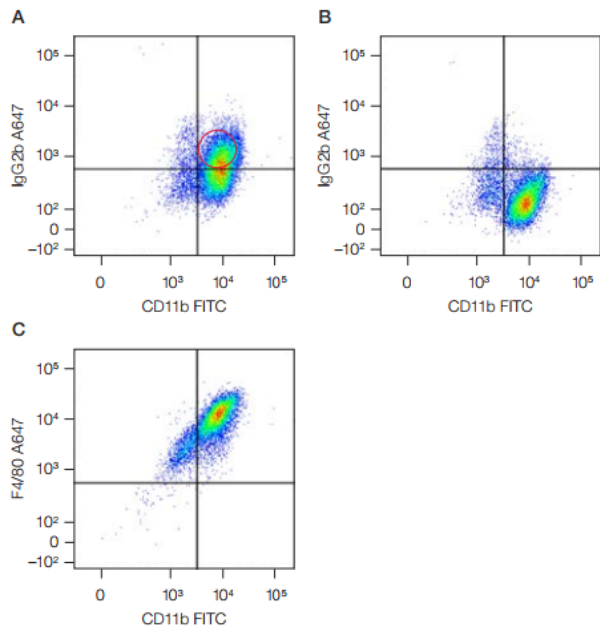


图 20. 同型对照。在 7-AAD 存在下 (以排除死细胞)，对 J774 巨噬细胞进行 CD11b 和 F4/80 (或同型对照 IgG2b) 的抗体染色。**A**，没有使用 Fc 封闭的 CD11b 和 IgG2b 染色；**B**，使用 Fc 封闭的 CD11b 和 IgG2b 染色；**C**，使用 Fc 封闭的 CD11b 和 F4/80 染色。不使用 Fc 封闭时，就会出现由红色圆圈所示的背景染色。7-AAD，7-氨基放线菌素 D；Axxx，Alexa Fluor；Fc，可结晶片段；FITC，异硫氰酸荧光素；IgG2b，免疫球蛋白 G2b。

最合适的同型对照为：

- 宿主物种
- 免疫球蛋白 (Ig) 亚类
- 一抗上的荧光染料

如果您正在使用与 FITC 偶联的小鼠 IgG1 单克隆抗体，则应选择与 FITC 偶联的小鼠 IgG1 同型对照。

由于在各供应商之间每种抗体偶联的荧光团分子的数量 (称为 F/P 比) 是不同的，因此最好从与一抗相同的供应商处购买同型对照。如果可能，还建议同型对照的使用浓度与一抗浓度保持一致。

非特异性抗体结合可通过以下方式减少：

- 封闭 Fc 受体
- 向缓冲液中添加过量的蛋白质，例如牛血清白蛋白 (BSA)
- 滴定您的抗体
- 使用活/死细胞标记物，通过门控排除死细胞
- 染色后进行额外的清洗步骤

同抗对照

同型对照的一种替代方法是同抗对照。同抗对照是指存在过量同一未标记抗体时对细胞进行染色的情况。未标记抗体占据了所有的结合位点，阻止了标记抗体的特异性结合。因此，检测到的任何信号都来自非特异性结合 (图 20)。

死活对照

死细胞具有高水平的自发荧光和非特异性抗体结合，这可能导致假阳性、可检测动态范围缩小以及分辨率降低。这将使检测弱阳性样品和稀有群体变得困难。使用前向和侧向角散射门可以排除碎片和一些死细胞，但不会将其全部清除。因此，流式细胞术检测方案中应包含活性染料。图 21 举例说明了一个小鼠骨髓细胞的示例，其中，将活性染料与前向和侧向角散射门相结合显著改善了数据质量。通过使用前向和侧向角散射门排除死细胞，您可以鉴定小鼠骨髓中 GR-1 和 CD11b (右上象限) 均为阳性的髓系细胞。当引入活性染料时 (本例中为 DAPI)，您可以看到相同的前向和侧向角散射中均包含活细胞和死细胞。

当活性染料与前向和侧向角散射门结合使用时，CD11b 和 GR-1 的染色更加清晰，一些可能是来自死细胞的染色会消失。

活性染料有两种类型。核酸结合染料（例如碘化丙啶、7-AAD 和 DAPI）在与核酸结合后会发出荧光，但不能通过完整的细胞膜。因此，只有具有可渗透膜的死细胞才会发出荧光。

第二类活性染料，即蛋白质结合染料，其与存在于细胞表面蛋白质上的游离伯胺共价结合。当细胞膜受损时，染料会穿过细胞并与细胞内伯胺反应。由于死细胞中可结合的游离胺含量增加，因此在死细胞中观察到更亮的荧光，从而可以轻松地将其与活细胞区分开。

VivaFix 细胞活性试剂是可固定活性染料，可在比核酸结合染料更宽的激发和发射光谱范围内使用，便于分析和添加到多色流式细胞术实验方案中。

如第 2 章所述，单染将揭示不同荧光染料之间的光谱重叠水平，并可去除或补偿这种重叠（图 12）。由于添加每个新的荧光团可能会对染色方案中的现有荧光团产生影响，在这种光谱重叠中，应该对每个使用的荧光素调节补偿。

以下是使用单染色样品进行补偿时需要牢记的一些重要原则：

1. 补偿对照的染色必须与样品亮度相同或亮度高于样品，以模拟实验中的任何荧光溢漏情况。

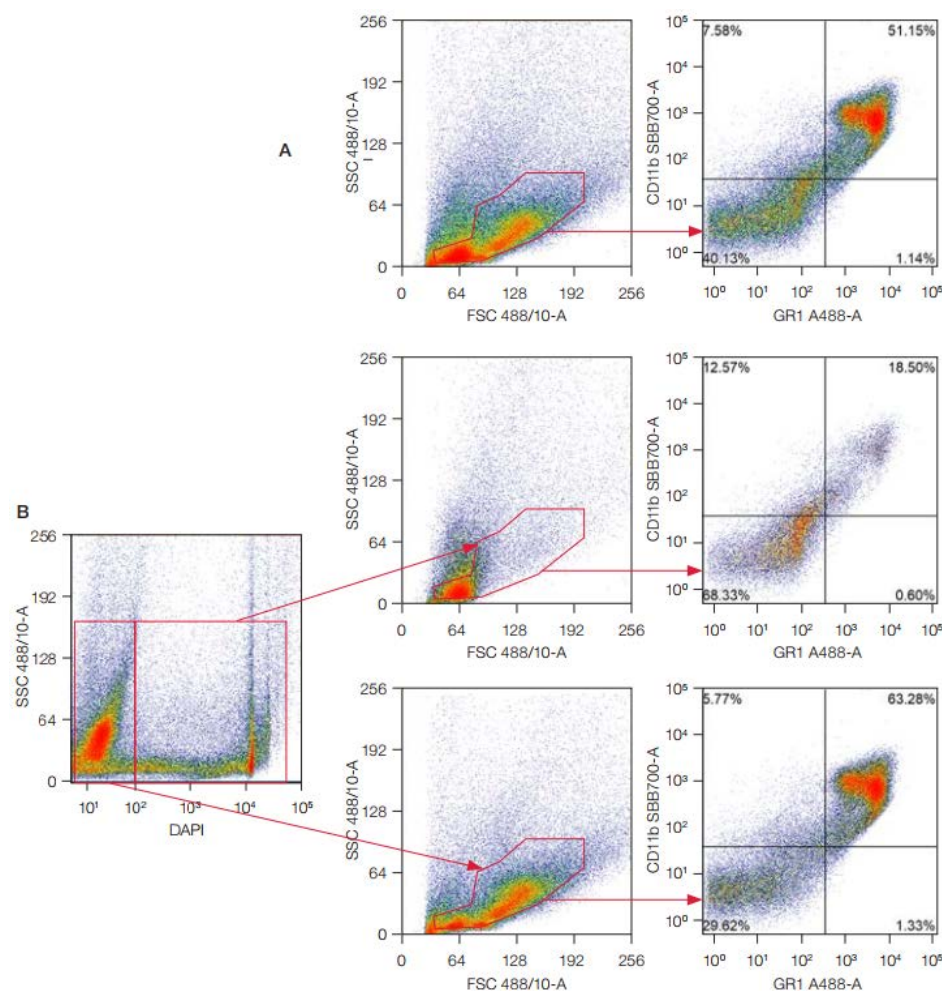


图 21. 死活对照。 A，前向和侧向角散射门用于选择小鼠骨髓中的 GR-1 和 CD11b 阳性细胞（右上象限）。B，活性染料 RapiDrop 碘化丙啶 (#1351101) 表明，使用前向和侧向角散射门并不是从分析中消除死细胞的最有效策略。通过将活性染料碘化丙啶和前向和侧向角散射门相结合，可以在小鼠骨髓中鉴定 CD11b 和 GR-1 阳性细胞。Axxx, Alexa Fluor; FSC, 前向角散射; SBB, StarBright Blue; SSC, 侧向角散射。

偶联抗体的微球可以代替细胞，荧光团偶联抗体也可进行替换，只要比对照测量的荧光更亮即可。但串联染料除外，由于 FRET 水平各不相同，串联染料无法替换。

注：尽管假设使用相同的供体和受体产生的所有串联染料具有相同的发射似乎是没有问题的，但事实并非如此。来自不同供应商或不同批次的串联染料必须像不同的染料一样处理，并且每种染料都应使用单独的单染对照，因为所有这些染料的光溢出量可能不同。

2. 补偿算法需要用阳性群体和阴性群体进行（图 22）。如果您有 100%阳性的样品（例如，外周血中的 CD45），则可以将未染色的细胞加到样品中，以供阴性细胞群。无论每个单独的补偿对照是否包含微球，实验中使用的细胞，或即便是不同的细胞，其对照本身都必须包含具有相同自发荧光水平的颗粒。整组补偿对照可以包括微球或细胞的单个样品，但是单个样品必须具有相同荧光团的相同的载体粒子（细胞或微球）。
3. 补偿对照必须使用与样品相同的荧光团。例如，GFP 和 FITC 都主要发射绿色光子，但发射光谱却大不相同。因此，不能将其中一个用于样品，而另一个用于补偿对照。
4. 必须收集足够多的事件，以便软件对溢出进行统计学显著性确定。对于阳性和阴性群体，理想数量大约为 5,000 个事件，但在必要时，可以使用更少的事件。
5. 可在采集过程中或采集后应用补偿。在您设置了 PMT 电压并应用了补偿后，请勿更改电压，因为这将使补偿无效。不建议手动进行补偿调节。一些较新的软件，如 FCS Express，具有自动补偿功能，比手动方法更加精确。

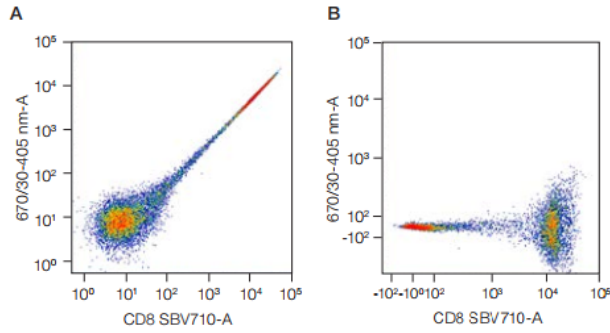


图 22. 补偿对照校准光谱重叠。用小鼠抗人 CD8：StarBright Violet 710 (CD8SBV710) 对人外周血染色。**A**，无补偿调节的染色。**B**，应用补偿的染色。SBV，StarBright Violet。

Fc 封闭对照

Fc 受体存在于单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞和 B 细胞上。顾名思义，它们通过其恒定的 Fc 结构域而不是抗原特异性片段抗原结合 (Fab) 结构域结合抗体。

这种非特异性结合可能导致假阳性和无意义的结果。为了防止发生这种情况，Fc 封闭试剂（例如，人 Fc Seroblock 和鼠 Fc Seroblock）封闭 Fc 受体，并确保仅观察到抗原特异性结合（图 23）。专用封闭试剂的替代品是来自相同样品类型的稀释血清（例如，如果小鼠细胞染色，则为小鼠血清）。如果过量使用，血清中的免疫球蛋白将竞争 Fc 受体，阻止偶联抗体的结合。

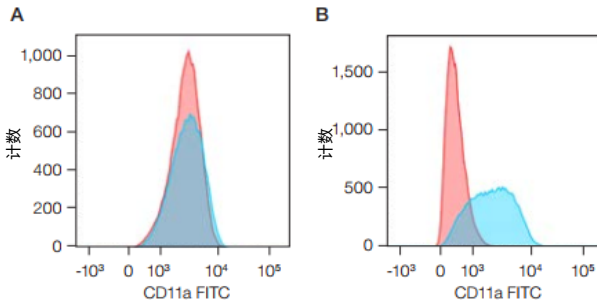


图 23. Fc 封闭。用小鼠抗人 CD11a 抗体 (#MCA6115F)（蓝色）或小鼠 IgG2a 阴性对照抗体 (#MCA929F)（红色）染色的 THP-1 细胞。**A**，含有人 Seroblock (#BUF070A)；**B**，不含人 Seroblock (#BUF070A)。FITC，异硫氰酸荧光素。

荧光减一对照

在构建多色流式细胞术染色方案时，荧光减一（Fluorescence minus one, FMO）对照非常重要，因为它们将帮助您确定应在何处设门。当您在染色方案中补偿了多个荧光团时，便会发生荧光团扩散。如图 24 展示了阳性群体的扩散水平。

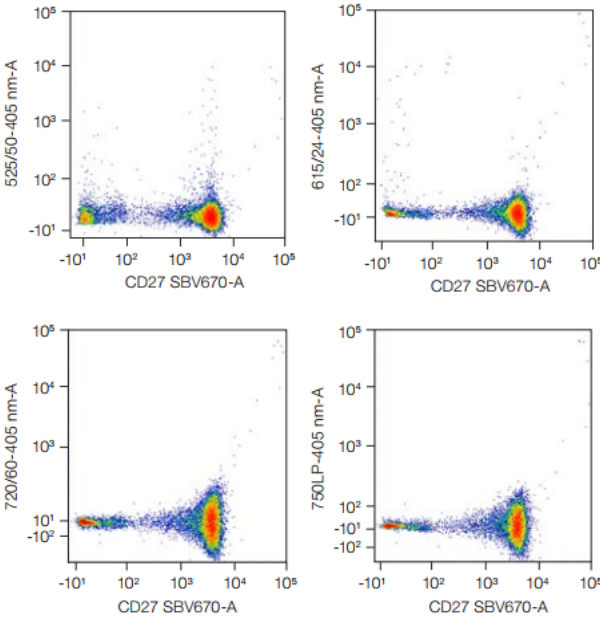


图 24. 荧光扩散。基于人外周血补偿数据的小鼠抗人 CD27：StarBright Violet 670（CD27SBV670；#MCA755SBV670）的密度图，显示荧光扩散到邻近通道中。LP，长通；SBV，StarBright Violet。

扩散随所用荧光团的数量和亮度而增加。尽管严格设计实验可避免通道出现大量扩散，以及抗体滴定将有助于减少这种影响，但 FMO 对照仍然很重要。FMO 对照是在使用的所有荧光素上减去一个荧光素后对实验细胞进行染色的样本。FMO 矩阵示例如下表 4 所示。图 25 显示了从其他通道扩散的荧光如何影响数据，确保您可以相应地确定设门位置。当开始新的多色实验时，染色方案中所有荧光素均应设置 FMO 对照。这可以使您评价所有荧光素在未染色通道中的扩散，并相应地设门。

表 4. FMO 矩阵。

管	FITC	PE	PE-Cy5	PE-A750
未染色	—	—	—	—
FITC — FMO	—	+	+	+
PE — FMO	+	—	+	+
PE-Cy5 — FMO	+	+	—	+
PE-A750 — FMO	+	+	+	—

Axxx，Alexa Fluor；FITC，异硫氰酸荧光素；FMO，荧光减一；PE，藻红蛋白。

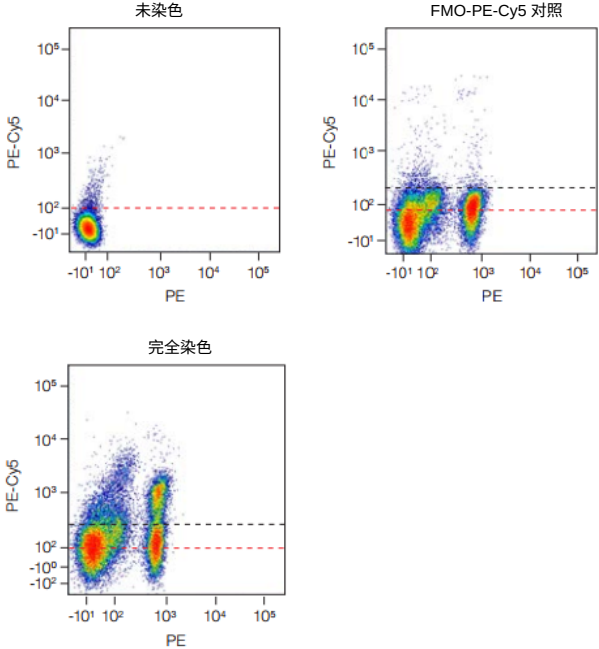


图 25. 使用 FMO 对照确定荧光扩散并准确设门。多色流式细胞术的点图显示，与未染色的对照相比，荧光扩散到 FMO 对照显示的 PE-Cy5 通道中。黑色虚线表示 FMO 门控边界，而红色虚线表示未染色边界。FMO，荧光减一；PE，藻红蛋白；PE-Cy5，藻红蛋白-花青 5。

细胞内染色对照

细胞内染色可能比表面染色更复杂，这通常是由于蛋白质-蛋白质相互作用导致细胞内背景水平较高。由于它需要固定和透化，这会影响抗原检测、自发荧光、荧光团亮度和细胞形态，因此需要其他对照。对照，例如阴性细胞系、已知对您使用的细胞呈阴性的抗体或单独的二抗（如果使用一抗和二抗）可用于确定胞内染色中的特异性结合。在胞内染色中使用这些对照的示例如图 26 所示。

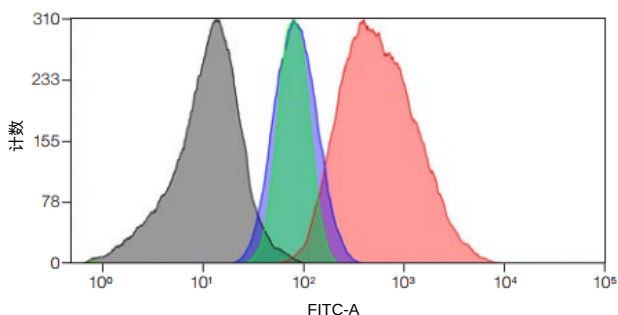


图 26. 细胞内对照。用抗 Cas9 抗体和与 FITC 偶联的二抗 (#STAR121F) 对 HEK-293T 细胞进行染色，显示为 Cas9 阳性（红色）或 Cas9 阴性（绿色）。包括未染色对照（灰色）和单独的二抗对照（蓝色）。FITC，异硫氰酸荧光素。

在您的样品中使用内部对照是细胞内染色对照的一个最佳示例。当对外周血中的 T 细胞特异性标记物染色时，请检查同一样品中的 B 细胞和单核细胞是否为阴性。此外，由于细胞内染色需要固定和透化，因此未透化的细胞进行染色将为您提供一些有关表面染色的背景水平的信息。除了对照抗体外，还必须包括其他试剂的相应对照。用于细胞内染色的固定剂和透化缓冲液可能会影响细胞的形态，因此您可能需要更改分析中通常使用的门的位置。固定和透化条件可能需要优化，某些试剂（例如荧光团 APC-Cy7）可能不适合固定。

生物对照

除了染色和同型对照外，还应考虑生物对照，这将使您能够确定染色特异性和实验局限性。

生物对照对于所有染色都很重要，尤其是对细胞内染色格外重要，因为其具有更高的背景荧光。对照包括已知阴性样品和已知阳性样品。这些包括已知表达目标抗原或缺乏目标抗原表达的细胞，例如已使用 RNA 干扰 (RNAi) 或 CRISPR 技术敲除抗原而产生的阴性细胞，或者已经被转染并且抗原被过表达以验证阳性染色的细胞。

对于某些实验，例如细胞因子分泌测定，未刺激和完全刺激的样品对于确定阳性结果和荧光染色的动态范围以及确认抗体是否按预期发挥作用都很重要。

如图 27 中示例所示，在刺激和未刺激的细胞上对人外周血淋巴细胞进行 CD154 和 CD3 染色。抗体染色的结果与从这些细胞类型预测的染色结果相匹配，表明抗体按预期发挥作用。使用这些抗体，可以将阳性样品与阴性样品区分开，证明抗体具有适当的动态范围。

这种类型的对照也可以帮助您选择最适宜的荧光团，因为用较亮的荧光团产生的细微变化可能具有更好的分辨率。在选择正确的生物对照时，了解您的实验和样品是很重要的。

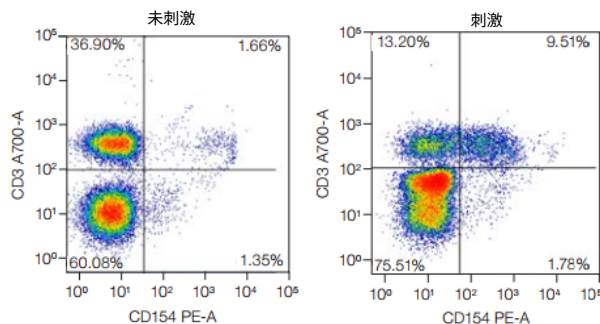


图 27. 使用经刺激和未经刺激的对照。未经刺激或用 PMA 和离子霉素刺激人外周血 5 小时，然后用小鼠抗人 CD3: Alexa Fluor 700 (#MCA463A700) 和大鼠抗人 CD154: RPE (#MCA1938PE) 进行染色。Axxx, Alexa Fluor; PMA, 佛波醇 12-肉豆蔻酸酯 13-乙酸酯; PE, 藻红蛋白。



5. 优化实验

流式细胞术的基础之一是能够在单个粒子通过激光束时对其进行检测。但是，流式细胞仪检测的是进入仪器的样本，并且质量差的样品一般会导致检测结果不准确。高质量的样本是实验的关键，尽可能轻柔的处理实验样本，保证样本的活性才能获得比较准确的数据。

样品制备

为了获得最佳结果，样品制备时有许多考虑因素。第一个是样品本身。例如，冻存细胞将进行与贴壁细胞系不同的处理。遵循一些基本规则将帮助您优化实验（例如，冻存细胞与贴壁细胞系的处理不同，在做不同样本处理时，可以遵循一些特定规则来优化实验），具体规则如下：

1. 尽快解冻细胞，离心前通过将细胞重悬于大体积冷培养基或含 BSA 或胎牛血清（FCS）的磷酸盐缓冲生理盐水（PBS）中，去除二甲基亚砜（DMSO）。解冻后，细胞可能需要进行培养以恢复表位表达。
2. 在准备用于流式实验的细胞时，您可能需要使用比传代处理更温和的方式进行。胰蛋白酶处理通常会破坏细胞，产生大量的细胞碎片，并且破坏您想要检测的抗原表位。
3. 使用机械分离组织（例如脾脏或淋巴结）时要轻柔。过滤样本可以帮助去除细胞团块。
4. 从次级淋巴组织中提取某些细胞（例如，F4/80+巨噬细胞和滤泡树突状细胞[DCs]）时需要其他酶，例如胶原酶或 liberase 酶。然而，如果消化时间过长，这些酶可能会无意中去除抗原表位，因此可能需要对其进行优化。
5. 清除任何不需要的污染物质。例如，从骨髓中冲洗骨髓时，尽可能完全去除肌肉。另外，过滤可以清除任何不需要的骨骼和肌肉。

6. 收集外周血时使用适当的抗凝剂。检测细胞内细胞因子或一些需要 Ca^{2+} 离子的表面标记物（如整合素）时不应使用 EDTA。
7. 可以通过使用 Erythrolyse 红细胞裂解缓冲液（#BUF04B）或类似的裂解缓冲液进行低渗裂解来从外周血样品中去除红细胞。需注意，请勿将样品在缓冲液中停留较长时间。也可以使用密度梯度离心的方法收集单个核细胞。离心后单个核细胞层处于分离液与血浆之间，红细胞则位于分离液的底部。遗憾的是，粒细胞也会通过该界面位于分离液的底部，因此不建议对粒细胞使用密度梯度离心的方法进行获取。
8. 避免涡旋和过度离心，或使细胞处在离心结束去除上清后干燥的细胞沉淀状态。在重悬细胞或高浓度重悬细胞的时候产生过多的气泡会增加细胞死亡。将细胞存放在冰上可以提高活力，因为这会减缓坏死和细胞代谢。
9. 确保使用正确的试管。许多细胞类型（例如，单核细胞）对聚苯乙烯具有较强黏附，但对聚丙烯的黏附较差。如果细胞数量较少，应避免使用聚苯乙烯试管，以减少这些细胞类型的损失。
10. 所有样品的制备时间都应尽可能短，因为制备细胞所花费的时间会对细胞活力产生显著影响。

自发荧光

细胞内物质自身所发出的一些荧光称为自发荧光 (Autofluorescence)，这可能会给流式细胞术数据分析带来困扰。细胞自发荧光可能是由于存在胶原蛋白和弹性蛋白、环状化合物 (例如 NADPH 和核黄素)、芳香族氨基酸以及细胞器 (例如线粒体和溶酶体) 所致。由于产生荧光的细胞化合物和细胞器水平的变化，细胞中的自发荧光可能会发生变化。通常，由于荧光化合物数量的增加，较大和更多颗粒状细胞的自发荧光会增强。

大多数自发荧光是在较短的光波长下检测到的，其激发光波长一般在 350-500nm，发射光处于 350-550nm。因此在该波长范围内会由于信噪比降低而导致灵敏度下降和假阳性的问题。并且，自发荧光溢出到其他通道中可能掩盖低表达抗原的信号。

可以使用未染色的细胞做为对照测定自发荧光水平 (图 28)。随着自发荧光在更长的光波长下减弱，发射光在 600 nm 以上的荧光团具有更少的自发荧光干扰。使用高亮度荧光团也将减少自发荧光的影响。

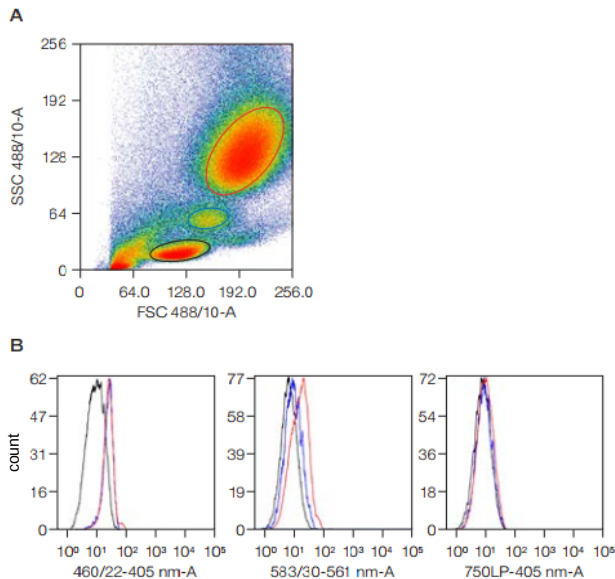


图 28. 自发荧光水平。 图 28. 自发荧光水平。未染色的外周血中的自发荧光水平可能会有所不同，具体取决于激光束的波长、发射波长和谱系。**A**，FSC vs. SSC 图，显示了粒细胞 (红色)、单核细胞 (蓝色) 和淋巴细胞 (黑色) 的设门。**B**，直方图显示在短波长 (左侧和中间直方图) 而不是长波长 (右侧直方图) 下，粒细胞 (红色) 和单核细胞 (蓝色) 相对于淋巴细胞 (黑色) 的自发荧光水平增加。FSC，前向角散射；LP，长通滤光片；SBV，StarBright Violet；SSC，侧向角散射光。

活细胞/死细胞排除

样品中存在死细胞会极大地影响染色，从而影响您的数据质量。如第 4 章所讨论，与活细胞相比，死细胞的自发荧光更亮，非特异性抗体结合能力增加，导致假阳性和低分辨率。这可能会使弱阳性样品和稀有群体的鉴定变得困难。加入死活染料，不仅仅是依赖 FSC 和 SSC 来排除死细胞，这将改善数据质量。

核酸结合染料，例如碘化丙啶 (PI)、7-AAD 和 DAPI，无法透过细胞膜，因此被活细胞排除在外。它们可以在抗体标记完之后上流式检测之前加入样本，但不能用于固定的细胞样本，因为固定过程会使细胞具有通透性。

蛋白结合染料是第二类活性染料，可用于区分样品中的活细胞和死细胞。它们与活细胞和死细胞的伯胺进行结合，当细胞膜受损时 (如死细胞和濒死细胞)，可以进入细胞内结合更多的伯胺，因此细胞具有更高的荧光。蛋白结合染料有两项主要好处。首先，它们可以是固定的 (也可以不固定使用)，并且不会降低活细胞和死细胞之间的分辨率；其次，与 DNA 结合染料相比，它们具有更广泛的激发和发射光谱范围，因此可以方便地添加到多色流式细胞术组合中 (表 5)。

由于死细胞被排除在分析之外，因此这些染料的意外溢出也被排除在分析之外，但您应始终纳入单一染料以便能够进行补偿。

表 5. 用于流式细胞术的活性染料。

	最大激发，		最大发射，
活性染料	激光		nm
VivaFix 353/442	355		353
DAPI	355	405	359
碘化丙啶	355	488	490
	561		
VivaFix 410/450	405		410
VivaFix 408/512	405		408
VivaFix 398/550	405		398
VivaFix 498/521	488		498
7-AAD	488	561	546
VivaFix 547/573	561		547
VivaFix 583/603	561		583
VivaFix 649/660	640		649

7-AAD, 7-氨基放线菌素 D; DAPI, 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶。

粘连体辨别

顾名思义，粘连体辨别可对单个细胞进行计数，并从分析中排除粘连体。当样品通过检测点时，它会形成一个信号脉冲，并提供每个信号的高度、时间（宽度）和面积等参数。如果有多个细胞同时通过，仪器会将它们全部记录为一个细胞。这会导致错误的统计数据、细胞亚群阳性率的过多或不足的结果。

通过将高度或宽度相对于前向角散射或侧向角散射的面积作图来进行粘连体排除。粘连体的面积和宽度值是单个细胞的两倍，而高度大致相同。因此，可以使用高度、宽度和面积之间的不平衡来鉴定粘连体（图 29）。

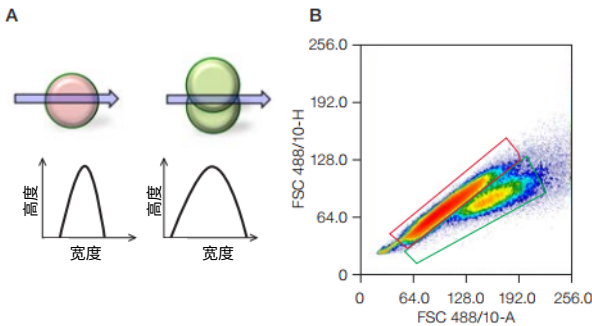


图 29. 粘连体辨别。A，粘连体（绿色门）宽度增加（因此面积增加），与单个细胞（红色门）高度相似。蓝色箭头代表激光束。FSC，前向角散射光。B，通过绘制 FSC 高度与 FSC 面积的对比图，可以将粘连体（绿色框内）与单个细胞（红色框内）区分开。

尽管粘连体辨别在所有采集中都很重要，但在细胞分选、细胞周期和 DNA 分析中尤其重要。通常，当获取外周血的多色组合时，B 细胞和 T 细胞的粘连体对于 T 细胞标记物 CD3 和 B 细胞标记物 CD19 均呈阳性。在细胞分选中，如果荧光阳性细胞和阴性细胞同时通过激光，会产生正脉冲，导致假阳性和分选结果不佳（图 30）。

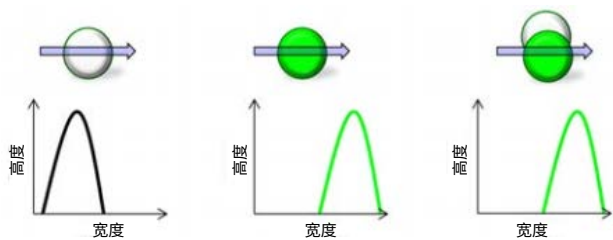


图 30. 细胞分选中的粘连体辨别。阳性和阴性细胞的粘连体将记录为一个阳性细胞，导致分选实验中的纯度较差。

在细胞周期分析中，区分具有两倍 DNA 量的粘连体和单细胞 G2/M 期很重要，因为当用 DNA 染料染色时，两者均显示出荧光增加。但所幸可以将粘连体与单细胞区分开。粘连体包含两个细胞，因此包含四个完整的 DNA 拷贝，而这两个细胞在 G0/1 期仅包含两个 DNA 拷贝。这些值可以分别表示为 4n 和 2n，其中 n 等于 DNA 拷贝数。

收集统计上相关数量的细胞

为了获得足够的统计把握度，在分析过程中需要收集的细胞数量可能会有很大差异，这取决于细胞的样品和阳性率。理论上，通过使用理想对照，仅出现一个事件就可以被视为阳性结果，但在实践中，这不太可能达到检测质量。如果样品具有丰富的目标细胞，例如人外周血中的 T 细胞，约占总单个核细胞的 20%，则与阳性率约为 5% 的自然杀伤 (NK) 细胞相比，必须收集和染色更少的细胞才能收集与 NK 细胞相同数量的事件。表 6 显示了细胞阳性率如何影响收集的细胞数量的示例。

表 6. 细胞出现率。

起始群体	出现率	收集的细胞数量
1,000,000	10%	100,000
1,000,000	1%	10,000
1,000,000	0.1%	1,000

另外，同时观察细胞亚群所需的标记物数量会影响需要获取的细胞数量。通常，使用更多的标记物需要获取更多的细胞，因为需要更多的逻辑门来鉴定目标亚群。示例如图 31 所示。尽管经过几轮门控后获得了 600,000 个细胞用以鉴定静息调节性 T 细胞 (Tregs)，但阳性细胞的最终数量约占 0.25%，大约 1,500 个事件。

最后，使用正确的对照来确定实验中的变化并定义阳性或阴性群体也非常重要，这可对少量事件做出准确的判断。关于如何收集足够事件的更详细的信息可查阅 Roederer (2008) 的文章。

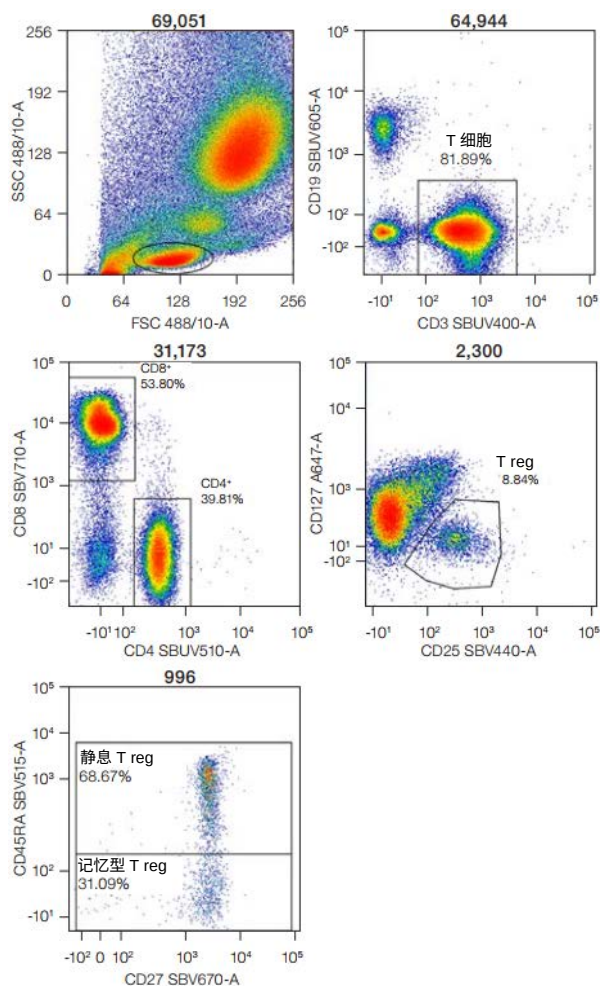


图 31. 门控对细胞数量的影响。用 CD3SBUV400、CD19SBUV605、CD4SBUV510、CD8SBV710、小鼠抗人 CD25: StarBright Violet 440 (CD25SBV440)、人抗人 CD127: Alexa Fluor 647 (CD127A647) 和 CD45RASBV515 对总共 600,000 个细胞进行染色,以鉴定静息调节型 T 细胞。门控策略表明,即使最初对 600,000 个细胞进行了染色,但在应用了多个门后,静息调节型 T 细胞的最终群体仅包含 996 个细胞。SBUV, StarBright UltraViolet; SBV, StarBright Violet; Treg, 调节型 T 细胞。

细胞内抗原的透化和固定

对细胞内抗原(例如细胞因子)染色可能比较困难,因为基于抗体的探针不能轻易通过质膜进入细胞。为此,应首先将细胞固定在悬浮液中,然后在添加抗体之前进行透化。选择固定剂是重要的第一步。多聚甲醛和戊二醛在赖氨酸残基之间形成键,从而形成交联的蛋白质,戊二醛会增加自发荧光。固定剂在 PBS 中的浓度通常为 0.5-4%,具体取决于样品。如果要将样品保存较长时间,则应将其从固定剂中取出,保存在 4°C 的 PBS 中。

甲醛不会透化样品,因此需要单独的透化步骤。这可使探针进入细胞内结构,同时保持细胞的形态散射特征完整。透化试剂有 Triton-100、洋地黄皂苷和皂苷等,通过破坏细胞膜起作用。透化水平很重要,因为要结合到表位可能需要不同水平的透化(例如,细胞质与核表位),并且未结合的抗体必须从细胞中充分洗出。目前也有许多市售试剂盒可提供用于固定和透化的试剂,例如 Leucoperm 试剂(图 32)。

醇类也用作固定剂,通常为 70% (v/v) 冷溶液形式,通过变性蛋白质来固定。这样做的好处是,它们同样可以透化细胞膜,并且可在 4°C 或 -20°C 下长期保存。通过乙醇固定的变性过程会掩盖表位,从而导致无法检测到抗体染色。在这种情况下可能需要优化。醇类最常用作 DNA 分析的固定剂。

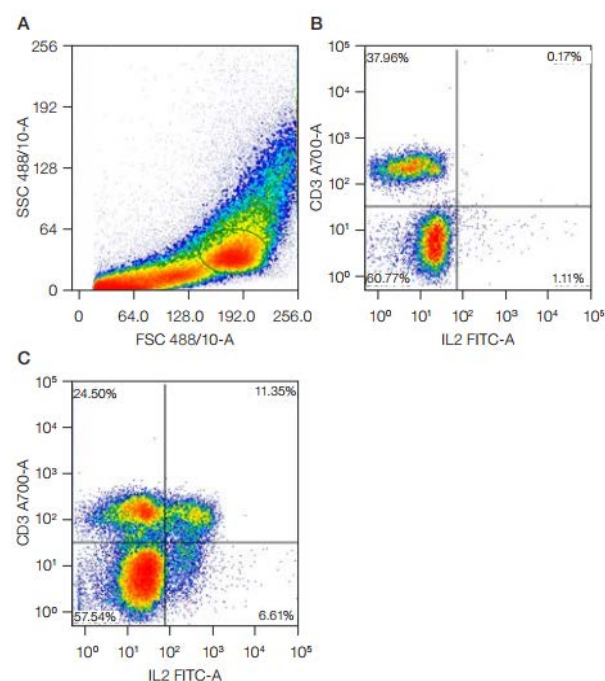


图 32. 细胞内染色。人全血表面用小鼠抗人 CD3: Alexa Fluor 700 (#MCA463A700) 染色,然后使用 Leucoperm 试剂 (#BUF09) 透化,并用大鼠抗人白介素-2: FITC (#MCA1553F) 进行细胞内染色。**A**, FSC vs. SSC 图;**B**, 静息淋巴细胞;**C**, 在染色之前,使用细胞刺激试剂和布雷菲德菌素 A (#BUF077A) 刺激淋巴细胞 5 小时。Axxx, Alexa Fluor; FITC, 异硫氰酸荧光素; FSC, 前向角散射光; SSC, 侧向角散射光。



6. 多色组合方案构建

多色流式细胞术涉及分析一个样品中的多个荧光参数。这些参数可以是表面标记物、细胞内标记物、DNA 或其组合。除使用正确的对照（第 4 章）、优化实验程序（第 5 章）、仔细制备样品之外，还需要考虑其他因素，以通过多色流式细胞术获得有意义的结果。当使用多种染料时，来自每种染料的信号可能会溢出到用于检测其他染料的相邻通道中。这种溢出可能导致分辨率降低，需要进行补偿调节（第 2 章）。其他因素，包括由非特异性染色、高背景染色和细胞自发荧光引起的高水平噪音，也可能导致灵敏度和分辨率降低。

信号分辨率

分辨率是指区分阳性和阴性群体的能力。实验过程中，分辨率取决于仪器、荧光染料的兼容性和门控。这可能涉及检测淋巴细胞门中的 B 细胞和 T 细胞，然后确定 T 细胞群中存在哪种类型的 T 细胞（图 33）。为了获得最佳分辨率，我们有一些简单的规则（稍后讨论），这将有助于基本方案的设计。最佳的设计方案可能并不是一开始就产生，但是这些规则会确保实验方案有一个正确开始。

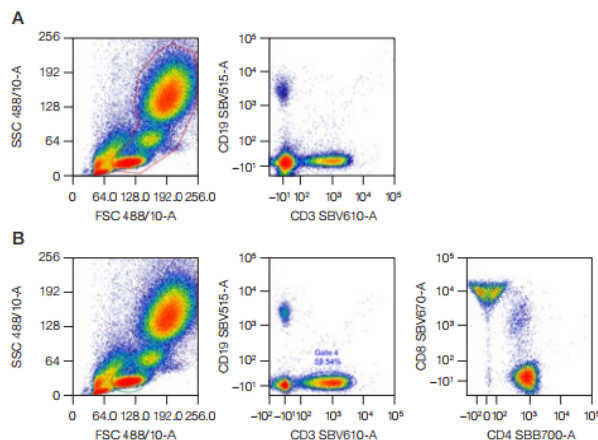


图 33. 细胞群分辨率。 A, 使用简单的前向和侧向角散射门以及 CD19 和 CD3 染色，可以从人外周血中的所有细胞中分辨 B 和 T 淋巴细胞。B, 使用淋巴细胞门以及 CD4 和 CD8 标记物，不仅可以确定 B 和 T 淋巴细胞，而且可以确定 T 细胞群内辅助性 T 细胞和细胞毒性 T 细胞的比例。FSC，前向角散射光；SBB，StarBright Blue；SBV，StarBright Violet；SSC，侧向角散射光。

优化多色方案构建的规则

在构建多色组合方案时，您应该考虑各种各样的因素，如下所述。

实验设计

在构建多色方案之前，您应该对如何设计实验有一个清晰的想法。考虑因素包括：

- 您是否在考虑一种细胞类型或亚群？
- 目标群体中的细胞数量会增加或减少吗？
- 您是否需要更改您的 FSC 或 SSC 设置？
- 您是否在考虑激活标记物或细胞表达量的变化？
- 标记物是否共表达？
- 标记物表达模式已知吗？
- 适当的对照是什么？

请记住，在设计任何实验时，对照都很重要，可以确认您看到的数据是否显著。第 4 章讨论了一些特定的流式细胞术对照。

仪器配置

在开始规划组合方案之前，了解仪器的配置非常重要。仪器上没有配置的通道，不可以选用对应的荧光染料，即使该荧光染料在理论上是最适合的。仪器配置包括流式细胞分析仪中激光器、光学元件和滤光片的设置。这在不同的流式细胞分析仪之间可能存在显著差异。

Bio-Rad S3e 流式细胞分选仪有两个激光器和四个荧光检测器。Bio-Rad ZE5 流式细胞分析仪具有五个空间上分离的激光器，具有同时检测 27 种荧光染料的能力。荧光染料的激发和发射峰将决定其是否与仪器兼容。FITC 在 490 nm 处激发，在 520 nm 处发射；因此，需要 488 nm 激光和 525/35 滤光片（或类似滤光片）。如果您有在 355 nm 处激发的荧光染料，但没有紫外激光，则您的流式仪器将无法检测到它。同样，如果您没有正确的带通滤光片（例如，StarBright Violet 670 染料需要 670/30 滤光片），您将看不到信号或仅能看到弱信号，因为只有微弱的信号会被检测到。

荧光染料分离

理想情况下，在构建多色组合方案时，使用的不同荧光染料最好被不同激光器激发，有可能的话接收染料发射光的滤光片也不要相同或相近。这将最大限度地减少溢出量，从而减少补偿的需要。它还会减少荧光扩散对数据的影响。

但是，随着组合中荧光染料数量的增加，同一激光器下难免会使用多种荧光染料。因此，设计中需要包括其他考虑因素。以下示例显示了如何使用 Bio-Rad Spectraviewer 帮助您选择具有更明显激发和发射特征的荧光染料，因此对组合中其他荧光染料的影响较小。如图 34 所示，SBV440、FITC、SBB700、PE 和 A647 染料五色组合相对容易构建，没有光谱重叠。可以添加另外三种荧光染料，例如 SBV515、SBV610 和 APC-Cy7，以制作八色组合，但仍然需要轻微补偿。当添加 SBV670、SBV790、PE-A647、PE-A750 和 A700 来制作 13 色组合时，需要更多的补偿，并且可以添加额外荧光染料而不会对现有的荧光染料产生重大影响的通道更少。在您的流式细胞分析仪中添加 355 nm 紫外线激光将给仪器带来更多染料的选择，因为您将可以添加更多荧光染料，设计更大的组合或更换染料以避免光谱重叠。

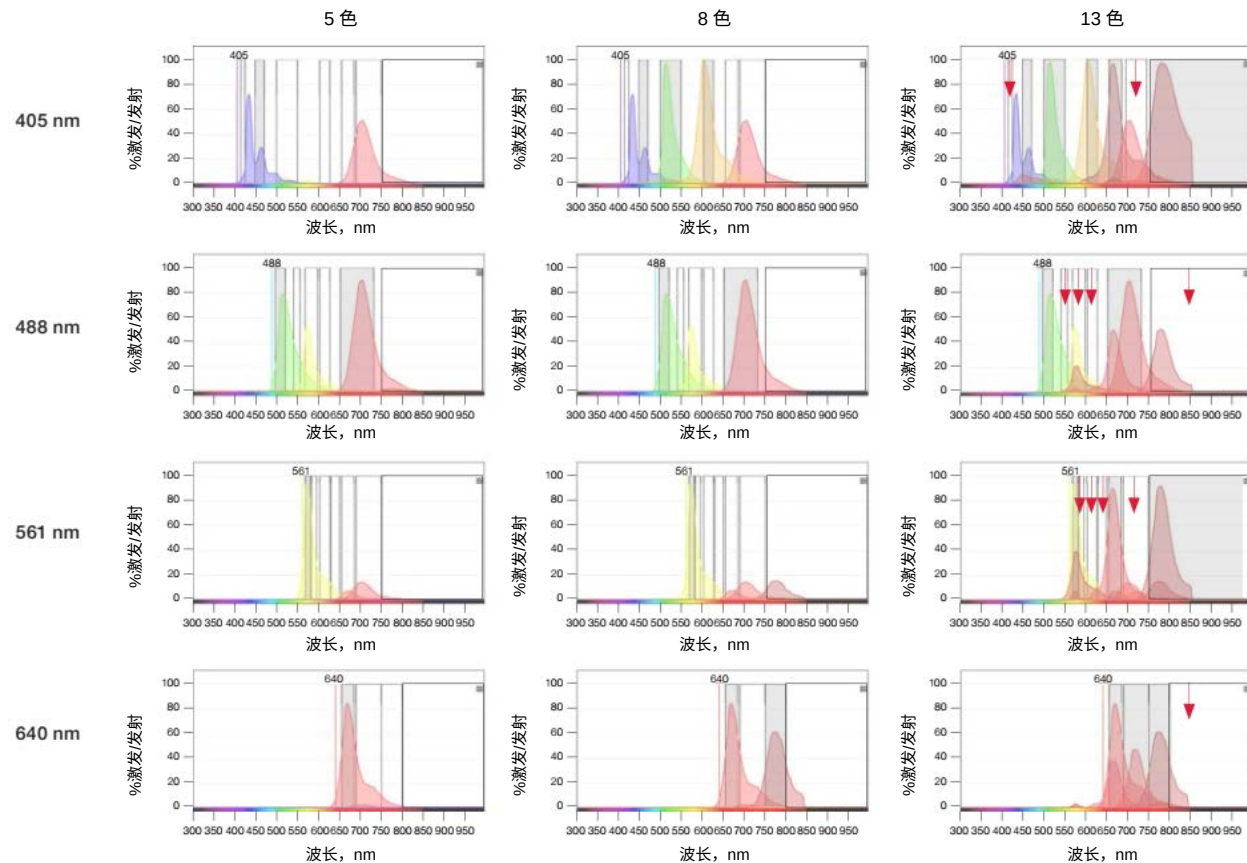


图 34. 使用 Bio-Rad Spectraviewer 避免光谱重叠。在构建更大的组合时(例如,从 5 色组合增加到 13 色组合),Bio-Rad Spectraviewer 可以帮助判断未使用且对其他荧光染料影响很小的激光器和滤光片,最大限度地减少补偿和扩散。灰色框表示组合中使用的通道,红色箭头表示 13 色组合中剩余的空通道。使用四激光(405、488、561 和 640 nm) ZE5 流式细胞分析仪配置的 Bio-Rad Spectraviewer 生成的图像。

流式细胞仪的原理	
荧光原理	荧光染料特性 不同的荧光染料具有不同的亮度以及最大激发和发射光,所有这些都需要与细胞仪中的光学器件相匹配。在构建多色方案时,必须了解染料的亮度,并注意溢出和交叉激光激发。例如, PE 可以由 488 nm 激光和 561 nm 激光激发。除了荧光染料的相对亮度外,它们的扩散量也很重要。通常,较亮的荧光染料扩散量更大,这在更长的波长下更明显。尽管串联染料的设计在整个激光器上具有更大的灵活性,增加了斯托克斯位移并提高了仪器使用更多通道能力,但仍有一些需要谨慎对待和留意的情况。由于 FRET 效率低下,您需要考虑可能的供体荧光染料发射。例如,对于 PE 串联染料,在 578 nm 处可能会有一些发射。还应考虑受体的激发和发射。例如,串联 PE-Cy5 中的 Cy5 可以被 640 nm 激光激发。小心处理串联染料,因为它们可能会在光和固定作用下分解。另外,由于供体分子上受体染料数量的变化,可能存在批间变异。
数据分析	
流式细胞术中的各种对照	
优化实验	抗原密度 尽管在流式细胞术中通常优选高亮度染料,但这种染料并非没有缺陷。在选择荧光染料时,相对抗原密度也很重要。最好将高亮度染料(如 PE)与低表达的标记物相匹配,将较暗的染料(如 Pacific Blue)与高表达的标记物相匹配。高亮度染料的扩散将掩盖附近通道中的低水平荧光。拥有高亮度染料和丰富的抗原将在相邻通道中产生更多的溢出,可能会掩盖其他标记物进入该通道的任何真实信号。
多色组合方案构建	标记物表达模式 减少溢出和扩散影响的一种常见方法是根据抗原的表达模式仔细选择荧光染料。可以通过将溢出水平较高的染料放置在互斥标记物上来实现这一点。例如,分别在 T 细胞和 B 细胞上发现 CD3 和 CD19,但 CD3 和 CD19 从未同时出现在这两种细胞上。溢出的影响可以很容易地得到补偿,因为不应出现双阳性细胞,否则表明存在实验问题。相反,对于存在共表达的标记物(例如,在细胞亚群内或在未知表达水平的情况下),或者表达模式未划分为明确的阳性或阴性群体(连续)的抗原,例如细胞激活后表达的抗原,应选择溢出最少的染料。
常见应用和新技术	
通用方案	
故障排除	
附录	

最小化溢出效应的另一种方法是使用亲代-后代(parent-descendant)规则。根据该规则,溢出无关紧要,因为无论如何亲代都表达了标记物,并且相对量可能并不重要。例如, CD4 荧光溢出到 T 细胞中的 CD3 通道中可以接受,因为无论如何,所有 T 细胞都会表达 CD3。

排除通道

顾名思义,排除通道(Dump Channels)通过将样本中非目的细胞亚群放置在同一个通道中,在分析时将其忽略。这在分析造血干细胞等稀有细胞时特别有用。通过用一种荧光染料标记它们来排除所有不需要进行分析的细胞。通常,最简单的方法是将生物素化的一抗和链霉亲和素二抗用于排除通道。为了方便起见,也可以在该通道中加入活性染料,因为阴性细胞是活细胞。如果去除不需要的细胞,由这些细胞引起的任何不需要的结合或荧光溢出和扩散也将被移除。

抗体滴定

在构建多色组合方案时,另一个重要的考虑因素是抗体的滴定(Antibody Titration)。如果抗体浓度过高,过量抗体将以低亲和力结合阴性细胞并产生影响数据分辨率的背景,也可能导致假阳性效应。如果抗体浓度过低,则可能导致染色不够理想。因此,确定特定样本所需的抗体量非常重要。如果使用同型对照,请确保使用时与一抗的浓度相同。染色指数(Stain Index)可作为指导来确定最佳抗体浓度(图 35)。

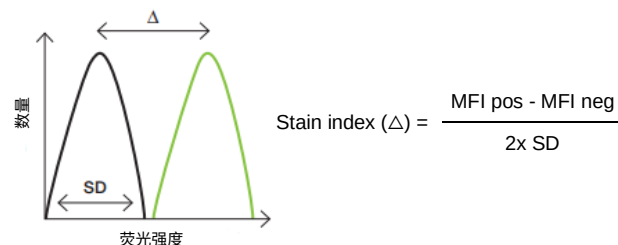


图 35. 染色指数。染色指数为阳性群体(绿色)与阴性群体(黑色) MFI 的差值再除以阴性群体标准差的两倍。MFI, 平均荧光强度; SD, 标准差。

滴定需要具有相同细胞数，相同体积的样品，但样品之间需要连续稀释抗体。如果推荐使用 5 μL 抗体，则 2.5 μL 、1.25 μL 、0.6125 μL 等两倍稀释液是合适的。应该使用染色指数最高的抗体稀释度。图 36 中绿色框中的点表示在最小背景量下产生最高的特异性染色的抗体用量。

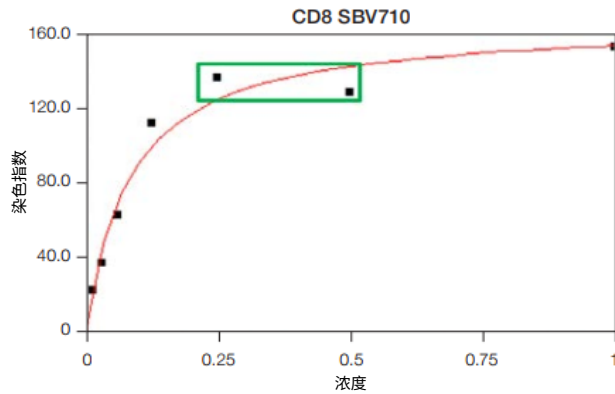


图 36. 抗体滴定。绘制每种抗体浓度的染色指数图将有助于滴定用于实验的最佳抗体量。SBV, StarBright Violet。

多色方案构建工具

一些有用的工具可以支持多色方案设计。Spectraviewers (图 34) 有助于您确定每种染料的激发和发射以及溢出量。相对亮度表为您提供有关将靶标与荧光染料配对的信息，标记物表达数据有助于确定细胞表达模式。

线上方案构建程序也有助于多色方案中配色的设计。它们有助于选择所用仪器、确定抗原密度、挑选正确的荧光标记抗体，并建立一个将这些因素考虑在内的组合。请访问 bio-rad-antibodies.com/flow 获取这些资源。

该网站还发布了优化的多色免疫荧光组合 (OMIP) 的示例，这些示例可以帮助您进行方案设计，并且这些案例在设计新方案时通常是一个很好的参考，因为显示了配色方案和圈门策略。

最后，请记住，由于染料、抗体和流式细胞分析仪的可用性以及您正在使用的细胞类型，配色方案有时必须做出妥协。可能必须经过几次的优化，但是遵循这些规则将减少方案修改的次数，从而减少所需的时间和精力。

常规流式细胞术多色组合方案示例

本节概述了在 ZE5 流式细胞分析仪上获得的 18 色组合的示例，包括实验设计和优化步骤。

- 样品制备** - 将外周血采集至肝素抗凝管中，染色前裂解红细胞。
- 仪器** - 该组合是在五种激光 ZE5 流式细胞分析仪上检测的，该分析仪能够检测 27 种不同的荧光参数。
- 荧光染料分离** - 组合中使用的荧光染料如图 37 所示。由于总共有 18 种染料 (表 7)，因此不可能避免光谱重叠，但是使用了所有五种激光来最大程度地减少这种重叠。
- 抗原密度和标记物表达模式** - 每种标记物的染料选择取决于亮度、溢出、抗原密度和表达模式。藻红蛋白-Alexa Fluor 647 (PE-A657) 标记 CD45 上，因为其大量溢出多个通道中，但是由于 CD45 在所有白细胞上表达，并且预期在每个细胞上都存在，因此带来的问题较少。StarBright UltraViolet 575 (SBUV575) 染料已溢出到 StarBright UltraViolet 605 (SBUV605) 染料中，因此将它们都置于互斥的标记物上。将 StarBright Violet 440 (SBV440) 染料置于低密度标记物 CD25 上，因为它对其他染料的干扰最小。

表 7. 组合中使用的抗体。仅使用小鼠抗人抗体。

靶标	荧光染料	靶标	荧光染料
CD3	SBUV400	CD14	SBV790
CD4	SBUV510	CD57	FITC
CD28	SBUV575	CD10	SBB700
CD19	SBUV605	CD20	PE
CD25	SBV440	CD45	PE-A647
CD45RA	SBV515	CD38	PE-A750
CD45RO	SBV610	CD127	A647
CD27	SBV670	CD16	A700
CD8	SBV710	活细胞/死细胞	VivaFix 583/603

Axxx, Alexa Fluor; FITC, 异硫氰酸荧光素; PE, 藻红蛋白; SBB, StarBright Blue; SBV, StarBright Violet; SBUV, StarBright UltraViolet。

- 排除通道和抗体滴定** - 此组合中不包括排除通道，因为我们需要检测所有细胞群。但是，在构建 18 色组合之前，需将所有抗体滴定以优化染色。

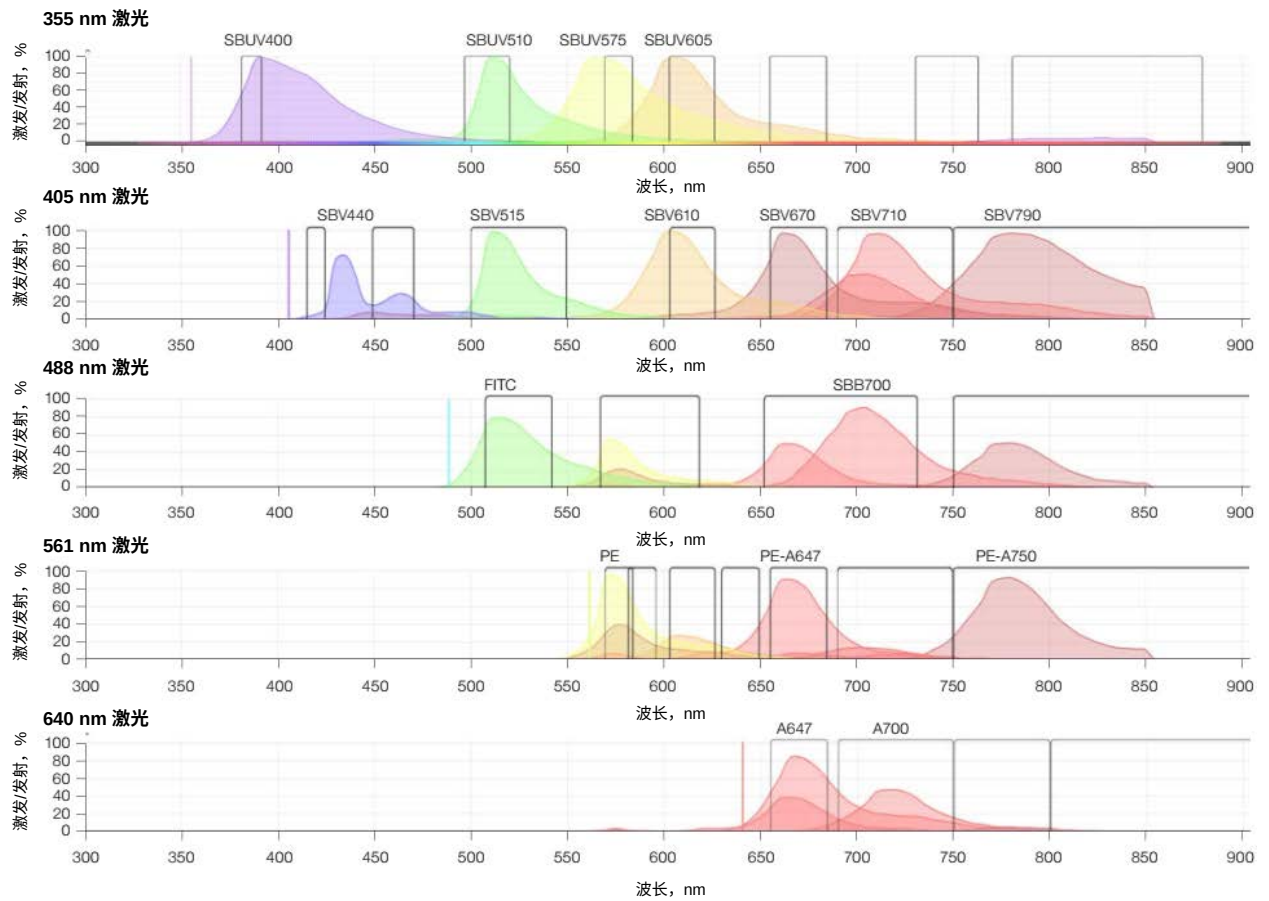


图 37. 组合中使用的所有荧光染料的光谱图。使用配置五种激光的 ZE5 流式细胞分析仪配获取光谱图。Axxx, Alexa Fluor; FITC, 异硫氰酸荧光素; PE, 藻红蛋白; SBB, StarBright Blue; SBV, StarBright Violet; SBUV, StarBright UltraViolet。

6. **染色** - 红细胞裂解后清洗细胞，染色前用 10% 人血清封闭。在含有 1% BSA 的 PBS 溶液中冰上孵育半小时。染色后，在上机前将细胞洗涤 3 次。没有进行细胞内染色。
7. **对照** - 未染色对照用于仪器设置，单染对照用于补偿。由于低水平染色或阳性和阴性信号不足，因此用补偿微球代替细胞与抗体进行标记。65°C 下加热 10 分钟的细胞用作活细胞/死细胞补偿对照。组合中包含活性染料，以从分析中排除死细胞。还运行了 FMO 对照以确认门控策略（数据未显示）。由于我们没有与任何其他样本进行比较，因此不需要实验对照。
8. **样品采集** - 立即采集样品，未固定。为了确保鉴定出细分的细胞亚群，收集了 600,000 个细胞。
9. **数据分析** - 见图 38-41。首先将死细胞和粘连体排除在分析之外。通过 FSC 和 SSC 特征鉴定淋巴细胞、单核细胞和粒细胞。进行逻辑圈门，基于标记物表达鉴定特定群体。可以看到样本中存在的细胞亚群和处于激活状态的 T 和 B 淋巴细胞、单核细胞和粒细胞谱系。此外，还使用了降维分析以创建 t 分布随机近邻嵌入 (tSNE) 图。这将具有相似染色的细胞聚集在一起，从而可以鉴定具有相似特性的“细胞岛”。tSNE 图示例如图 42 所示。

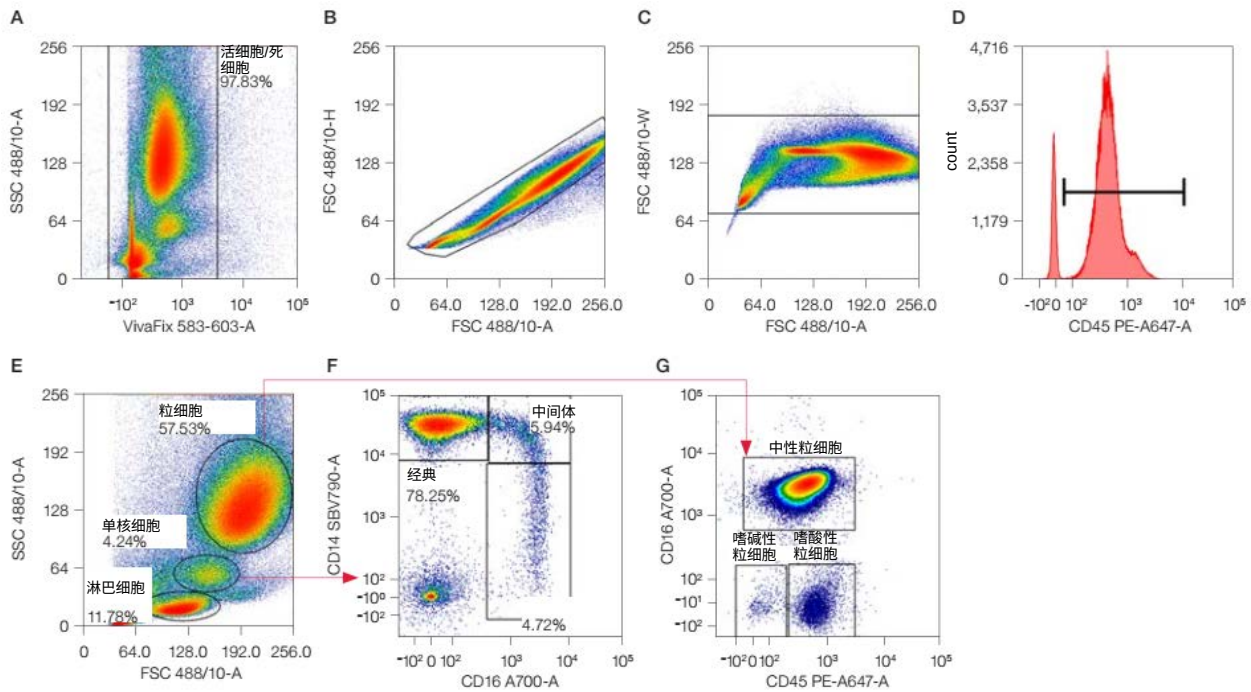


图 38. 18 色常规流式细胞术组合。去除死细胞和粘连体后，根据其 CD45 表达以及前向和侧向角散射光将细胞鉴定为淋巴细胞、单核细胞或粒细胞。通过 CD14 和 CD16 表达确定单核细胞和粒细胞亚群。淋巴细胞亚群见图 39-41。Axxx, Alexa Fluor; FSC, 前向角散射光; PE, 藻红蛋白; SBV, StarBright Violet; SSC, 侧向角散射光。

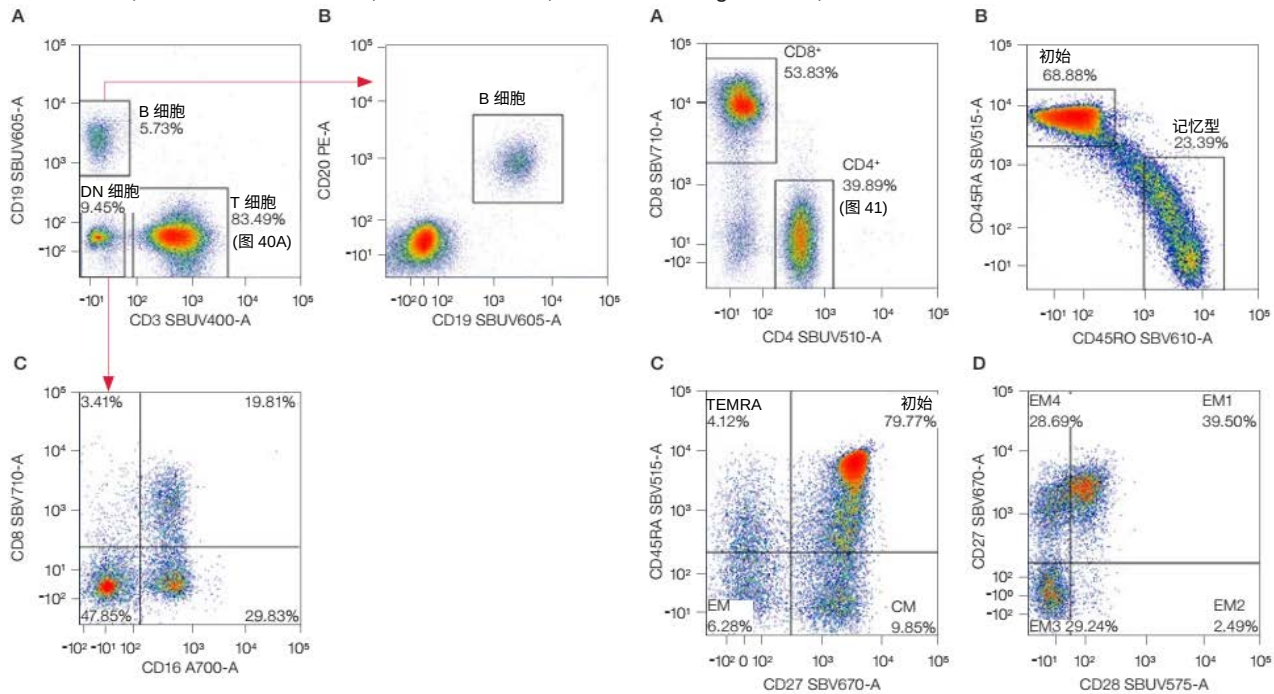


图 39. 18 色常规流式细胞术组合。分别基于 CD3⁺ (图 39A)、CD19⁺CD20⁺ (B) 和 CD3⁺CD19⁺ (C) 在淋巴细胞门 (图 38E) 内鉴定 T、B 和 NK 细胞亚群 (A)。NK 细胞群中的 CD8 和 CD16 表达证实存在 NK 细胞。Axxx, Alexa Fluor; DN, 双阴性; PE, 藻红蛋白; SBUV, StarBright UltraViolet; SBV, StarBright Violet。

图 40. 18 色常规流式细胞术组合。在 CD3⁺ 群体中 (图 39A), CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞 (A) 可根据 CD45RA、CD45RO 和 CD27 表达进一步分为不同亚群 (B-D)。此外，可以基于 CD27 和 CD28 表达将 EM 群体 (C) 分为 EM1-4 群体 (D)。CM, 中央记忆型; EM, 效应记忆型; SBUV, StarBright UltraViolet; SBV, StarBright Violet; TEMRA, CD45RA⁺ 效应记忆型 T 细胞。

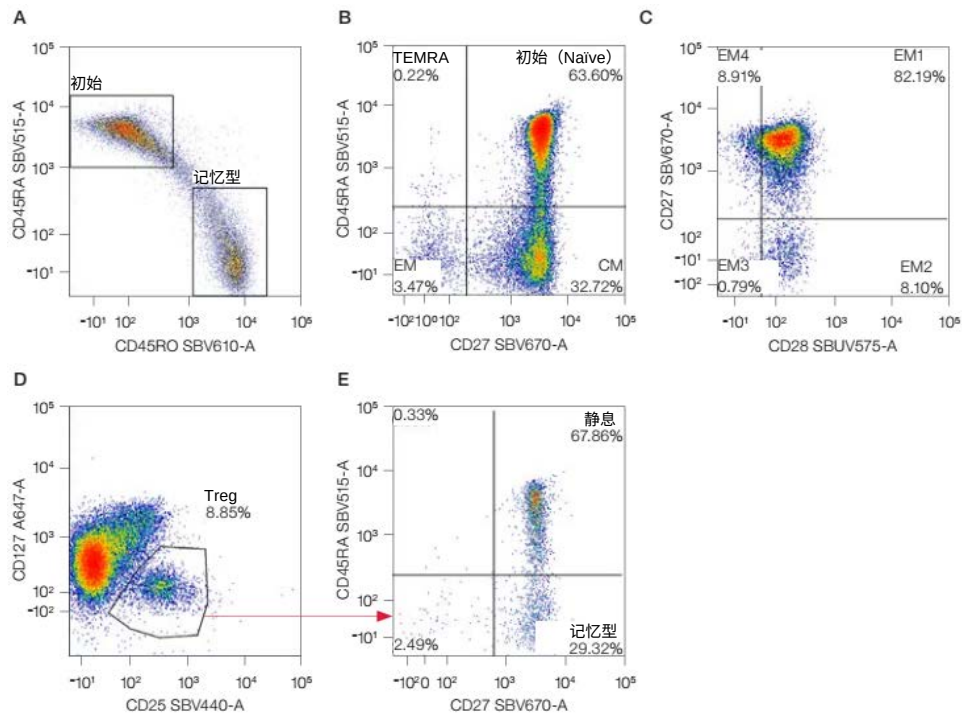


图 41.18 色常规流式细胞术组合。在 CD3⁺细胞群中 (图 39A), CD4⁺辅助性 T 细胞 (图 40A) 可根据 CD45RA、CD45RO 和 CD27 表达进一步分为不同的亚群 (A-B)。此外,可以根据 CD27 和 CD28 表达 (C) 将 EM 群体分为 EM1-4 群体。可以通过 CD127^{lo}CD25⁺表达 (D) 鉴定调节型 T 细胞,并根据 CD45RA 和 CD27 表达 (E) 进一步分为静息和记忆型 Treg 细胞。Axxx, Alexa Fluor; CM, 中央记忆型; EM, 效应记忆型; SBUV, StarBright UltraViolet; SBV, StarBright Violet; TEMRA, CD45RA⁺效应记忆型 T 细胞; Treg, 调节型 T 细胞。

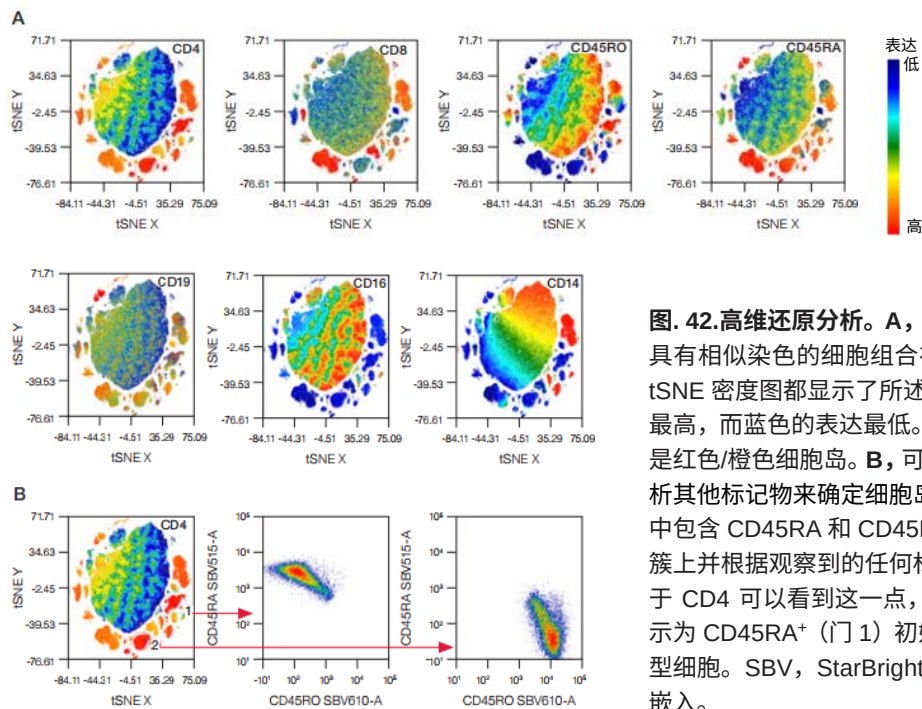


图 42.高维还原分析。A, 18 色组合可视化 tSNE 图, 将具有相似染色的细胞组合在一起成细胞簇或细胞岛。每个 tSNE 密度图都显示了所述标记物的相对表达, 红色的表达最高, 而蓝色的表达最低。T 细胞、B 细胞和髓系可以看作是红色/橙色细胞岛。B, 可以通过在细胞岛上进行设门并分析其他标记物来确定细胞岛的进一步表征。例如, 由于组合中包含 CD45RA 和 CD45RO, 因此可以通过将门置于红色簇上并根据观察到的任何标记物的表达来确定激活状态。对于 CD4 可以看到这一点, 其中两个单独的 CD4⁺细胞岛显示为 CD45RA⁺ (门 1) 初始细胞或 CD45RO⁺ (门 2) 记忆型细胞。SBV, StarBright Violet; t-SNE, t 分布随机邻近嵌入。

全光谱流式细胞术多色组合方案构建

在全光谱流式细胞术中不存在使用带通滤光片和二向色镜相结合分离荧光信号的限制。光谱相似的荧光染料可以有效地用于组合；例如，APC 和 Alexa Fluor 647 在光谱流式中可以分开。因此可以开发出超过 40 种荧光染料的更大组合。但是，每种荧光染料必须具有唯一的光谱特征和小于 0.98 的相似性指数（其中 1 代表相同的染料）。

多色方案设计规则仍适用于全光谱流式细胞术，并且还有一些其他注意事项：

- 串联染料不应用于排除通道，因为光谱特征可能会有所不同
- 单一染色对照品应具有与实验样品相同的光谱特征
- 不建议使用先前实验的预加载光谱
- 某些缓冲液的使用会影响某些微球的特征

可以在 Ferrer-Font 等人（2020）的文献中找到更多信息。

全光谱多色组合方案示例

1. 样品制备 - 将外周血采集至肝素抗凝管中，并在染色前裂解红细胞。
2. 仪器 - 该组合是在配备 58 个检测器的四激光 Aurora 光谱分析仪（Cytek Biosciences）上采集的。
3. 荧光染料分离 - 由于总共有 27 种染料（表 8），因此不可能避免光谱重叠，但是选择了确保所选荧光染料的光谱图具有唯一性的组合，且相似性得分低于 0.98。

4. 抗原密度和标记物表达模式 - 每种标记物的染料选择取决于染料亮度、溢出、抗原密度和表达模式，旨在最大程度地减少扩散。值得注意的是，由于溢出，CD3 和 CD19 被放置在 StarBright UltraViolet 400（SBUV400）染料和 StarBright UltraViolet 445（SBUV445）染料上，由于染料之间的相似性，IgD 和 CD2 被放置在 Brilliant Violet 510（BV510）和 StarBright Violet 515（SBV515）染料上。通过使用 StarBright Violet 790（SBV790）染料和 PE 分离 CD14 和 CD16 以避免溢出。低表达量的 CD25 搭配 StarBright Violet 610（SBV610）染料（一种明亮的荧光染料）。与常规组合一样，将目标群体，例如 CD45RA/CD27 和 CD27/CD28 阳性 T 细胞（对于每种标记物可能都是阳性和阴性）置于具有最小溢出的两种染料上。光谱流式细胞术能够以常规流式细胞术无法实现的配置组合现有染料。StarBright 染料可实现新型组合。

新型组合包括：

- StarBright Blue 700（SBB700）染料/PerCP-Cy5.5
- Pacific Blue/Brilliant Violet 421（BV421）/ StarBright Violet 440（SBV440）染料
- StarBright Violet 475（SBV475）染料/BV510/SBV515 染料
- Brilliant Violet 605（BV605）/SBV610 染料
- StarBright Violet 710（SBV710）染料/ Brilliant Violet 711（BV711）

表 8. 组合中使用的抗体。

靶标	荧光染料	靶标	荧光染料	靶标	荧光染料
CD3	SBUV400	CD19	SBUV445	CD4	SBUV510
CD28	SBUV575	HLA DPDQDR	BUV615	CD56	BV421
CD11b	Pacific Blue	CD45	SBV440	CD8	SBV475
IgD	BV510	CD2	SBV515	CD33	SBV570
CD11c	BV605	CD25	SBV610	CD27	SBV670
CD10	SBV710	TCR	BV711	CD14	SBV790
CD57	FITC	CD45RO	SBB700	CD20	PerCP-Cy5.5
CD16	PE	CD38	PE-A750	CD45RA	A700
CD127	A647	CD40	APC-Cy7	活性	活细胞/死细胞 Fixable Blue

Axxx, Alexa Fluor APC, 别藻蓝蛋白；BUV, Brilliant Ultraviolet；BV, Brilliant Violet；FITC, 异硫氰酸荧光素；PE, 藻红蛋白；PerCP, 多甲藻素叶绿素蛋白；SBB, StarBright Blue；SBUV, StarBright UltraViolet；SBV, StarBright Violet

流式细胞仪的原理	5. 排除通道和抗体滴定 - 此组合中不包括排除通道，因为我们需要检测所有细胞群。但是，在构建 27 色组合之前，将所有抗体滴定以优化染色。
荧光原理	6. 染色 - 红细胞裂解后清洗细胞，染色前用 10% 人血清封闭。在 BD Brilliant 染色缓冲液中冰上孵育半小时。染色后，在采集前将细胞洗涤 3 次。没有进行细胞内染色。
数据分析	7. 对照 - 未染色对照用于仪器设置，单染色对照用于补偿。由于低水平染色或阳性和阴性信号不足，一些标记物添加了补偿微球。65°C 下加热 10 分钟的细胞用作活细胞/死细胞补偿对照。组合中包含活性染料，以从分析中排除死细胞。还运行了 FMO 对照以确认门控策略（数据未显示）。由于我们没有与任何其他样品进行比较，因此不需要实验对照。
流式细胞术中的各种对照	8. 样品采集 - 立即采集样品，未固定。为了确保能够鉴定细分的细胞亚群，我们收集了 400,000 个细胞。
优化实验	9. 数据分析 - 见图 43。首先将死细胞和粘连体排除在分析之外。通过 FSC 和 SSC 特征鉴定淋巴细胞、单核细胞和粒细胞。进行逻辑圈门，基于标记物表达鉴定特定群体。可以看到样本中的细胞亚群和处于激活状态的 T 和 B 淋巴细胞、单核细胞和粒细胞谱系。此外，还进行了降维分析，以创建 tSNE 图（图 44）。这将具有相似染色的细胞聚集在一起，从而可以鉴定具有相似特性的“细胞岛”。与使用逻辑圈门相比，通过这种方式可以轻松地可视化多个样品之间的差异，并且可以更容易地鉴定稀有群体。
多色组合方案构建	
常见应用和新技术	
通用方案	
故障排除	
附录	

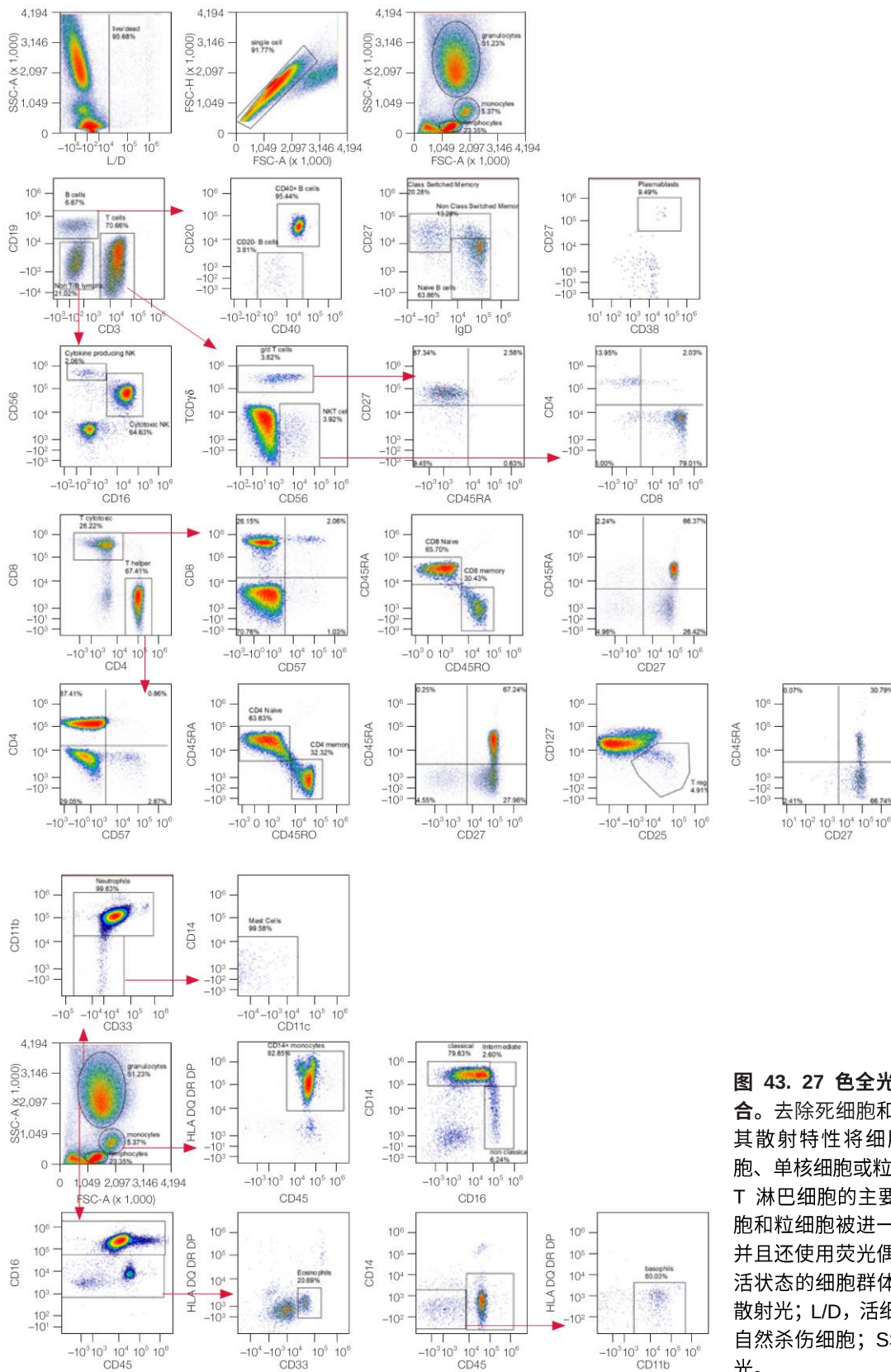


图 43. 27 色全光谱流式细胞术组合。去除死细胞和粘连体后，根据其散射特性将细胞鉴定为淋巴细胞、单核细胞或粒细胞。B、NK 和 T 淋巴细胞的主要谱系以及单核细胞和粒细胞被进一步细分为亚群，并且还使用荧光偶联抗体确定了激活状态的细胞群体。FSC，前向角散射光；L/D，活细胞/死细胞；NK，自然杀伤细胞；SSC，侧向角散射光。

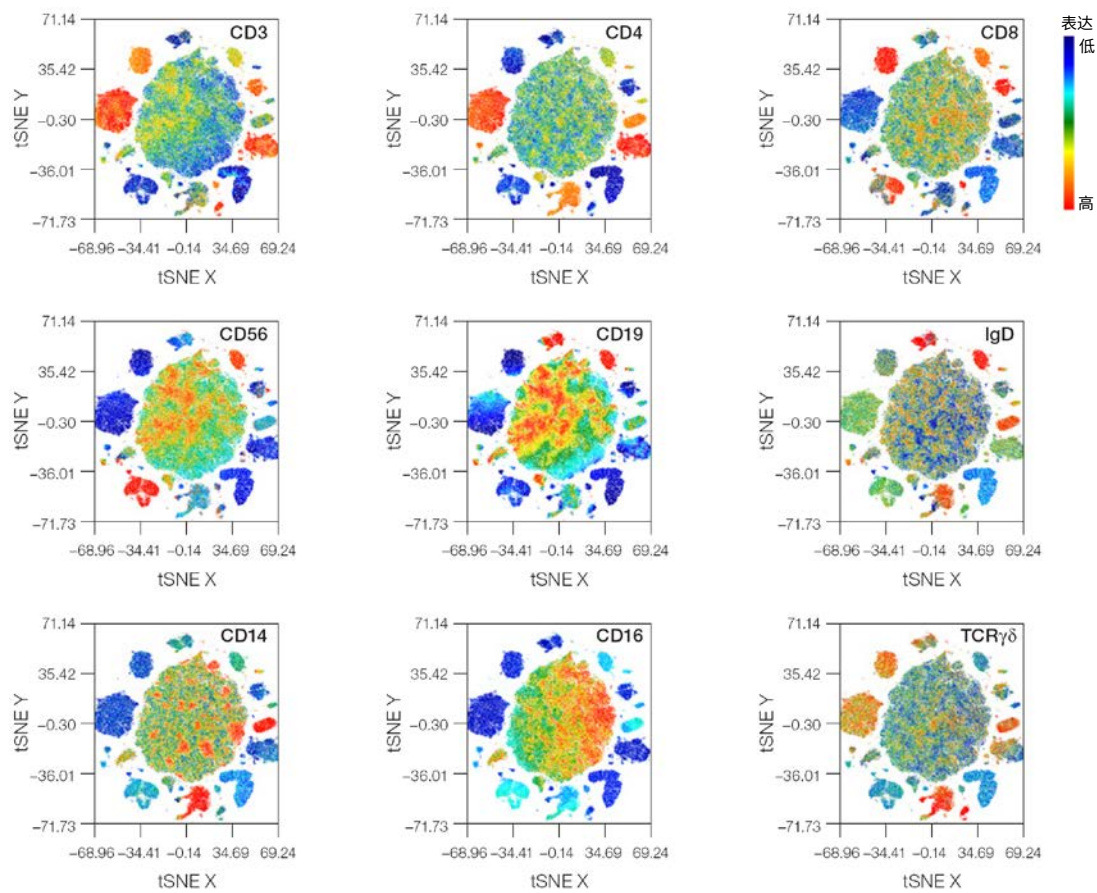


图 44. 高维还原分析。 27 色组合可视化 t-SNE 图，将具有相似染色的细胞聚集在一起成细胞簇或细胞岛。在图中，T 细胞、B 细胞、NK 和髓系谱系可以看作是单独的细胞岛。可以对这些进行门控和研究，以分析其他特征，例如使用 CD45RA、CD45RO、CD27 和 CD28 的激活状态。NK，自然杀伤细胞；tSNE，T 分布随机邻近嵌入。



7. 常见应用和新技术

到目前为止，在本指南中，我们已经介绍了流式细胞术涉及哪些内容以及如何构建实验和分析数据，但是流式细胞术的常见用途是什么？本章提供了流式细胞术应用的示例，例如免疫分型和细胞功能分析（如调节型细胞死亡和细胞增殖）。您将了解流式细胞术的新颖创新，例如自动化的集成。

免疫分型

流式细胞术通常用于鉴定细胞标记物，特别是针对免疫系统内的细胞亚群。该应用称为免疫分型，并且需鉴定的标记物越来越多，因此驱动了流式细胞术中多色检测的发展。

免疫分型可以仅涉及通过单个标记物鉴定细胞。更复杂的免疫分型包括使用多种标记物鉴定细胞，包括归巢特性、激活状态和细胞因子释放，所有这些都在一个方案中进行。因此，实验方案通常是表面染色和细胞内染色的组合。除基础研究外，免疫分型在临床应用中常规用于诊断疾病或监测和评价残留病灶。使用表面染色的免疫分型的简单示例如图 45 所示，其中使用九色染色方案鉴定人外周血中的主要细胞亚群。在更复杂的组合中的其他信息可能包括这些谱系的初始细胞、记忆型细胞或激活状态（使用例如 CD45RA、CD45RO、CD27、CD57、CD62L 和 CD69 的标记物），或其细胞因子谱（使用例如 IFN- γ 、IL-2、IL-17 和 IL-9）。

很容易看出更大的检测方案可以快速构建。实际上，在常规的流式细胞术中，检测方案接近 30 种颜色。在全光谱流式细胞术中，检测方案已超过 40 种颜色，并将随着新型荧光染料（包括 StarBright 染料）的出现而扩展。有关构建多色方案的最佳实践的更多信息，请参阅第 6 章。

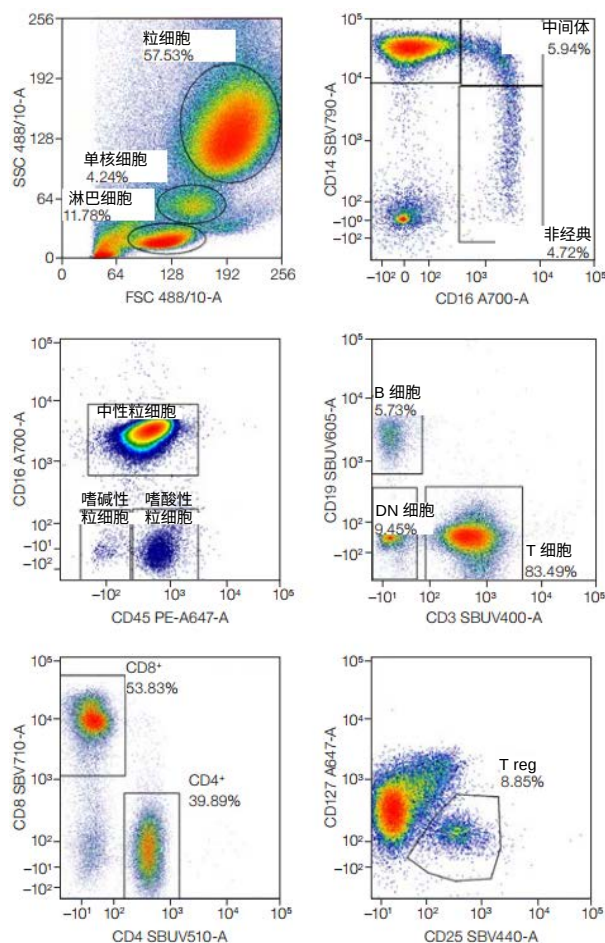


图 45. 全血免疫分型。使用 CD3、CD4、CD8、CD14、CD16、CD19、CD25、CD45 和 CD127 进行简单的九色免疫分型，以鉴定 T 细胞、B 细胞、粒细胞和单核细胞谱系及亚群。Axxx, Alexa Fluor；FSC，前角散射；PE，藻红蛋白；SBUV, StarBright UltraViolet；SBV, StarBright Violet；SSC，侧角散射；Treg，调节型 T 细胞。

细胞分选

流式细胞术的另一个常见用途是基于散射和/或荧光特性的细胞分选，散射和/或荧光特性来自荧光蛋白的表达或来自被荧光标记的抗体染色的细胞。目前已出现能够一次分离六个群体的仪器，并且许多仪器能够将细胞分选具有共同特征的细胞群体或单个细胞到孔内。此外，除了常规的流式细胞术之外，现在已经推出了全光谱细胞分选仪，从而可以支持使用新型荧光染料组合、去除自发荧光并更容易区分荧光蛋白。单细胞或细胞群的分选可以实现纯化和富集，用于其他下游应用，例如 PCR 或 RNA 测序（RNA-Seq），或分选细胞进行下游培养。细胞分选在免疫学研究、生理学研究以及蛋白质和细胞工程等方面也有应用。

调节型细胞死亡

调节型细胞死亡是许多机制的总称，通过这些机制，细胞可以经历非坏死性的程序性死亡。其可以响应许多过程，例如发育、组织稳态和宿主防御。调节性细胞死亡的一些过程可以通过流式细胞术测量，包括细胞凋亡、自噬和焦亡。

细胞凋亡是一个高度调节的过程，在胚胎发生、维持生物体大小和清除受损细胞中起着重要作用。许多由异常细胞凋亡引起的疾病都强调了细胞凋亡对人类健康的重要性。细胞凋亡失调与各种癌症、神经和心血管疾病以及自身免疫性疾病有关。

可通过流式细胞术测量的细胞凋亡的最常见特征之一是磷脂酰丝氨酸（PS）外翻。磷脂酰丝氨酸是一种在健康细胞内膜中发现的磷脂，在细胞凋亡过程中会增加。膜联蛋白 V（Annexin V）与磷脂酰丝氨酸结合，因此用荧光团标记的膜联蛋白 V 可以评价细胞凋亡，通常与活性染料（如 PI）联合使用，用以区分凋亡细胞和坏死细胞。健康细胞对两种标记物均呈阴性，凋亡细胞对膜联蛋白 V 呈阳性，而坏死细胞对两种标记物均呈阳性。当用星形孢菌素处理 Jurkat T 细胞时，细胞发生凋亡，随后发生坏死（图 46）。

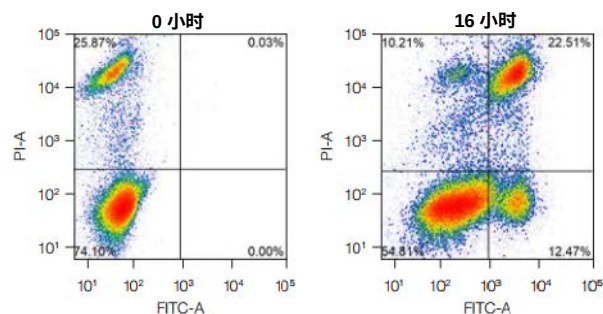


图 46. 膜联蛋白 V 染色以测量细胞凋亡。 Jurkat 细胞用 1 μ M 星形孢菌素处理 0 小时和 6 小时以诱导细胞凋亡。然后将细胞用膜联蛋白 V FITC 和 RaddiDrop 碘化丙啶染色。在右下象限可以看到对膜联蛋白 V 阳性的凋亡细胞，在右上象限可以看到对膜联蛋白和 PI 阳性的坏死细胞。健康细胞对两种染色均为阴性。FITC，异硫氰酸荧光素；PI，碘化丙啶。

由于 PS 外翻是一个动态的、可逆的过程，直到线粒体外膜通透化（MOMP）后细胞发生凋亡，因此膜联蛋白 V 结合物无法区分早期凋亡和晚期凋亡。活性和凋亡的极性敏感指示物（pSIVA）探针是与 PS 可逆结合的生物传感器，因此随着 PS 从外膜翻转到内膜而打开和关闭。这使得可以轻松地对实时比较不同实验处理下的凋亡率的差异。

DNA 片段化，发生在凋亡后期，也可以通过流式细胞术使用 sub-G1 测定法进行测量。凋亡过程中产生的约 180 bp 的小 DNA 片段从细胞中泄漏出来，从而降低了凋亡细胞的总 DNA 含量。通过用 PI 染色 DNA，可以在 PI 直方图的 sub-G1 峰中计数亚二倍体凋亡细胞。用 DNA 标记物染色还可以测量细胞收缩，伴随着 FSC 信号的减弱。

早期凋亡也可以通过电位染料来测量，该电位染料可评价细胞线粒体电位的降低。比如四甲基罗丹明乙酯（TMRE）、四甲基罗丹明甲酯（TMRM）和 JC-1。这些亲脂性染料聚集在非凋亡细胞的线粒体中并发出明亮的荧光。当线粒体丧失膜电位时，染料以单体形式分散到细胞质中，导致荧光减弱或颜色改变。这些染料可以与其他凋亡标记物联合使用，例如荧光标记的半胱天冬酶抑制剂（FLICA），它在半胱天冬酶存在时发出荧光，并与特定半胱天冬酶的抗体结合。半胱天冬酶-1 介导的细胞焦亡也可以使用 FLICA 测定法进行测量（图 47）。

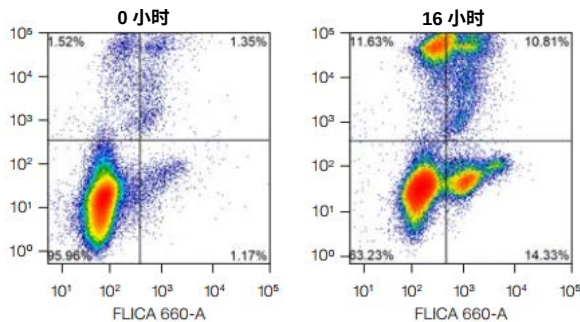


图 47. 半胱天冬酶-1 染色测量细胞焦亡。 Jurkat 细胞用 Pyroptosis 660Caspase-1 试剂盒 (#ICT9158) 染色 2 小时, 然后用 10 μ M 尼日利亚菌素处理 16 小时以诱导细胞焦亡。细胞焦亡可以通过活性半胱天冬酶-1 的增加来证明, 其检测方式为远红 (600 nm) 荧光的增加。在 ZE5 流式细胞分析仪上分析数据。FLICA, 荧光标记的半胱天冬酶抑制剂。

自噬通过降解蛋白质和更新受损细胞器在维持细胞稳态中起关键作用。该过程具有复杂的双重作用, 对细胞存活和死亡均有影响。它对于维持健康细胞至关重要, 但是在某些情况下会发生自噬依赖性细胞死亡 (ADCD)。自噬可能难以检测, 通常需要使用正交技术进行确认。流式细胞术有两种不同的方式对自噬进行测量。第一种方法涉及检测 LC3-I 到 LC3-II 的脂质化以及 LC3-II 从胞质溶胶到自噬体膜的后续移动。第二种方法使用细胞渗透性、脂肪族荧光染料标记自噬体和自溶酶体。信号通常较弱, 尤其是在原代细胞中, 但通过抑制溶酶体蛋白酶 (例如使用巴佛洛霉素) 可增强信号 (图 48)。

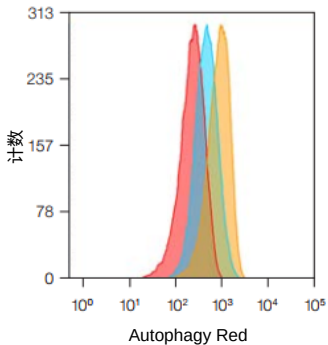


图 48. 用 Autophagy Probe Red 测定 Jurkat 细胞中的自噬诱导。 Jurkat 细胞未经处理 (红色), 或用 0.5 μ M 雷帕霉素处理 18 小时 (蓝色), 或用 0.5 μ M 雷帕霉素处理 18 小时, 然后用 10 nM 巴佛洛霉素 A1 处理 2 小时 (橙色)。

细胞增殖

细胞增殖可以通过流式细胞术使用不同的方法来测量:

- 检测前向角散射和侧向角散射的变化, 指示细胞周期的变化。这是一个简单的方法, 但并不总是最准确的。
- 用增殖标记物的抗体染色 (例如 Ki67、MCM2 和 PCNA)
- 使用 TUNEL 检测。用 BrdU 孵育细胞, BrdU 在细胞周期的 S 期掺入 DNA 中, 可以使用荧光标记的抗 BrdU 抗体检测 BrdU。当与 DNA 染色剂 (包括 PI 或 DAPI) 结合时, 可以确定处于 S 期的细胞的相对比例
- 使用 CFSE 或 Cytotrack 等细胞质染料。将细胞与蛋白结合染料孵育, 随着标记细胞的分裂, 染料浓度减半, 根据后代中荧光水平的降低测量增殖 (图 49)。这些染料无毒, 不需要细胞固定, 并且有多种颜色。这些特征使得联合进行免疫分型成为可能

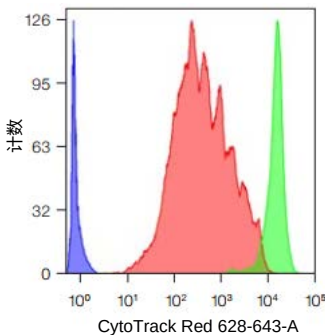


图 49. 使用 CytoTrack 检测试剂盒测量增殖。 用 CytoTrack Red 628/643 细胞增殖检测试剂盒 (#1351205) 对人外周血淋巴细胞染色, 并用植物血凝素 (PHA) 刺激 5 天。随着每次细胞分裂, 增殖细胞染料量会减少。您可以看到受刺激的细胞 (红色), 标记但未刺激的细胞 (绿色) 和未标记的细胞 (蓝色)。在该实验中, 可以看到六个红色峰对应每次细胞分裂。数据是在 ZE5 流式细胞分析仪上获取。

细胞周期

可以使用以化学计量方式结合的 DNA 结合染料确定细胞周期每个阶段内的细胞比例。常见的示例包括 PI、7-AAD、Hoechst 33342 和 DAPI。当使用这种方法时, 处于 G2 期的细胞 (其 DNA 数量是 G1 期细胞的两倍) 会发出两倍亮度的荧光。

为保证染色良好，应将细胞固定在 70% (V/V) 冷乙醇中。但是，这可能会干扰其他染色方案（有关建议，请参见第 8 章）。细胞周期检测因为荧光差异较小，所以通常以荧光线性进行测量，而不像其他大多数流式实验荧光多以对数进行测量。细胞周期检测重要的是要从数据中排除粘连体，并且用低样本流速进行细胞周期的检测从而改善数据。许多流式细胞术软件程序提供了准确估计细胞周期阶段的算法。

信号传导和蛋白磷酸化流式细胞分析技术 (Phosphoflow)

除了表面分子的表达外，人们对细胞活化状态和测量信号级联也很关注。流式细胞术提供了一种快速有效的方法来测量单个细胞中特定时间点的信号传导。使用抗体检测信号分子和蛋白磷酸化 (phosphoflow) 的染色方法可能不同于常见的胞内染色，可能需要特定的实验对照。对于信号传导和蛋白磷酸化，需要快速固定细胞以避免去磷酸化，并且可能需要更强的破膜方法来确保核膜的破膜。与细胞周期染色一样，固定和破膜可能会改变您测量细胞表面指标的能力。可以使用响应钙变化而发出荧光的染料来测量信号。通常，在细胞中加载钙指示剂染料（例如 indo-1），以确定信号传导的本底水平。然后对其进行刺激，荧光的变化表示细胞内钙水平的变化。

小颗粒检测

可以使用流式细胞术研究越来越多的小颗粒。小颗粒能包括血小板，直径通常为 2-3 μm ；细菌，直径为 0.3-5 μm ；细胞外囊泡，可进一步分裂成凋亡小体、微囊泡以及外泌体，其中最小的外泌体直径小至 50 nm。尽管它们不具有外泌体的折射率，但可以使用微球来确定设置仪器以检测小粒子（图 50）。

外泌体主要由细胞骨架蛋白、mRNA、微小 RNA 和肌动蛋白受体组成。它们对于细胞的通讯和调节极其重要，因为它们在细胞之间转运蛋白质和 RNA。它们可以通过前向角散射和侧向角散射来鉴定，同时需要对数轴才能得到充分区分。这些颗粒的检测可能存在问题，因为它们通常小于用于检测它们的光的波长。除其他因素外，光散射信号还取决于颗粒直径，因此很难检测到小于波长的颗粒。

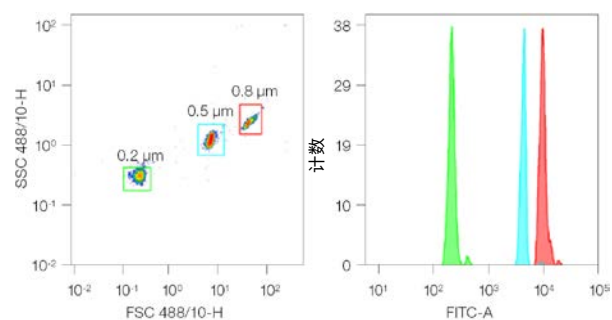


图 50. 小颗粒检测。使用前向角散射和 FITC 作为检测触发通道，在 ZE5 流式细胞分析仪上分离了 0.2 μm 、0.5 μm 和 0.8 μm 的荧光校准微球 (Bangs Labs)。FITC，异硫氰酸荧光素；FSC，前向角散射；SSC，侧向角散射。

为了研究小颗粒，已经开发了诸如 Bio-Rad ZE5 流式细胞分析仪之类的细胞仪，此类细胞仪具有额外的前向散射 PMT 检测器，来自较短波长激光器，并且数据收集的触发条件从 FSC 变为荧光信号或多个荧光标记。增强检测的替代方法包括使用更短波长的光，因为这通常会导致散射增加，以及使用抗体包被的微球以增加被检测颗粒的大小。应注意通过过滤鞘液来降低噪声，因为鞘液可能会掩盖信号，并仔细设置阈值水平，以免切除外泌体的信号。需要注意的是，随着粒子尺寸的减小，抗原可用性也会降低，从而导致灵敏度或分辨率降低。

基因表达和转染

荧光蛋白广泛用于流式细胞术中，用以测定活细胞和固定细胞中的基因表达和转染效率。它们在进行细胞分选实验时尤其有用。由于流式细胞术的高通量，它们可以作为转录因子、启动子活性和细胞表达模式的报告基因，以及 RNAi 和 CRISPR 活性的筛选。荧光蛋白也可以具有光活化特性、光转换性，因此适用于 FRET 实验。最初仅能够使用绿色荧光蛋白 (GFP)，而现在有上百种在各种波长下激发和发射的荧光蛋白，使其非常适合多色流式细胞术。

绝对定量

尽管流式细胞术可以定量细胞表面和细胞中的标记物表达，但它不能提供有关细胞浓度或绝对定量的信息。为了克服这个问题，可以添加荧光微球并计数。

如果将已知浓度的微球添加到您的样品中,则收集的微球数量将与细胞数量成正比。一些细胞仪可以通过测量所采集样品的体积来给出准确的细胞计数,在这种情况下,可以测量每微升的细胞数。

颗粒内化

颗粒、细胞表面标记物和抗原的内化可以通过吞噬作用发生。流式细胞术已被证明是定量荧光标记颗粒吞噬作用的有效方法。当内化或淬灭表面结合的荧光时改变其荧光特性的染料可用于区分表面粒子和内化颗粒。

荧光原位杂交和 RNA 检测

使用流式细胞术的荧光原位杂交 (FISH) 在 20 世纪 90 年代末首次被证明可以确定端粒长度。使用荧光核酸探针突出显示特定的重复序列,然后使用特定的软件测量荧光。从那时起,已经开发了可以定量 mRNA 水平的 RNA 表达方案。FISH 是一种功能强大的工具,因为它可以与表面染色联合使用以鉴定特定的细胞和亚群,而定量逆转录 PCR (RT-qPCR) 尽管灵敏度很高,但只能提供一种细胞群体的信息。

流式细胞术的创新

通过降低仪器设置的复杂性、真正实现自动化、提高灵敏度和提供对用户更为友好的软件,流式细胞术已变得更易于研究人员使用。研究人员现在可以运行和分析大型实验,而无需专门培训。

这些创新包括:

- 人工智能使多参数分析和下游处理更加可靠,消除了偏差,消除了手动圈门中的错误
- 仪器变得更小但功能更强大,具有更多种激光和滤光片
- 成像流式细胞术,当细胞通过激光时,使用 CCD 相机捕获细胞的图像。可以同时捕获多个光谱不同的图像,从而可以制备复合物并确定抗原位置
- StarBright 染料,这是一种高质量的荧光染料,具有独特的光谱,可以构建更大的方案

质谱流式细胞术 (也称为飞行时间流式细胞术[cytometry by time of flight , CyTOF]) 是流式细胞术的另一项创新。该技术使用与金属同位素结合的抗体标记样品,然后可以通过分析每个同位素通过电场到达检测器所花费的时间来测量样品。

质谱流式能够检测 130 多个通道中的信号,从而显著提高了多色检测能力;但是,由于目前不能使用所有通道,因此检测方案大小仅限于 50 个标记物左右。质谱流式细胞术最近经历了实质性的创新,包括成像质谱流式细胞术的发展。利用这种技术,可以对薄的组织切片进行染色和分析。聚焦在样品上的 1 μm 激光束收集用金属标记的抗体,并对其进行分析引导,以使用 CyTOF 技术进行检测。使用该系统,可以同时检测和解析多达 37 个标记物。

与常规流式细胞术相比,质谱流式细胞术可以同时鉴定更多的标记物,而成像质谱流式细胞术可以比显微镜检测更多的标记物。但是也存在一些缺点。同位素越大,则通过电场的时间越长,样品采集速度也会大幅减慢。此外,需要专门的软件,并且分析可能会存在问题且耗时。成像质谱流式细胞术的成像分辨率低于显微镜,因此无法量化精细的细胞细节。

与成像质谱细胞术类似的技术是多路离子束成像 (MIBI) 技术。这也使用标记有单同位素金属标签的抗体来可视化组织切片,但不会消融。它可以同时可视化 40 多个标记,并且能够解析高达 250 nm 的细胞结构。

流式细胞仪的原理

荧光原理

数据分析

流式细胞术中的各种对照

优化实验

多色组合方案构建

常见应用和新技术

通用方案

故障排除

附录



8. 通用方案

本章将为您提供可靠方案，以帮助您直接开始您的实验。

样品制备

单细胞需以 10^5 - 10^7 个细胞/ml 的密度悬浮在 PBS 中，以防止流式细胞仪的狭窄孔及其管路堵塞。细胞浓度还影响流式细胞术分选的速度（通常为 2,000-20,000 个细胞/秒）。较高的分选速度可导致较低的产量或回收率。

流式细胞术最直接的样品包括来自培养物、水生微生物、细菌和酵母的非贴壁细胞。甚至全血样本也易于使用 - 红细胞通常通过简单的裂解步骤去除。然后可以通过其 FSC 和 SSC 特征快速鉴定淋巴细胞、粒细胞和单核细胞。

然而，您可能希望分析来自实体组织的细胞，例如，来自肝脏或肿瘤。为了产生单细胞悬液，须将固体组织解离。这可以通过机械或酶解方式完成。优化通过酶解或机械解离来分离正在研究的表位通常是一个不断试错的过程。机械解离适用于松散结合的结构，例如贴壁培养细胞、骨髓和淋巴组织。它包括将切碎的组织悬浮液通过细针数次，然后根据需要进行研磨和超声处理。

酶用于破坏蛋白质间相互作用和将细胞保持在一起的细胞外基质。此外，从脾脏释放某些细胞（例如巨噬细胞）和从淋巴结释放滤泡树突状细胞酶是所必需的。酶的作用取决于 pH、温度和辅酶因子等因素，因此在选择酶时必须谨慎。例如，胃蛋白酶在 pH 1.5 和 2.5 之间效果最佳，但是这些酸性条件无法及时中和时会破坏细胞，并且目标细胞表面抗原可能会丢失。作为螯合剂，EDTA 和乙二醇-双（2-氨基乙基醚）-N, N, N', N'-四乙酸（EGTA）可以去除负责维持细胞功能和完整性的二价阳离子，但它们的存在可能会抑制某些酶。例如，胶原酶需要 Ca^{2+} 才能产生活性。

要通过流式细胞术研究细胞内组分（如细胞因子），细胞质膜需要破膜，染料或抗体分子才能通过，同时保持细胞的整体完整性。低浓度（最高 0.1%）的非离子型变性剂（如皂苷）可适用。总之，样品制备方法将取决于起始材料和表位的性质。虽然这里不可能描述每种方法，但本章提供了一些标准方案。

流式细胞术细胞制备方案

在这里，我们描述了用于悬浮和贴壁细胞以及源自特定来源的细胞的样本制备方法。此外我们还提供了用于制备人外周血单核细胞、腹膜巨噬细胞、骨髓、胸腺和脾细胞的方案。所有接触人体血液或细胞的容器均应视为危险废物，并应适当处置。

注：这些方法提供的通用操作应始终与供应商提供的产品和批次特定信息结合使用。

液氮保存的组织培养细胞的制备

该方法提供了用于储存在液氮中的组织培养细胞的通用操作。

试剂

- 牛血清白蛋白（BSA）
- 10x 磷酸盐缓冲液（PBS；#BUF036A）

方法

1. 制备 1% BSA (w/v) 的 1x PBS (PBS/BSA) 溶液。
2. 小心地从液氮储存器中取出细胞。
3. 在 37°C 水浴中快速解冻细胞。
4. 用冷 PBS/BSA 缓冲液重悬细胞，并将其转移至 15 ml 锥形离心管中。
5. 4°C 下以 300-400 x g 离心 5 分钟。

6. 弃去上清液, 用 4°C 低温保存的 PBS/BSA 重悬沉淀至最低浓度为 1×10^7 个细胞/mL。

注: 通过使细胞在培养基中过夜恢复, 可以获得更高的活性。

悬浮液中组织培养细胞的制备

该方法提供了用于悬浮组织培养细胞的通用操作。

试剂

- BSA
- 10x PBS

方法

1. 制备含 1% BSA (w/v) 的 1x PBS (PBS/BSA) 溶液。
2. 将组织培养瓶中的细胞倒入 15 ml 锥形离心管中。
3. 室温下以 300-400 x g 离心 5 分钟。
4. 弃去上清液, 将沉淀重悬于 10 ml 室温下保存的 PBS/BSA 中。
5. 室温下以 300-400 x g 离心 5 分钟。
6. 弃去上清液, 用 4°C 保存的 PBS/BSA 重悬沉淀至最低浓度 1×10^7 个细胞/mL。

贴壁组织培养细胞系的制备

该方法提供了用于贴壁组织培养细胞的通用操作。

试剂

- 1x Accutase 溶液或 0.25%胰蛋白酶
- BSA
- 10x PBS

方法

1. 制备含 1% BSA (w/v) 的 1x PBS (PBS/BSA) 溶液。
 2. 使用含 1x Accutase 溶液或 0.25%胰蛋白酶溶液通过酶解反应收获细胞, 然后用含血清的培养基淬灭。
- 注:** 使用酶消化法时, 表位可能被切割。也可以通过将细胞轻轻刮入培养基中来收获细胞。
- i. 去除培养基, 用无菌、室温 PBS 冲洗细胞单层, 清除残留血清。

- ii. 缓慢加入 1x Accutase 溶液或 0.25%胰蛋白酶以覆盖细胞单层。
- iii. 在 37°C 下孵育, 最长反应 10 分钟。
- iv. 孵育后, 轻轻敲击培养瓶, 细胞将分离并滑到培养瓶底部。
- v. 加入生长培养基, 轻轻吹打重悬细胞。

3. 室温下以 300-400 x g 离心 5 分钟。
4. 弃去上清液, 将沉淀重悬于新鲜的室温保存的 PBS/BSA 中, 以洗去任何残留的细胞碎片和蛋白质。
5. 室温下以 300-400 x g 离心 5 分钟。
6. 弃去上清液, 用适量室温保存的 PBS/BSA 重悬沉淀。
7. 使用血细胞计数器或自动细胞计数器 (例如 TC20 自动细胞计数器 (#1450102)) 对细胞进行计数。
8. 计数后, 用 4°C 保存的 PBS/BSA 将细胞稀释至最低浓度为 1×10^7 个细胞/mL。

人外周血单核细胞的制备

该方法提供了用于外周血单核细胞的通用操作。

试剂

- BSA
- 10x PBS
- 分离试剂 (Histopaque 或 Ficoll)

方法

1. 制备含 1% BSA (w/v) 的 1x PBS (PBS/BSA) 溶液。
2. 使分离试剂平衡至室温。
3. 用等体积的室温 PBS/BSA 稀释血液 (例如, 在 3 ml 血液中加入 3 ml PBS/BSA)。
4. 在 15 ml 锥形离心管中将全血小心覆盖在等体积分离试剂上。
5. 温度控制在 20°C 的不带制动的离心机中以 300-400 x g 连续离心 30 分钟。

注: 在 4°C 下或离心时制动会降低细胞回收的效率。

流式细胞仪的原理

荧光原理

数据分析

流式细胞术中的各种对照

优化实验

多色组合方案构建

常见应用和新技术

通用方案

故障排除

附录

流式细胞仪的原理	6. 用移液器从血清/分离试剂分界处收获细胞。	用于流式细胞术的细胞染色
荧光原理	7. 将收获的细胞置于 15 ml 锥形离心管中。	
数据分析	8. 用 PBS/BSA 调节体积至 10 ml。	细胞和血液表面表位的直接免疫荧光染色
	9. 在室温下以 300-400 x g 离心 5 分钟。	
流式细胞术中的各种对照	10. 弃去上清液,用 4°C 保存的 PBS/BSA 重悬沉淀至最低浓度为 1×10^7 个细胞/ml。	当荧光染料直接与一抗 (例如 RPE、FITC 和 Alexa Fluor 偶联物) 连接时,可以应用此方法。RPE 结合物应始终在暗处处理。
	腹腔巨噬细胞、骨髓、胸腺和脾细胞的制备	
优化实验	该方法提供了用于从腹膜、骨髓、胸腺和脾脏获得悬浮细胞的通用操作。	注: 血样的具体步骤显示在方括号 [] 中。
	试剂	
多色组合方案构建	■ 氯化铵裂解缓冲液: 0.16 M 氯化铵, 0.17 M Tris, pH 7.2	试剂
	■ BSA	
常见应用和新技术	■ 10x PBS	■ 抗凝剂
	■ 可选: DNase I 或 EDTA	
通用方案	方法	注: 对于碱性染色, 可以使用任何适当的抗凝剂, 例如肝素、EDTA 或酸性柠檬酸盐葡萄糖。在某些情况下, 可能需要特定的抗凝剂。
	1. 制备 1% BSA (w/v) 的 1x PBS (PBS/BSA) 溶液。可选择加入 25 µg/ml DNase I 或 5 mM EDTA 以减少细胞聚集。	
故障排除	2. 从相关组织制备单细胞悬液。将细胞置于冰上, 以尽量减少细胞死亡, 细胞死亡可导致细胞聚集。加入 DNase I 或 EDTA 也可减少细胞聚集。大细胞聚集体可通过 40 µm 细胞过滤器除去。	■ BSA
	3. 4°C 下以 300-400 x g 离心 5min。	
附录	4. 弃上清液, 用 10 ml 氯化铵裂解缓冲液重悬沉淀。	■ 红细胞裂解缓冲液 Erythrolyse (#BUF04)
	5. 4°C 下混匀并孵育 2 分钟。请勿超过该时间。	
	6. 4°C 下以 300-400 x g 离心 5min。	■ 10x PBS
	7. 弃去上清液, 将沉淀重悬于 10 ml 4°C 保存的 PBS/BSA 中。	
	8. 4°C 下以 300-400 x g 离心 5min。	■ 可选: 含 0.5% (w/v) 多聚甲醛的 PBS 溶液
	9. 弃去上清液, 用 4°C 保存的 PBS/BSA 重悬沉淀至最终体积 10 ml。	
	10. 使用血细胞计数器或自动细胞计数器 (例如 TC20 自动细胞计数器) 对细胞进行计数。必要时调整混悬液, 使最终浓度为 1×10^7 个细胞/ml。	注: 使用前在加热的搅拌器上溶解多聚甲醛并冷却。
		方法
		1. 制备 1% BSA (w/v) 的 1x PBS (PBS/BSA) 溶液。单独制备 1x PBS 溶液。
		2. 适当制备细胞; 有关更多信息, 请参阅“流式细胞术制备细胞的方案”章节。用 4°C 保存的 PBS/BSA 缓冲液将细胞悬液的浓度调节至 1×10^7 个细胞/ml。[全血样品可以未经稀释使用, 除非细胞计数很高, 例如在白血病血液中。使用适当的抗凝剂。]
		3. 将 100 µL 细胞悬液[或全血]等分至所需数量的试管中。
		4. 以供应商推荐的稀释度添加抗体。混匀, 4°C 下孵育至少 30 分钟, 避免直接光照。
		5. 用 2 ml 4°C 保存的 PBS/BSA 洗涤细胞, 4°C 下以 300-400 x g 离心 5 分钟, 并弃去所得上清液。[向血液悬浮液, 加入 2 ml 新鲜制备的红细胞裂解缓冲液并充分混合。在室温下孵育 10 分钟。室温下以 300-400 x g 离心 5 分钟, 弃去上清液。用 2 ml 室温保存的 PBS/BSA 洗涤, 以 300-400 x g 离心 5 分钟, 弃去上清液。]

- 将细胞重悬于 200 μ l 4°C 保存的 PBS 中 (或如果需要, 使用 200 μ l 含 0.5% 多聚甲醛的 PBS 溶液)。
- 通过流式细胞术获取数据。细胞固定后需要在 24 小时内进行分析。

细胞和血液表面表位的间接免疫荧光染色

该技术适用于使用鉴定细胞表面抗原的未结合或生物素结合的单克隆和多克隆抗体。必须使用偶联的二级试剂 (例如, 链霉亲和素) 来可视化一抗。

注: 血液的特定方法显示在方括号 [] 中。

试剂

■ 抗凝剂

注: 对于基础染色, 可以使用任何适当的抗凝剂, 例如肝素、EDTA 或酸性柠檬酸盐葡萄糖。某些情况下可能需要特定的抗凝剂。

■ BSA

■ 红细胞裂解缓冲液 Erythrolyse (#BUF04)

■ 10x PBS

■ 可选: 含 0.5% (w/v) 多聚甲醛的 PBS 溶液

注: 使用前在加热的搅拌器上溶解多聚甲醛并冷却。

方法

- 在 1x PBS (PBS/BSA) 中制备 1x PBS 和 1% BSA (w/v) 的溶液。可选择制备含 0.5% (w/v) 多聚甲醛的 1X PBS 溶液。

注: 使用前在加热的搅拌器上溶解多聚甲醛并冷却。

- 适当制备细胞; 有关更多信息, 请参阅“流式细胞术制备细胞的方案”章节。用 4°C 保存的 PBS/BSA 缓冲液将细胞悬液的浓度调节至 1×10^7 个细胞/ml。[全血样品可以未经稀释使用, 除非细胞计数高, 如白血病血液。使用适当的抗凝剂。]
- 将 100 μ l 细胞悬液[或全血] 等分至所需数量的试管中。
- 以供应商推荐的稀释度加入一抗。混匀, 4°C 下孵育至少 30 分钟。
- 用 2 ml 4°C 保存的 PBS/BSA 洗涤细胞, 以 300-400 x g 离心 5 分钟, 弃去上清液。

[向血液悬浮液中加入 2 ml 新鲜制备的红细胞裂解缓冲液并充分混合。在室温下孵育 10 分钟。以 300-400 x g 离心 5 分钟, 弃去上清液。用 2 ml 室温下保存的 PBS/BSA 洗涤, 以 300-400 g 离心 5 分钟, 弃去上清液。]

- 以供应商推荐的稀释度加入适当的二级试剂。混匀并在 4°C 下孵育至少 30 分钟, 避免直接光照。
- 室温下以 300-400 x g 离心 5 分钟, 弃去上清液。
- 将细胞重悬于 200 μ l 4°C 保存的 PBS 中 (或如果需要, 使用 200 μ l 0.5% 多聚甲醛的 PBS 溶液)。
- 通过流式细胞术获取数据。细胞固定后需要在 24 小时内进行分析。

细胞内抗原和细胞因子的直接染色: Leucoperm 辅助试剂法

在胞内染色之前, 需要进行使用 Leucoperm 辅助试剂的细胞破膜。

胞内抗原的检测需要在染色之前进行细胞破膜步骤。对于 PCNA 等细胞周期抗原的检测, 推荐甲醇改性。

注: 血液的特定方法显示在方括号 [] 中。

试剂

■ 抗凝剂

注: 对于基础染色, 可以使用任何适当的抗凝剂, 例如肝素、EDTA 或酸性柠檬酸盐葡萄糖。在某些情况下, 可能需要特定的抗凝剂。

■ BSA

■ 红细胞裂解缓冲液 Erythrolyse (#BUF04)

■ Leucoperm 辅助试剂 (#BUF09)

■ 10x PBS

■ 可选: 含 0.5% (w/v) 多聚甲醛的 PBS 溶液

注: 使用前在加热的搅拌器上溶解多聚甲醛并冷却。

方法

- 在 1x PBS (PBS/BSA) 中制备 1x PBS 和 1% BSA (w/v) 的溶液。可选择制备含 0.5% (w/v) 多聚甲醛的 1X PBS 溶液。

注: 使用前在加热的搅拌器上溶解多聚甲醛并冷却。

流式细胞仪的原理	2. 适当处理后收获细胞，并确定存在的总数。用 4°C 保存的 PBS/BSA 将细胞悬液浓度调节至 1×10^7 个细胞/ml。[全血样品可以未经稀释使用，除非细胞计数较高，如白血病样品。使用适当的抗凝剂。]	胞内抗原的检测需要在染色之前进行细胞破膜步骤。已经发现下文描述的方法可以为我们提供出色的结果；然而，已经发表的其他破膜技术，也可以成功地用于该应用中。
荧光原理	3. 向适当数量的试管中加入 100 μ l 细胞悬液[或全血]。	注： 在检测胞内细胞因子之前，静息细胞通常需要体外刺激。
数据分析	4. 如需要，使用适当的直接偶联的单克隆抗体在 4°C 下进行细胞表面抗原染色，避免直接光照。	试剂
流式细胞术中的各种对照	5. 在 2 ml 4°C 保存的 PBS/BSA 中洗涤细胞一次，弃去上清液。	■ BSA
优化实验	6. 每 1×10^6 个细胞用 100 μ l 2-8°C 保存的 Leucoperm 试剂 A（细胞固定剂）重悬细胞。在 2-8°C 下孵育 10 分钟。	■ 细胞培养基
多色组合方案构建	7. 加入 3 ml 室温 PBS/BSA，室温下以 300-400 x g 离心 5 分钟。 [向血液悬液加入 2 ml 新鲜制备的 1x 红细胞裂解缓冲液 Erythrolyse 并充分混合。在室温下孵育 10 分钟。以 300-400 x g 离心 5 分钟，弃去上清液。用 2 ml 室温下保存的 PBS/BSA 洗涤，室温下以 300-400 x g 离心 5 分钟，弃去上清液。]	■ 红细胞裂解缓冲液 Erythrolyse (#BUF04)
常见应用和新技术	8. 去除上清液，每 1×10^6 个细胞加入 100 μ l Leucoperm 试剂 B（细胞破膜剂）。加入供应商推荐稀释度的直接偶联抗体，并在 4°C 下孵育至少 30 分钟，避免直接光照。	■ 离子霉素
通用方案	9. 用 PBS 清洗一次，然后重悬于 200 μ l 4°C 保存的 PBS 中，立即进行分析（或如果需要，使用 200 μ l 0.5% 多聚甲醛的 PBS 溶液）。	■ Leucoperm 试剂盒
故障排除	10. 通过流式细胞术获取数据。细胞固定后需要在 24 小时内进行分析。	■ 莫能菌素
附录	血液中胞内细胞因子的直接免疫荧光染色 该方法描述了使用直接偶联的抗体对全血中的胞内抗原进行染色。 这是一种快速、简单的方法，用来分析全血中的胞内细胞因子。该方法允许分析小样品，并避免因密度梯度离心分离外周血细胞而产生伪影。所有血液样品必须采集至肝素抗凝剂中。EDTA 会干扰细胞刺激过程，因此必须避免使用。	■ 10x PBS ■ 佛波醇 12-肉豆蔻酸酯 13-乙酸酯（PMA） ■ 可选：含 0.5%（w/v）多聚甲醛的 PBS 溶液
		方法
		1. 在 1x PBS（PBS/BSA）中制备 1x PBS 和 1% BSA（w/v）的溶液。可选择制备含 0.5%（w/v）多聚甲醛的 1x PBS 溶液。 注： 使用前在加热的搅拌器上溶解多聚甲醛并冷却。
		2. 将 500 μ L 血液等分到所需数量的试管中，包括 2 个额外的对照管，然后向每个样品中添加 500 μ l 细胞培养基（不含任何添加剂）。
		3. 向一个试管（静息细胞群体）中添加莫能菌素至终浓度为 3 μ M。
		4. 向另一个试管（活化的细胞）中添加 PMA 至终浓度为 10 ng/mL，添加离子霉素至终浓度为 2 μ M，以及添加莫能菌素至终浓度为 3 μ M。
		5. 向其余试管（实验样品）中加入莫能菌素至终浓度为 3 μ M，并根据实验要求进行处理。
		6. 在 37°C、5% CO ₂ 培养箱内孵育 2-4 小时。
		7. 如果需要，使用适当的直接偶联的单克隆抗体在 4°C 下进行细胞表面抗原染色，避免直接光照。
		8. 用 PBS/BSA 洗涤细胞一次，弃去上清液。

- 加入 100 μ l Leucoperm 试剂 A (细胞固定剂)，并在 2-8°C 下孵育 10 分钟。
- 加入 2 ml 4°C 保存的 PBS/BSA，室温下以 300-400 g 离心 5 分钟。
- 去除上清液，每 1×10^6 个细胞加入 100 μ l Leucoperm 试剂 B (细胞破膜剂)。加入供应商推荐稀释度的直接偶联抗体，并在 4°C 下孵育至少 30 分钟，避免直接光照。
- 向血液悬液中加入 2 ml 新鲜制备的红细胞裂解缓冲液 Erythrolys，混匀。
- 室温下孵育 10 分钟。
- 以 300-400 x g 离心 5 分钟，弃去上清液。
- 在 PBS/BSA 中洗涤一次，然后重悬于 200 μ l PBS 中以立即分析 (或如果需要，重悬于 200 μ l 0.5% 多聚甲醛的 PBS 溶液)。
- 通过流式细胞术获取数据。细胞固定后需要在 24 小时内进行分析。

用于细胞周期分析的碘化丙啶染色

该方法提供了使用碘化丙啶 (PI) 进行细胞周期分析的 DNA 染色的通用操作。这些仅是指导原则，可能需要针对不同的细胞类型调整孵育时间。

试剂

- 70% 乙醇去离子水溶液 (DI)
- 核酸染色液 (1x PBS, 100 μ g/ml RNase A)
- 10x PBS
- ReadIDrop 碘化丙啶 (#1351101)

方法

- 制备 1x PBS。
- 适当制备细胞；有关更多信息，请参阅“流式细胞术细胞制备的方案”。
- 在 2-5 ml 4°C 保存的 70%乙醇中固定细胞。涡旋时逐滴加入细胞沉淀中。这确保固定所有细胞、最大程度地减少结块。
- 在冰上孵育至少 30 分钟。

注：样品可在此阶段放置数周。

- 以 500 x g 离心 10 分钟；倾倒入上清液。
- 用 3 ml PBS 重悬细胞后，以 300-400 x g 的速度在 4°C 下离心 5 分钟，弃去上清液。重复此步骤两次。
- 用 500 μ l 核酸染色液重悬细胞沉淀。混匀。
- 室温下孵育 30 分钟。
- 加入 1-2 滴 ReadIDrop 碘化丙啶。
- 通过流式细胞术分析。在合适的通道用线性轴读取 PI 结果。根据所使用的仪器，使用面积 vs 高度或者宽度去除粘连体。

用于细胞周期分析和细胞凋亡的 BrdU 染色

BrdU 是在 DNA 合成过程中易于掺入 DNA 的胸苷类似物，是监测细胞增殖和凋亡的准确方法。使用了以下方案可以为抗 BrdU 抗体的使用提供了有用的指南。

注：用于 DNA 解旋的酸处理可能会影响表面免疫分型。如果需要，可以用 BrdU 染色细胞时，使用 DNase I。

试剂

- BSA
- 含 0.5% triton X-100 的 2 M HCl
- 0.1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 8.5
- 10x PBS
- 碘化丙啶
- 0.05% (v/v) Tween -20 的 PBS/BSA 溶液

方法

- 在 1x PBS (PBS/BSA) 中制备 1x PBS 和 1% BSA (w/v) 的溶液。
- 向细胞悬液加入 BrdU，使其最终浓度为 10 μ M，并在 CO_2 培养箱中于 37°C 下孵育至少 30 分钟。
- 用 PBS/BSA 洗涤细胞两次，在室温下以 500 x g 洗涤 10 分钟，倾倒入上清液。
- 重悬于 2-5 ml 4°C 保存的 70%乙醇中。涡旋时逐滴加入细胞沉淀中。在冰上固定至少 30 分钟。
- 以 500 x g 离心 10 分钟，倾倒入上清液。
- 将沉淀重悬于 2 ml 含 0.5% Triton X-100 的 2 M HCl 中。室温下孵育 30 分钟 (最好在摇床上)。

流式细胞仪的原理

荧光原理

数据分析

流式细胞术中的各种对照

优化实验

多色组合方案构建

常见应用和新技术

通用方案

故障排除

附录

流式细胞仪的原理	7. 以 500 x g 离心 10 分钟, 倾倒入上清液。重悬于 3 ml 0.1 M Na ₂ B ₄ O ₇ (pH 8.5) 中, 室温下孵育 2 分钟。	方法	1. 在 1x PBS (PBS/BSA) 中制备 1x PBS 和 1% BSA (w/v) 的溶液。
荧光原理	8. 以 500 x g 离心 10 分钟, 倾倒入上清液, 重悬于室温 0.05% Tween-20 PBS/BSA 中。调整细胞浓度至 1×10 ⁷ 细胞/ml。		2. 适当制备细胞; 更多信息参见 方案 FC2 (用于流式细胞术的人外周血单核细胞的制备)。用 4°C 保存的染色缓冲液将细胞悬液的浓度调节至 1 x 10 ⁷ 个细胞/ml。StarBright 染料的染色缓冲液可以是 PBS/BSA 或 Bio-Rad 染色缓冲液。
数据分析	9. 将 100 µl 细胞悬液等分至所需数量的 FACS 管中。		3. 将 100µL 细胞悬液等分至所需数量的试管 (或 96 孔板的孔) 中。
对照	10. 在供应商推荐的稀释度下, 与抗体在 4°C 下孵育过夜, 避免直接光照。		4. 用 Fc 阻断剂 (人 Seroblock 或小鼠 Seroblock) 或所用细胞物种的 10%血清孵育 10-30 分钟。
流式细胞术中的各种对照	11. 重悬于 2 ml 室温下保存的 PBS/BSA 中。室温下以 500 x g 离心 10 分钟。		5. 4°C 下以 300-400 x g 离心 5 分钟, 弃去上清液。
优化实验	12. 如果需要二抗, 则倾倒入上清液, 加入 100 µl PBS/BSA, 并在供应商推荐的稀释度下与二抗在 4°C 下孵育至少 30 分钟。		6. 在 100-200 µl 染色缓冲液中加入推荐稀释度的所需抗体, 并在 4°C 或室温下避光孵育 1 小时。
多色组合方案构建	13. 用 2 ml PBS/BSA 洗涤, 以 500 x g 离心 10 分钟。		注: StarBright 染料以 500 µl 小瓶的形式提供, 但您可能希望针对特定细胞进行所需的抗体滴定实验, 抗体使用浓度的优化会改善染色指数。当与任何其他 StarBright 染料、有机荧光染料或荧光蛋白染料 (包括串联染料) 联合使用时, StarBright 染料不需要特殊的缓冲液。然而, 当结合一种或多种聚合物染料时, 您可能需要对某些聚合物染料使用推荐的染色缓冲液。细胞在冰上染色会导致较低的染色指数, 因此建议在 4°C 或室温下染色, 以提高分辨率。
常见应用和新技术	14. 用 1 ml PBS 重悬细胞。加入 1-2 滴 ReadDrop 碘化丙啶。		7. 用 2 ml 4°C 保存的染色缓冲液 (96 孔板用 200µL) 洗涤细胞, 并以 300-400 x g 离心 5 分钟。弃去上清液, 共重复洗涤 3 次。
通用方案	15. 通过流式细胞术分析。在合适的通道用线性轴读取 PI 结果。根据所使用的仪器, 使用面积 vs 高度或者宽度去除粘连体。		8. 用 200 µl 4°C 保存的 PBS 或 200 µl 固定剂 (如固定缓冲液或 2 ~ 4%多聚甲醛) 重悬细胞。请勿将细胞长时间放置在固定剂中。如是长期保存, 转移到 PBS 中, 放入冰箱贮藏, 避免直接光照。
故障排除			9. 通过流式细胞术获取数据。
附录	用 StarBright 染料对细胞进行直接免疫荧光染色 该方法提供了用 StarBright 染料对试管或 96 孔板中的细胞进行染色的通用操作。在某些情况下, 在产品数据表上提供了具体的建议, 并且这些方法应始终与每个试剂瓶随附的产品和批次特定信息结合使用。 试剂 ■ BSA ■ 人 Seroblock (# BUF070A)、小鼠 Seroblock (# BUF041A) 或与染色细胞种属匹配的 10%血清 ■ 10x PBS ■ 可选: 固定缓冲液 (#BUF071), Bio-Rad 染色缓冲液 (#BUF073)		



9. 故障排除

故障排除指南

如遇到问题，请通过表 9 和表 10 中提供的指南进行检查，以识别并解决该问题。如果仍然存在问题，并且您已经购买了任何 Bio-Rad 试剂，我们的技术服务团队（请参见 [bio-rad-antibodies.com/technical](https://www.bio-rad-antibodies.com/technical) 的联系方式）可以提供进一步的建议。

表 9. 细胞分析故障排除。

问题	处理方法
无染色	1. 确认所有抗体均已按照生产商的说明正确贮藏。 2. 确认市售抗体未超过其有效日期。 3. 确保已添加适当的一抗或二抗。 4. 确保您的抗体偶联了荧光染料。如果没有，确认使用的荧光染料偶联二抗是否适当。 5. 确认二抗能够结合抗原。这个抗体是否成功与其他一抗一起使用？ 6. 确保二抗具有适当的种属反应性和同种型，以鉴定您的一抗。 7. 如果使用的荧光染料是基于 PE 或 APC，请确保产品未冷冻。 8. 测试组织上是否存在靶抗原？检查抗原表达的文献，并同时检查已知抗原表达的阳性对照与检测材料。 9. 抗体是否识别测试种属中的抗原？检查您的抗体是否与测试种属发生交叉反应。并非所有抗体都会对不同物种产生反应。 10. 确认使用正确的激光激发荧光染料，并使用正确的通道分析染料发射信号。
使用偶联抗体无染色，但使用相同抗体偶联 FITC 可获得良好结果	1. PE 结合物可能已被冷冻。如果是，请重新购买一瓶抗体。 2. 多聚甲醛可能已过期。多聚甲醛的分解可能会释放出甲醇，从而影响染色。准备新鲜的多聚甲醛。
非特异性染色	1. 可能是由于自发荧光所致。在您的检测方案中引入仅含有细胞（不含任何抗体）的试管，检查自发荧光水平。 2. 某些细胞表达低亲和力的 Fc 受体 CD16/CD32，该受体通过 Fc 区结合整个抗体。对于小鼠细胞，使用小鼠 Seroblock FcR (#Buf041A, BUF041B)；对于人细胞，使用人 Seroblock (#BUF070A, BUF070B)。或者，使用宿主细胞种属的血清。 3. 可能是二抗的缘故。选择不会与靶组织发生交叉反应的二抗，或单独用二抗染色作为对照。 4. 确保包括充足的洗涤步骤。 5. 仔细滴定检测抗体。在较低的抗体浓度下，非特异性染色可能会减少。 6. 染色已知为阴性的细胞或查看已知为阴性的异质群体中的染色细胞，例如外周血中单核细胞上的 CD3。

续

流式细胞仪的原理	
荧光原理	
数据分析	
流式细胞术中的各种对照	
优化实验	
多色组合方案构建	
常见应用和新技术	
通用方案	
故障排除	
附录	

问题	处理方法
弱染色	- 可能是由于抗体的过度稀释。使用前通过滴定确认抗体是否以正确的浓度使用。 - 间接染色系统中的弱染色可能是由于前带效应，其中高浓度的抗体可能会产生弱结果。谨慎滴定。 - 可能是由于细胞数量过多。调整细胞群至推荐密度。 - 可能是由于抗原的表达。查阅文献中预期的表达水平。 - 如果抗原表达较弱，则选择与较亮荧光团偶联的抗体。 - 如果使用交叉反应抗体而非仅针对靶种属的特异性抗体，则可能会观察这个结果。 - 优化使用一抗或二抗时的孵育时间和温度。
异常散射特性	- 使用时确保细胞尽可能新鲜。散射特性可能显示死细胞和碎片。 - 使用活性染料去除死细胞对于流式结果的影响。 - 激活方法可能会影响细胞的散射特性。 - 如果您使用的是裂解液，请确认裂解液新鲜并且已经正确制备。
意外染色	- 一些试剂可能影响某些抗原，因此可能需要检查。比如 EDTA 会影响一些血小板标记物。 - 裂解液可能影响某些抗原。选择不干扰抗原检测的方法。 - 有些抗原在细胞内表达；因此，可能需要破膜的方法。检查生产商的破膜试剂数据表。

表 10. 细胞分选故障排除。

高水平的细胞死亡	当细胞带电时，可能会被塑料收集管上的电荷吸引。 - 避免使用聚苯乙烯。 - 用含有蛋白质的缓冲液预包被收集管。 - 避免将细胞长时间保存在 PBS 中。 - 向收集管中加入蛋白缓冲液。 - 如果分选细胞到培养基中，则添加 HEPES。 - 细胞收集后应贮藏适当的温度下。一般保存在 4°C 下，但具体要求请查阅您所用细胞类型的相关文献。 - 降低分选压力，如果可能，减少细胞应激。
分选细胞回收率差	- 加入活性染料以去除死细胞。 - 在分选之前对细胞进行计数，以确保其浓度不会过高（或过于稀释）。 - 设计适当的流式实验方案。包括阳性和阴性标记物、排除通道（如果可能），并在方案设计上使用最佳实践技术。使用谱图查看器或方案构建工具可能会有所帮助。 - 降低阈值设置。请注意，虽然这样做可以更容易地鉴定细胞群，但无论细胞分选仪忽略的是什么（例如碎片），最终都会进入收集管。



附录

术语表

细胞凋亡: 通过各种严格调控的生物学途径发生的程序性细胞死亡。

抗体: 免疫系统中的一种特殊蛋白质, 可以识别和中和被称为抗原的特定靶标。

面积: 脉冲的积分。

自发荧光: 由于荧光化合物的存在而在细胞内发现的天然水平的荧光。

反向设门: 一种有用的门控, 可确保使用传统门控鉴定出正确的细胞群。

带通滤光片: 允许光线在规定的窄范围内通过的滤光片。

细胞分选: 利用电荷在液滴内分离细胞 (通过指定特征鉴定) 的能力。

补偿: 用于消除一个荧光团向多个检测器中溢出荧光的数学算法。

粘连体: 在检测点处一起通过激光的两个粒子。

液滴延迟: 细胞分选过程中细胞通过检测点到液滴断点之间的时间。

事件: 产生足够的信号强度的任何颗粒, 当颗粒通过激光时, 会被记录为信号或脉冲峰。

FC 受体: 某些细胞上的抗体受体, 通过其恒定区结合抗体以引发免疫应答。

固定: 细胞蛋白质的交联, 可保存细胞以防止其降解, 并且可以进行透化, 并且不会损失细胞内容物和细胞内染色的结构。

前向角散射: 与粒子相互作用后向前 (最多 20°) 散射方向的光。

流式细胞仪: 测量单个粒子通过激光时的特性的仪器。

荧光减一对照: 从染色方案中去除一个荧光团以说明荧光扩散的特异性对照。

荧光蛋白: 一种能接受光能并在较长波长处重新发射, 并且能在细胞内表达进行活体标记的蛋白质。

荧光团: 在给定波长下接受光能并在较长波长处重新发射的荧光标记物。

门控: 在具有共同特征的细胞群体周围设置区域, 以进行量化和进一步研究。

高度: PMT 输出的脉冲最大电流量。

直方图: 显示单个测量参数的图。

流体动力学聚焦: 一种使样品流周围的外部鞘液更快的技术, 可使得样本液流变窄, 形成单细胞流。

免疫分型: 通过染色和特异性标记物鉴定群体中的细胞。

仪器配置: 流式细胞分析仪内激光器、光学器件和滤光片的设置。

同型对照: 针对分析细胞上不表达的抗原产生的抗体; 用于帮助确定特异性抗体结合。

激光器: 能发射单一波长光学放大的光的装置。

长通滤光片: 允许一定波长以上的光通过的滤光片。

最大发射: 荧光团发射最多光子的波长。

最大激发: 荧光团被最多光子激发的波长。

参数: 在流式细胞仪中检测到的高度、面积或宽度测量值。

光电倍增管: 一种光发射探测装置, 在其中光子的吸收会导致电子的发射。

透化: 使用表面活性剂在细胞膜上制造孔洞, 使大分子 (如抗体) 可以进入细胞内进行胞内染色。

流式细胞仪的原理	分辨率：将阳性群体与阴性群体分开的能力。 短通滤光片：允许在一定波长以下的光通过的滤光片。 侧向角散射：与粒子相互作用后以 90°散射的光。 溢出：一个荧光发射光谱与另一个荧光发射光谱的重叠。 扩散：补偿后，进入另一个通道的细胞群的荧光的增加。 染色指数：染色样品上阳性和阴性群体之间分离度最大的点。 斯托克斯位移：荧光分子的最大激发波长和发射波长之差。 串联染料：由两个分子共价偶联在一起组成的荧光染料。 阈值：信号强度，低于该信号强度时流式细胞仪不会记录事件。 滴定：将抗体稀释至具有最佳染色指数的浓度。 活性染料：通过细胞膜完整性降低这一方法来鉴定死亡细胞的染料。 宽度：脉冲发生的时间间隔。
荧光原理	
数据分析	
流式细胞术中的各种对照	
优化实验	
多色组合方案构建	
常见应用和新技术	
通用方案	
故障排除	
附录	

参考文献和进一步阅读

- Cossarizza A et al. (2019). Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur J Immunol* 49, 1,457–1,973.
- Ferrer-Font L et al. (2020). Panel design and optimization for high-dimensional immunophenotyping assays using spectral flow cytometry. *Curr Protoc Cytom*, 92, 1, e70.
- Givan AL (2001). *Flow cytometry: First principles*, 2nd Edition (New York: Wiley-Liss, Inc.).
- Haugland RP (2005). *The handbook: A guide to fluorescent probes and labeling technologies*, 10th edition (Invitrogen — Molecular Probes).
- Hulspas R et al. (2009). Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 76, 355–364.
- Macey MG (1994). *Flow cytometry: Clinical applications* (Oxford, United Kingdom: Blackwell Scientific Publications).
- Ormerod MG, ed. (2000). *Flow cytometry: A practical approach*, 3rd edition (Oxford, United Kingdom: Oxford University Press).
- Perfetto SP et al. (2004). Seventeen-colour flow cytometry: Unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol* 4, 648–655.
- Roederer M (2008). How many events is enough? Are you positive? *Cytometry A* 73, 5, 384–385.
- Sahir F et al. (2020). Development of a 43-color panel for the characterization of conventional and unconventional T-cell subsets, B cells, NK cells, monocytes, dendritic cells, and innate lymphoid cells using spectral flow cytometry. *Cytometry A*. [published online ahead of print December 18, 2020]. Accessed September 21, 2021.
- Shapiro HM (2003). *Practical Flow Cytometry*, 4th Edition (New York: Wiley-Liss, Inc.).
- Stewart CC and Nicholson JKA, eds. (2000). *Immunophenotyping* (New York: Wiley-Liss, Inc.).
- Takizawa et al. (1993). Binding of phycoerythrin and its conjugates to murine low affinity receptors for immunoglobulin G. *J Immunol Methods* 162, 269–272.
- Watson JV (2004). *Introduction to flow cytometry* (Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press).

流式细胞仪的原理

荧光原理

数据分析

流式细胞术中的各种对照

优化实验

多色组合方案构建

常见应用和新技术

通用方案

故障排除

附录

有关更多信息，请访问 bio-rad-antibodies.com/flow。

BIO-RAD 为 BIO-RAD Laboratories, Inc. 在特定区域的商标。本文件使用的所有商标均为其各自所有者的财产。

本产品仅用于科研，不可作临床诊断使用。



BIO-RAD
LABORATORIES, INC.

Life Science Group

bio-rad-antibodies.com

