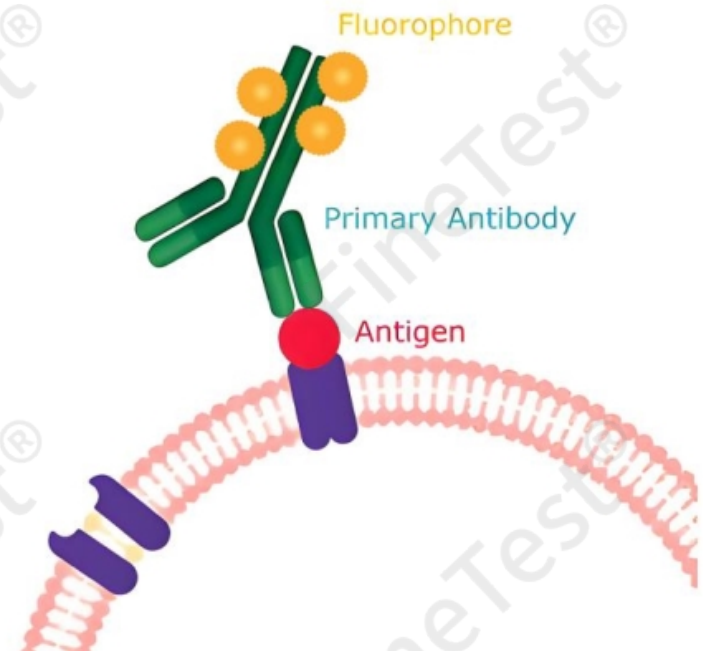


相关背景知识

流式细胞术 (Flow Cytometry, FCM) 是一种在生物学领域广泛应用的技术，它能够对悬浮于流体中的微小颗粒，如细胞或其他生物粒子，进行高速的计数和分选。这种技术通过检测标记的荧光信号，实现对单个细胞的定量分析和分选。

流式细胞术的基本原理是利用激光激发高速运动的带有各种荧光标记的微粒，并检测微粒由此产生的散射光信号和荧光信号来反应微粒的各个参数，并将特定性状的微粒分选出来，再进行分析或培养。它能够在单细胞水平上，多参数同时测量，检测速度快，可达到每秒上万个细胞，并且可以定量分析，提供大数据以供统计学差异分析。

Direct
Detection



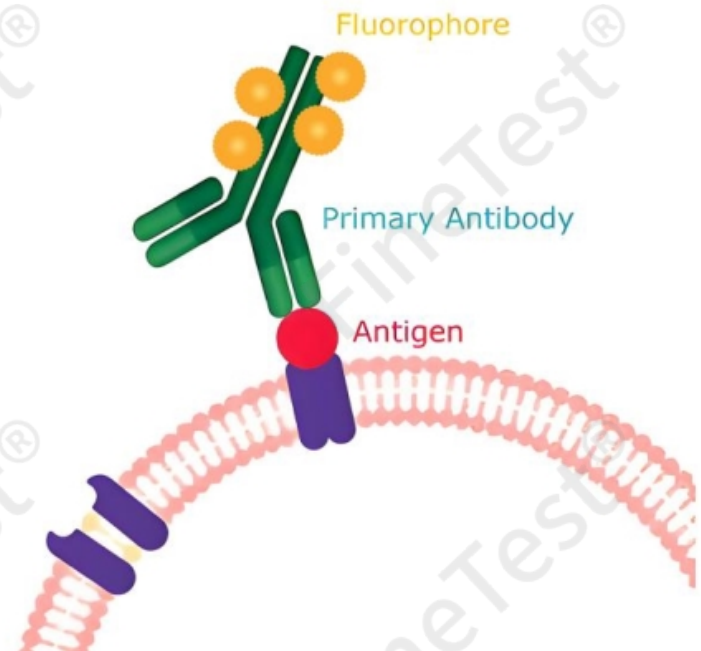
相关背景知识

流式细胞术的实验流程包括**样本制备**、**荧光染色**、**上机检测**和**数据分析**。

流式细胞术中样本制备意义重大，需要确保单细胞悬液的制备，流式细胞术分析的对象是单细胞悬液，制备出合格的分散单细胞是流式细胞术样本制备技术中重要的环节，直接影响实验结果。在制备单细胞悬液时，主要的考虑因素是尽量减少细胞死亡和碎片。死细胞导致样品中出现团块，这些团块往往在免疫染色中粘附游离的抗体，且表现出更高水平的自发荧光，从而干扰荧光的准确测定。需要维持细胞活力：制备过程中的碎片过多会提高噪音水平，如果过量还会干扰目标细胞的测定。

本次直播会讲解不同样本的制备关键点和不同指标怎么荧光染色。

Direct
Detection



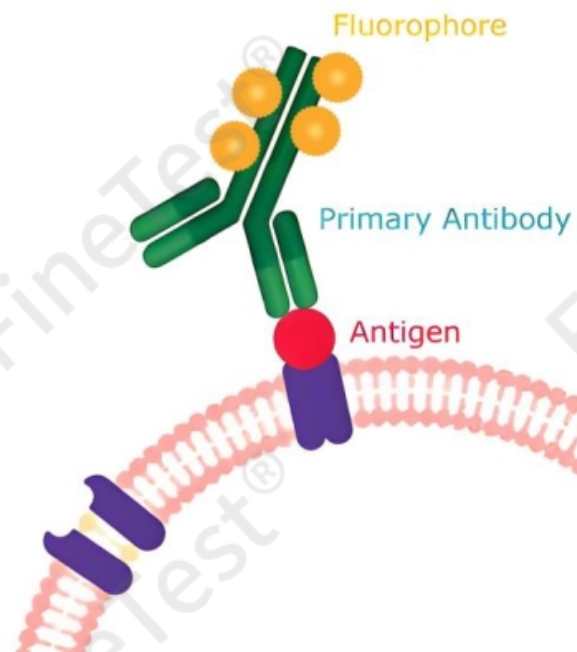
常见流式样本的制备和流式实验流程



目录

1. 外周血处理
2. 贴壁细胞处理
3. 组织样本处理
4. 流式实验流程

**Direct
Detection**



样本制备条件

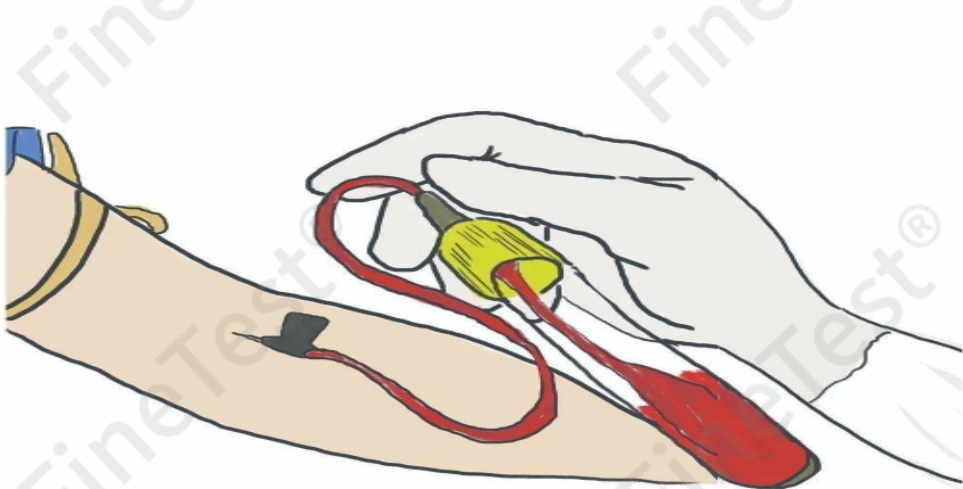


好的样本：既要是单个细胞，又要维持细胞的固有生物化学成分及生物学特性。

01

外周血处理

外周血样本收集



红色头盖采血管：不含添加剂，一般是用于血常规的检测。

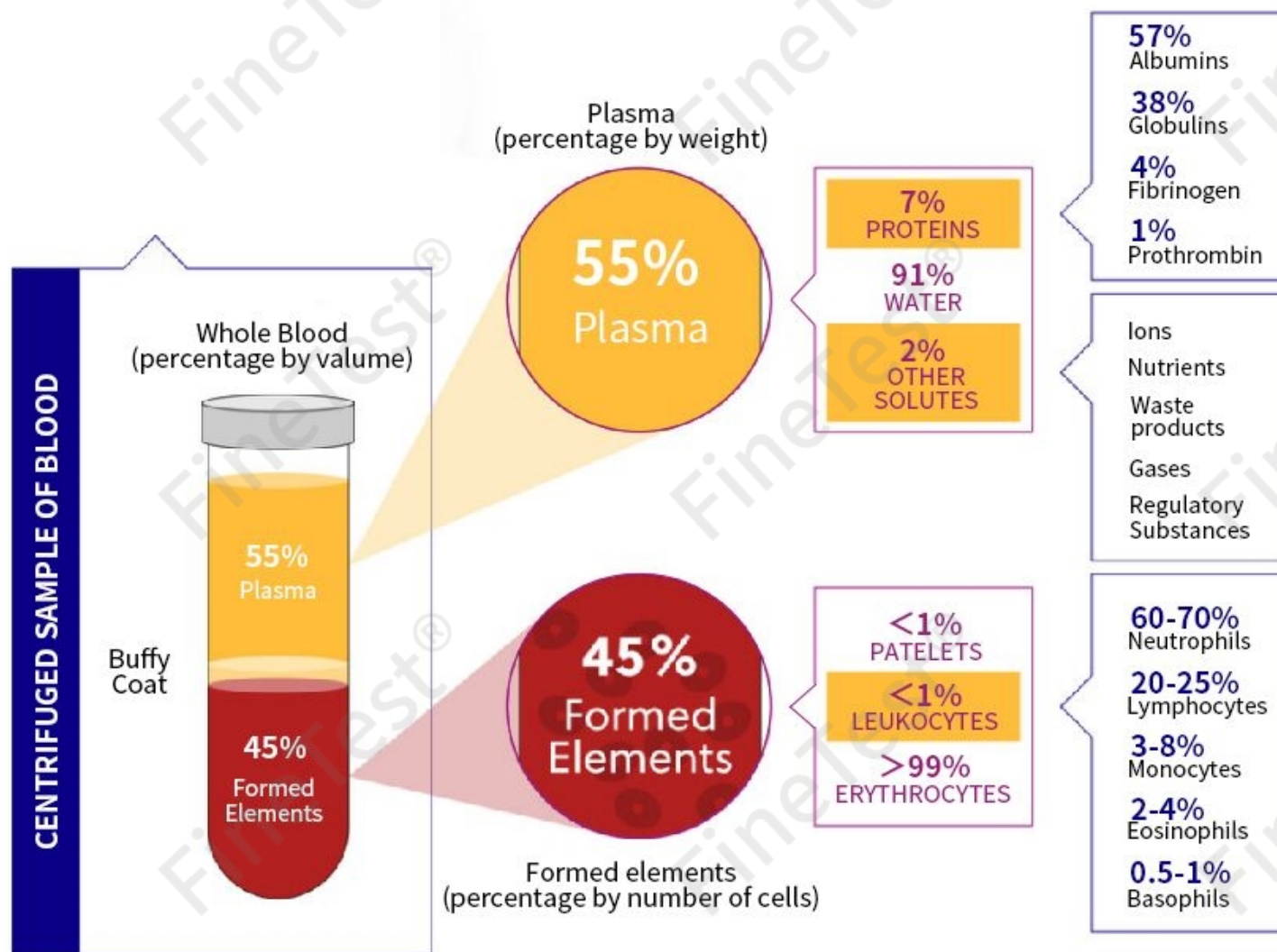
紫、绿、蓝等不同颜色头盖采血管：管壁上是有不同类型的抗凝剂，可以分别针对血液中不同细胞进行检测。流式实验需要用到含抗凝剂的采血管。

采血管选择

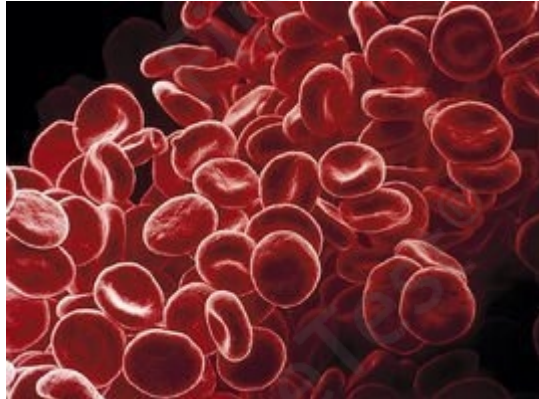
采血管	紫头管	绿头管	蓝、黑头管
成分	EDTA	肝素	枸橼酸
结合原理	Ca ²⁺ 螯合	阻止凝血酶形成、自我催化等	Ca ²⁺ 螯合
抗凝剂浓度	1.2 mg/ml	10.0~12.5 IU/ml	1:9(蓝 3.2%) 1:4(黑 3.8%)
流式检测 保存时间	室温8 h内处理	室温8h内处理	室温2h内处理
优点	● 不影响白细胞计数及大小，常用于细胞计数 ● 红细胞形态影响最小	● 抗凝效果较好 ● 白细胞表面标志物和亚群比例更稳定 ● 对血液成分干扰较少，不影响红细胞体积，不引起溶血 ● 适用于红细胞渗透性试验，红细胞压积试验等	● 细胞毒性较小 ● 对平均血小板体积及其他凝血因子影响较小 ● 常用于血液保存
采血体积(3ml管)	2ml以上，不超过3ml	2ml	2ml
注意事项	● 血量过少，会使中性粒细胞肿胀，产生血小板碎片，影响结果 ● 涉及胞内因子检测，细胞功能检测等，尽量不用	● 放置过久血液又可凝固 ● 随着放置时间，白细胞计数快速下降 ● 肝素过量可以引起白细胞聚集和血小板减少 ● 不适于后续蛋白电泳实验	● 血小板相关检测、及凝血实验多用蓝头管 ● 黑色又叫血沉管，检测红细胞沉降

Tips: 做细胞因子实验用含肝素的采血管。

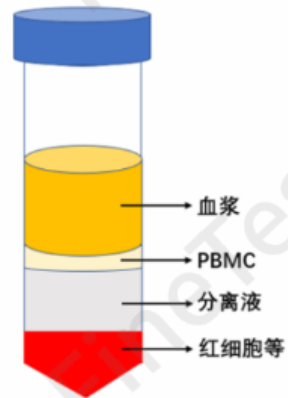
血液组成



外周血处理



红细胞裂解 (白细胞研究)



Ficoll分离PBMC(外周血单个核细胞)

红细胞裂解液选择

名称	10×ACK Lysis Buffer	10× RBC Lysis/Fixation Solution
可处理样本	人和小鼠血液	人血液
特点	温和	含固定剂
	不含固定剂	作用较为强烈，但是裂红效果相对更好，且能提高实验室生物安全性

Tips:

细胞如果在染色前进行了固定，抗原表位则可能会因为固定而被破坏，导致抗体无法识别；固定剂会降低抗体荧光信号强度，特别是串联染料。

裂红顺序

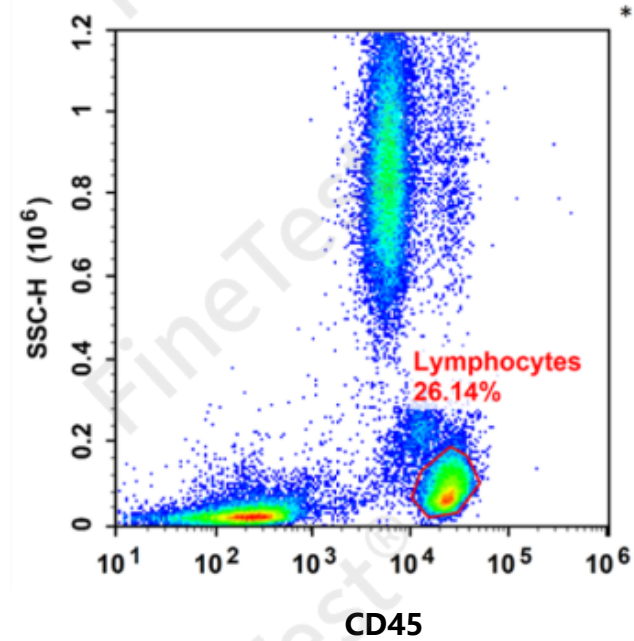
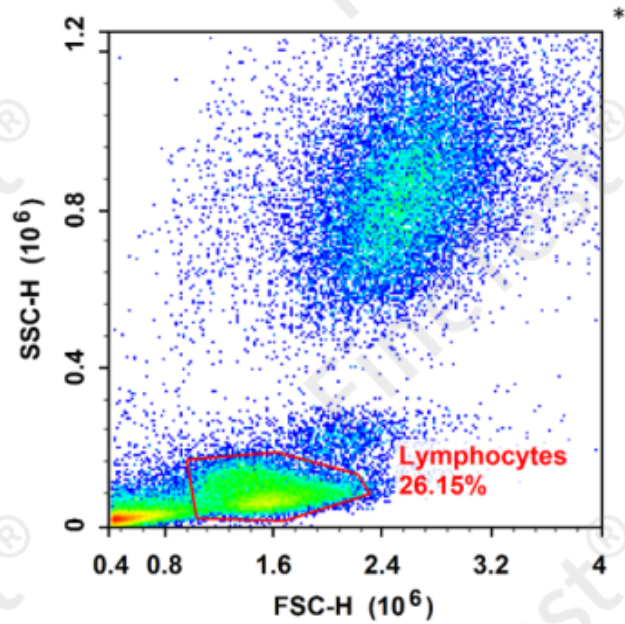
1、裂解-洗涤-染色-洗涤 (LWSW) 法

- 操作起来复杂一些，但是可以减少细胞碎片的量，使实验结果信噪比更高。
- 另外就是一些特殊指标的检测时，需要先裂红再染色，比如检测IgM的表达水平

2、染色-裂解-洗涤 (SLW) 法

- 比LWSW法少一步离心操作，能减少细胞的损失，提高细胞的回收率。

裂红加染色CD45



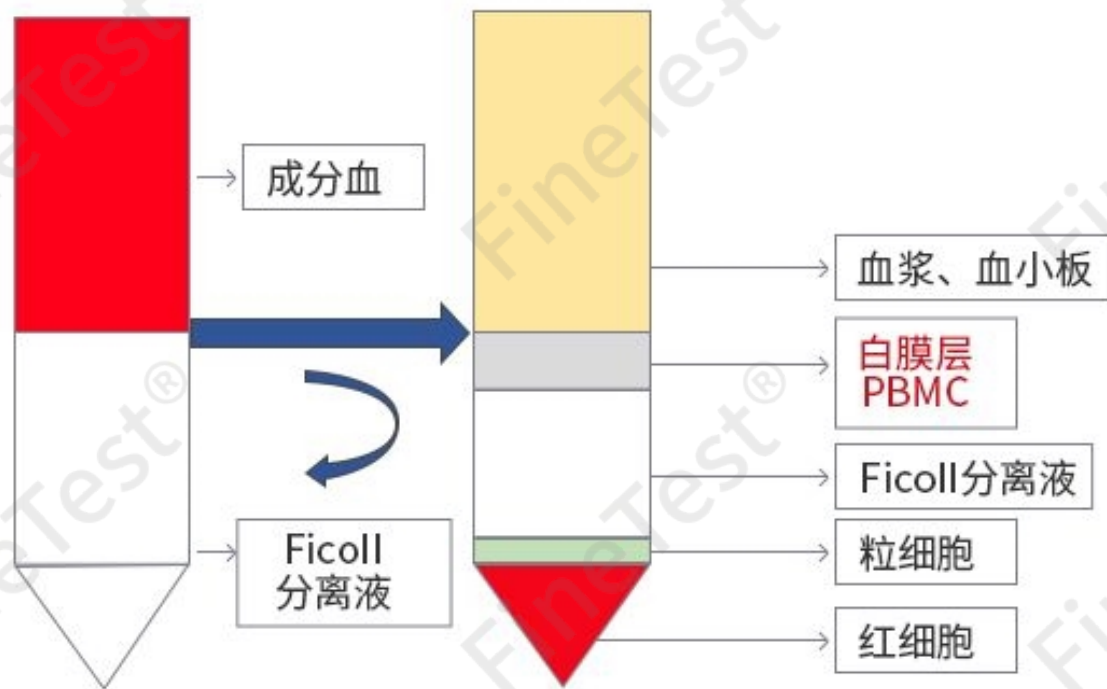
裂解红细胞优缺点

优点	缺点
白细胞保存完整，淋巴细胞、单核细胞、粒细胞	有时候裂红不完全，红细胞干扰实验结果。裂解过度影响细胞活力。
操作简单，用时短	细胞不能继续培养
细胞得率高	—

分离PBMC

分离原理：根据细胞密度差异，借助细胞分离液（Ficoll）和离心，对细胞进行分离。

PBMC包含淋巴细胞和单核细胞



细胞漂浮密度：

血小板:1.03-1.06g/mL

单核细胞:1.05-1.066g/mL

淋巴细胞:1.052-1.077g/mL

Ficoll分离液:1.077g/mL

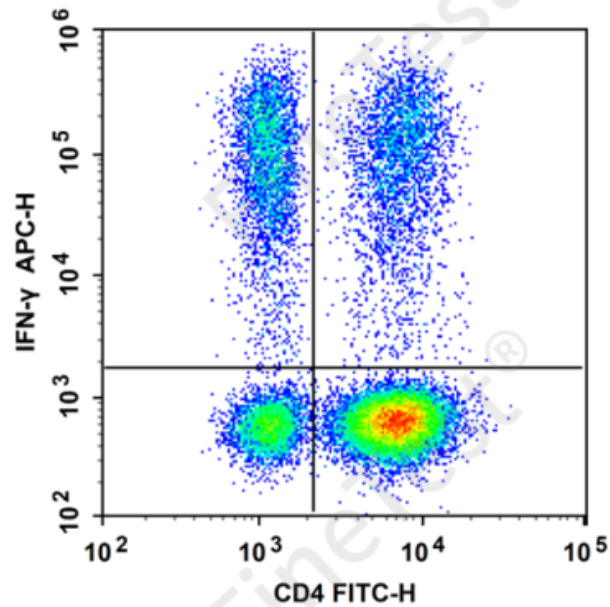
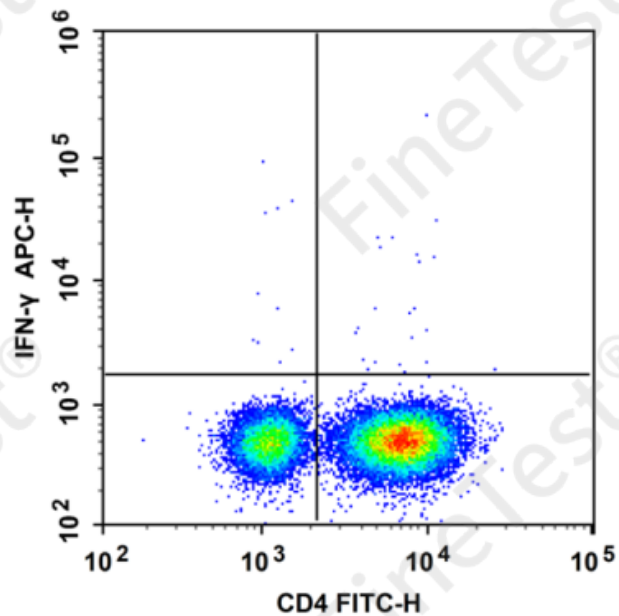
粒细胞:1.08-1.095g/mL

红细胞:1.09-1.11g/mL

何时需要制备PBMC

研究的对象是淋巴亚群或者单核细胞，样本需要做体外培养刺激、阻断

TH1细胞检测



何时需要制备PBMC

单核细胞诱导为巨噬细胞

- ① 在无菌条件，从全血中分离PBMC。
- ② RPMI 1640完全培养基的配制：加入**胎牛血清(最终浓度达10%)**和2mM**左旋谷氨酰胺到RPMI 1640 培养基**。使培养基的温度达到37°C。可选：添加1%的青霉素-链霉素(**5000单位/mL**)。
- ③ 重悬细胞于**RPMI 1640**完全培养基中，使细胞浓度达**2x10⁶个细胞/mL**。
- ④ 将细胞溶液转移到细胞培养皿中。
- ⑤ 在**37°C、5% CO₂**的培养箱中培养**24小时**，使单核细胞贴壁。
- ⑥ 在无菌锥形管中，制备含**40-50ng/mL M-CSF**的RPMI 1640完全培养基。可选：**加入20ng/mL的IL-4**。
- ⑦ 用含M-CSF和IL-4的培养基替换培养皿中的培养基。
- ⑧ 在37°C、5% CO₂的培养箱中培养细胞6天。在这6天内，每隔3-4天，**补充含40-50ng/mL M-CSF的RPMI 1640完全培养基**(可选：加入20ng/mL的IL-4)。用显微镜检查细胞健康和生长密度。
- ⑨ 当细胞质中出现很多颗粒，且细胞略有伸长时，就可以收集细胞。此外，大量的细胞应贴附于培养板上。当收集细胞时，丢弃旧培养基，用**1XPBS冲洗培养皿**两次，每次冲洗后都**丢弃PBS**。
- ⑩ 向每个培养皿加入**10mL 10mM EDTA**，在**室温静置10分钟**或直到细胞不再贴附于培养皿。
 - k 将细胞收集在**50mL**锥形管中，在室温下**300-400xg离心4-5分钟**。
 - l 必丢弃上清液，并用**1X PBS**冲洗细胞。**300-400xg离心4-5分钟**。
 - m 丢弃上清液，用流式染色缓冲液或培养基重悬细胞。

分离PBMC注意事项

- 1.选择合适的分离液：**不同种属动物单个核细胞的比重有一定差异，请选择合适的分离液进行PBMC的分离。
- 2.血液新鲜程度：**血液新鲜程度是影响分离效果的关键因素，请采血后2小时内进行PBMC分离。
- 3.操作轻柔：**为保证细胞的活力，整个操作过程请轻柔，避免对细胞造成机械性的损伤。
- 4.离心温度：**温度太高或者太低都会影响分离效果，大约20~25℃最佳。
- 5.离心条件：**在进行密度梯度离心时，设置较慢的加速度和减速度。
- 6.避免Ficoll接触：**吸取单个核细胞时不可避免会吸到Ficoll，而Ficoll密度比细胞要大，因此需加入足量PBS稀释，若PBS体积太小可能会导致细胞无法离心收集。
- 7.无菌操作：**确保使用试剂和耗材无菌和无菌操作。

PBMC冻存

1

冻存密度控制在 $5 \sim 10 \times 10^6/\text{mL}$;

2

细胞冻存液：90%的FBS+10%的DMSO;

3

-20°C冰箱暂存，然后转移到-80°C冰箱过夜，再放入液氮长期保存。

Tips：细胞因子最好在冻存3天内检测。

分离PBMC优缺点

优点	缺点
获得的细胞更纯净，有利于细胞培养后检测胞内因子	步骤复杂，需30 min以上
可将细胞冻存后再复苏培养检测	取白膜层需要经验丰富
去除死细胞	只能获得淋巴细胞和单核细胞，会丢失一部分稀有细胞
—	可能会引起细胞受体激活

02

贴壁细胞处理

贴壁细胞处理方式

贴壁细胞处理成单细胞悬液

机械法

- 1.培养皿中加入适量PBS，用细胞刮先以中心为圆心刮取细胞
- 2.将细胞悬液吹散，转移至EP管中，洗涤，染色

钙螯合法，酶消化法

- 1.将培养的细胞用10 mM EDTA-2Na处理约10 min或0.25% 胰蛋白酶（或者Accutase）消化几分钟，镜下见到贴壁细胞间出现筛状间隙为止，终止消化；
- 2.将细胞从瓶壁上轻轻吹打下来，移入离心管中，洗涤，染色

贴壁细胞不同处理方式优缺点

机械法

优点：操作简单，细胞抗原保存完好

缺点：可能导致大量细胞机械损伤

01

酶消化法

优点：高效、简便，细胞回收率和存活率高

缺点：可能显著改变细胞表面抗原表达

02

钙螯合法

优点：细胞表面抗原保存完好

缺点：耗时，细胞回收率和存活率低

03

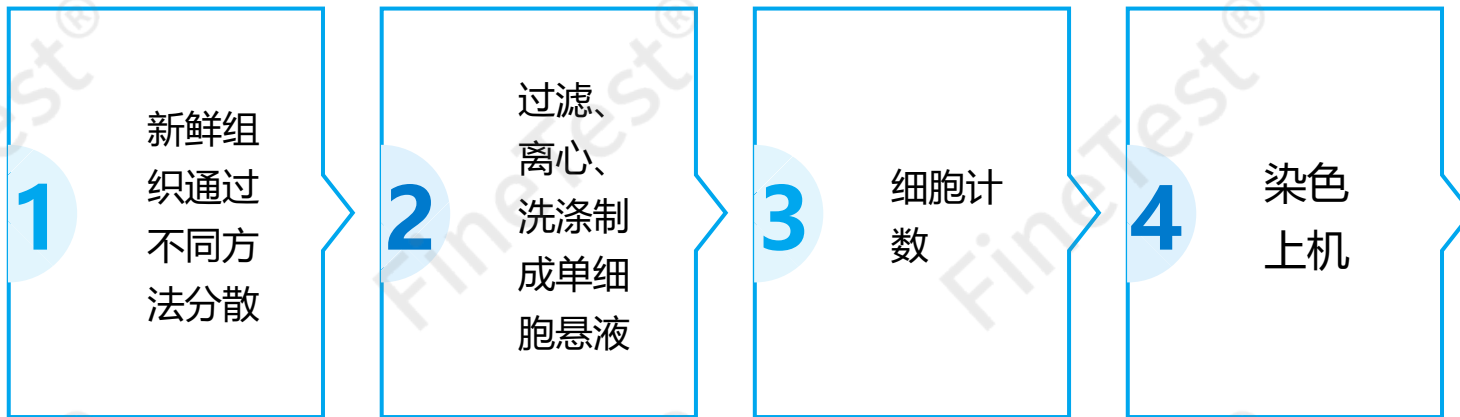
03

组织样本处理

组织样品处理方法

方法：机械法，酶解法

操作：

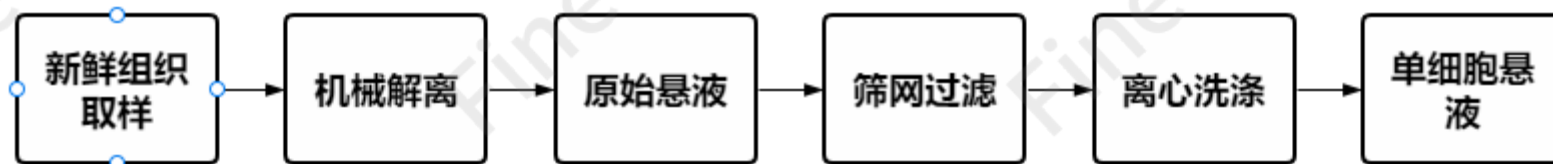


Tips:

机械法常常造成严重的细胞损伤，单细胞产量相对低。

酶解法对实体组织的分散解聚较理想，但处理不当对所测化学成分有不良影响。

组织样品处理-机械法



1

常用于处理软组织，如**脾脏**、**淋巴结**、**胸腺**等，因其含有丰富细胞且处理方式简单，主要采用单纯机械法即可获得大量高质量的单分散细胞，抗原活性保持良好，被实验者广泛采用。

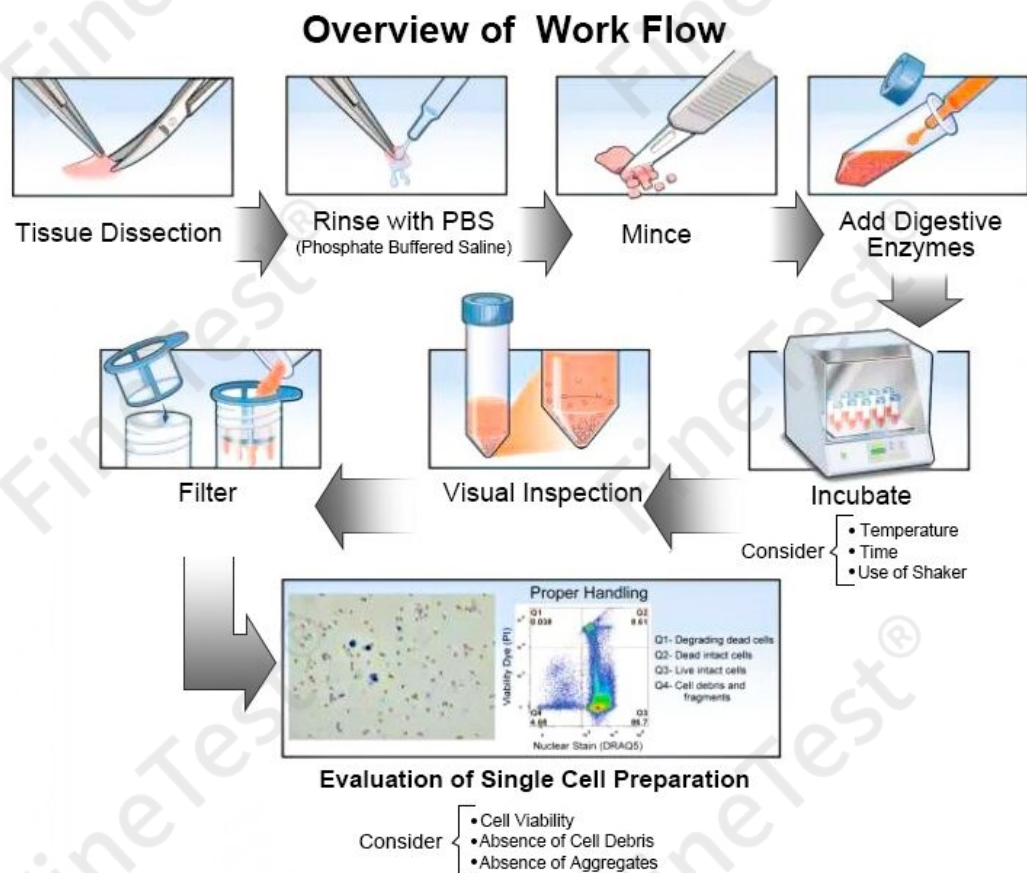
2

机械法：剪碎、研磨、网搓。

3

保存和处理样本建议在冰上或4°C的培养液中进行；机械法易造成细胞碎片和细胞团块，且部分组织含有大量红细胞，所以机械法常与其它方法配合使用。

组织样本处理-酶解法 (实体组织)



- 不同组织取材方法，酶解方法差异很大，参考文献。
- 如果消化时间过短，会导致细胞得率低，实验背景干扰增大，从而影响最终的实验结果。
- 如果消化时间过长，会导致细胞活力下降，细胞表面标志物发生改变，从而影响最终的实验结果。
- 获得的细胞需要染死活染料和CD45荧光抗体。

组织样品处理-常用酶

分类		原理	应用	注意事项
胰蛋白酶		作用于赖氨酸或精氨酸结合的肽键，除去细胞间粘蛋白及糖蛋白，影响细胞骨架，从而分离细胞	用于消化细胞间质较少的软组织，如胚胎、上皮、肝、肾等组织；不适用于纤维组织和较硬的癌组织	EDTA可以用来增强胰蛋白酶的水解功能，血清会影响胰蛋白酶的活性
胶原酶	胶原酶I	水解细胞间质的脯氨酸，分离细胞，仅对细胞间质有消化作用，对细胞的损害小	消化上皮、肺、脂肪、肾上腺上皮细胞	钙镁离子和血清不会对胶原酶的活性及消化作用产生影响
	胶原酶II		消化肝脏、骨、软骨、肿瘤、甲状腺、心脏、唾液腺组织细胞	
	胶原酶III		可消化所有哺乳动物组织	
	胶原酶IV		可消化多种组织	
	胶原酶V		消化胰岛小岛组织	
透明质酸酶		通过随机降解透明质酸的6-N-乙酰己糖胺-[1-4]糖苷键，降低透明质酸的活性	常和胶原酶搭配，消化结缔组织	常规情况下较稳定，不会分解
DNaseI		作用于细胞分离降解出的DNA，避免DNA引发的细胞凝集，对细胞完整性无破坏作用	常配合胶原酶或透明质酸酶等联合使用，一般不会单独使用	EDTA等金属离子螯合剂，达到mmol/L浓度的锌离子，0.1%的SDS，DTT、巯基乙醇等还原剂，50-100 mM以上盐浓度均对DNaseI有显著抑制作用

不同组织常用消化方案

类别	组织	消化酶
小鼠-正常组织	心脏	胶原酶IV(0.1%)
		胰蛋白酶 (0.2%)
	肺	弹性蛋白酶(4 U/mL)
		中性蛋白酶(1 U/mL)
		DNaseI (200 ug/mL)
	胸腺	胶原酶D(0.125%)
		DNaseI (0.1%)
	胃	中性蛋白酶 II (0.72 mg/mL)
		胶原酶A(1 mg/mL)

参考文献选择 合适酶，经费 充足可以买组织 解离试剂 盒

小鼠肿瘤组织处理

- 1.将肿瘤转移到C管中。
- 2.在C管(GentleMACS C Tubes)内用剪刀将肿瘤剪20-30次，使其碎裂成2-4mm的小碎块。
- 3.向每个C管中加入3mL的消化混合物，然后紧闭（扣紧两次）。
- 4.将C管放入GentleMACS Octo解离器中，运行m_tumor_imp_03程序两次。将C管放置在37°C的旋转平台上的恒温箱中孵育30min，或在37°C的摇动水浴中孵育30min。
- 5.从孵育箱中取出C管，用高速旋涡混合10s。
- 6.通过加入7mL的冷终止缓冲液来中止消化酶，该缓冲液含有血清和EDTA。
- 7.将内容物（大约10mL）倒入一个带有100um滤网的标记的50mL圆锥管中。
- 8.使用注射器柱塞的背面擦洗滤网，以打散任何剩余的块状物。
- 9.用另外5mL的终止缓冲液冲洗C管，并将液体倒入滤网中（总计约15mL）。
- 10.将所有肿瘤样本在4°C下以500 x g的速度离心5min，并在1mL的完整培养基中重悬。
- 11.使用NucleoCounter以1:10的计数稀释比例对肿瘤浸润细胞进行计数。

➤ 消化混合物（保持在室温下）

- ① 250 U/mL Collagenase Type 4
- ② 100ug/mL DNase1
- ③ 5 mM Calcium Chloride
- ④ 4.5% Heat-inactivated FBS
- ⑤ in HBSS without Calcium and Magnesium
- ⑥ 注:每1克肿瘤需要约3毫升的消化

➤ 混合物淬灭缓冲液(在冰上保持低温)

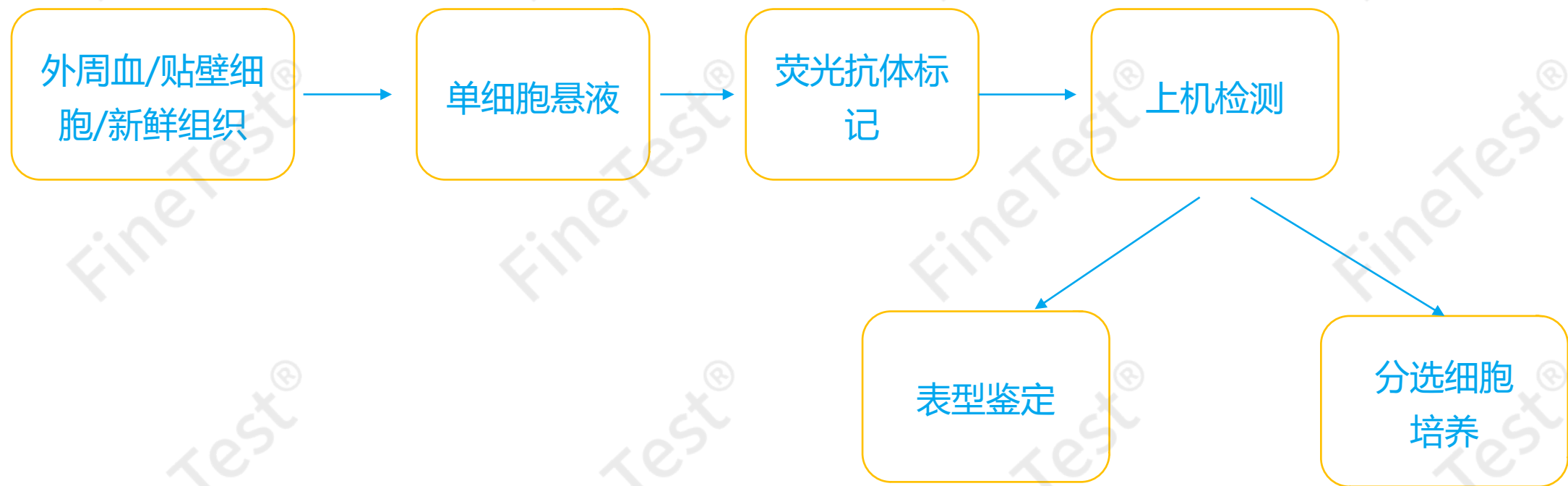
- ① 10% Heat-inactivated FBS
- ② 2 mM EDTA
- ③ in RPMI1640

OMIP-105: A 30-color full-spectrum flow cytometry panel to characterize the immune cell landscape in spleen and tumor within a syngeneic MC-38 murine colon carcinoma model

04

流式实验流程

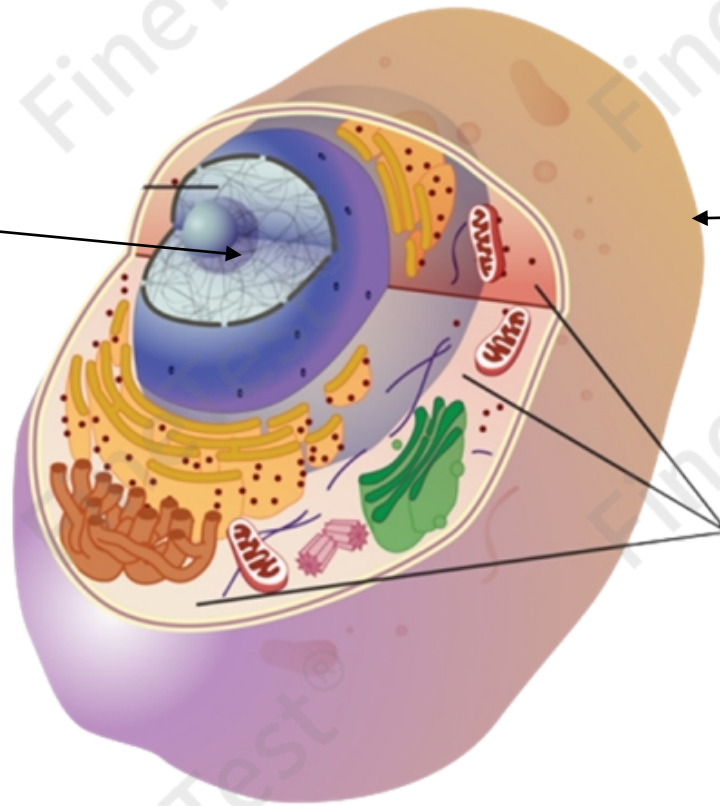
流式实验流程



Marker的表达位置

细胞核

转录因子和组蛋白
需要固定破核膜后在染色



细胞膜

细胞表面蛋白
CD系列
直接活细胞表染

细胞质

检测细胞内细胞因子
白介素系列，干扰素等
需要固定破胞膜在染色

- 选购固定破核膜和固定破胞膜的试剂盒需要注意区分。
- 同时需要注意固定破膜对表染荧光的影响。

细胞因子检测实验流程

1

调整细胞浓度至 $1 \times 10^7/\text{mL}$ ，取100uL细胞/管(约 1×10^6 个细胞)于流式管内

3

(可选)每管中分别加入商业化的Fc受体阻断剂，混匀后，室温避光孵育10min

5

孵育完成后加入2 mL细胞染色缓冲液重悬细胞300g离心5min，弃上清

7

加入1 mL $1 \times$ Permeabilization Buffer，涡旋混匀，600g离心5min，弃上清

9

加入2mL细胞染色缓冲液，600g离心5min，弃上清

2

(可选)根据说明书进行Fixable Viability Dye (死活细胞鉴定染料)染色

4

按照实验设计及说明书的推荐用量加入表面荧光标记抗体，混匀，4°C避光孵育30min

6

加入200L细胞染色缓冲液重悬细胞，加入200uL等体积的Fixation Buffer，涡旋混匀，室温避光固定30-60min

8

加入100 uL $1 \times$ Permeabilization Buffer重悬细胞，按照实验设计及说明书的推荐用量加入相应的胞内检测抗体，轻轻吹打混匀，室温避光孵育30min

10

加入0.2ml细胞染色缓冲液重悬细胞，用流式细胞仪进行检测和分析

Tips: 只做表面染色，直接从第5步到第10步

核内因子检测流程

1

调整细胞浓度至 $1 \times 10^7/\text{mL}$ ，取100uL细胞/管(约 1×10^6 个细胞)于流式管内

3

(EcR封闭，步骤可选)封闭Fc受体能减少染色过程中的非特异性染色

5

孵育完成后，加入1 mL细胞染色缓冲液，300g离心5min，弃上清，再加入100uL细胞染色缓冲液，重悬细胞

7

加入2 mL 1×Permeabilization Working Solution重悬细胞，600g离心5min，弃上清。重复一次

9

加入2mL 1×Permeabilization Working Solution，600g离心5min，弃上清

2

(可选)根据说明书进行Fixable Viability Dye (死活细胞鉴定染料)染色

4

按照实验设计及说明书的推荐用量加入表面荧光标记抗体，混匀，4°C避光孵育30min

6

加入1 mL 1x Fixation Working Solution，涡旋混匀，4°C避光反应30 min；反应完成后，600g离心5min，弃上清

8

加入100uL 1×permeabilization Working Solution重悬细胞，再加入按照实验设计及说明书的推荐用量加入相应的核内检测抗体，混匀后室温避光孵育30min

10

加入200uL细胞染色缓冲液，重悬细胞，即可上机检测

菲恩生物流式抗体优势

产品优势:



出口品质:

源于经典克隆, 优异标记工艺



多种染料可选:

多色流式实验中表现出色

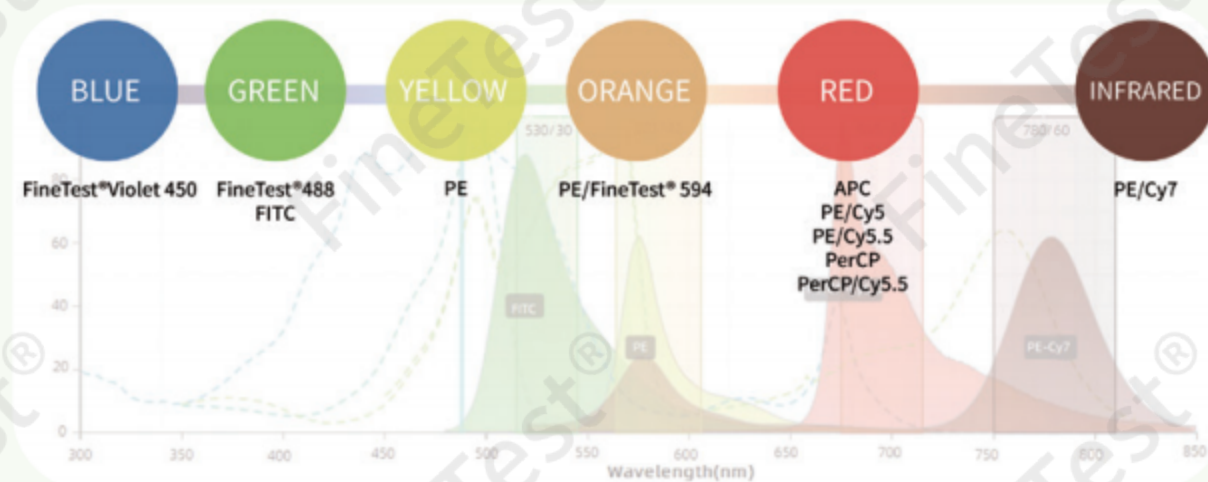


提供完整解决方案:

免费配色、实验指导和数据分析服务

染料标记类型:

现有超过十种染料类型, 满足多色流式实验配色需求。

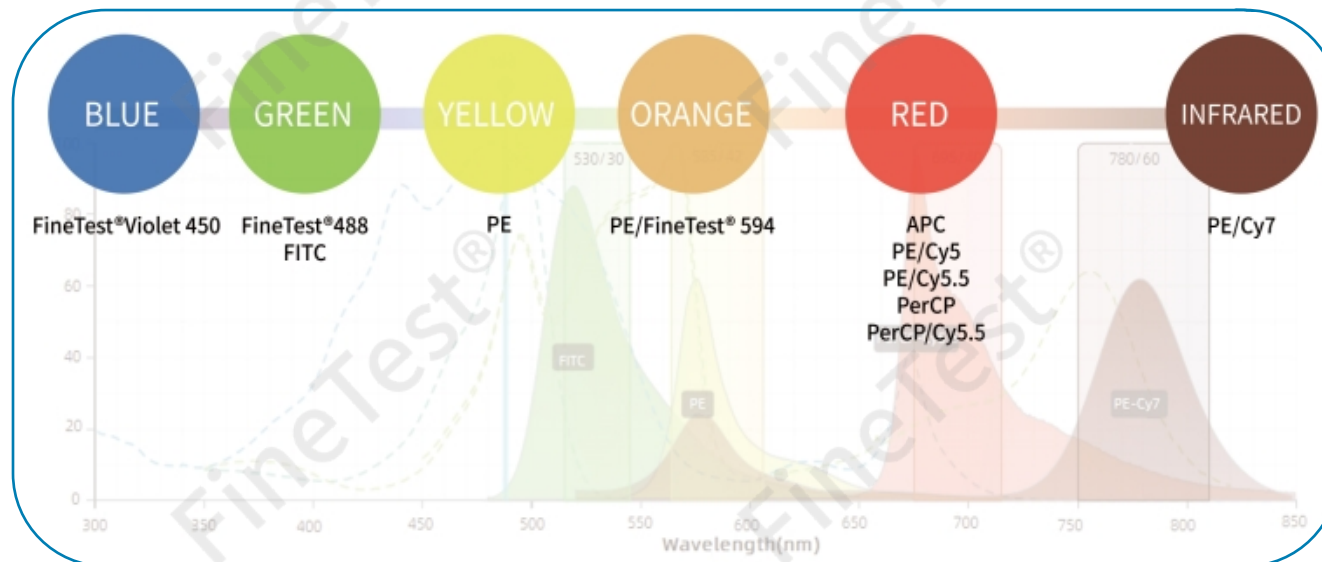


菲恩生物流式抗体近期活动



流式细胞术实验

答疑时间



应用案例

小鼠脾脏treg细胞检测实验流程

制备单细胞悬~液机械法

- 1、取出小鼠脾脏，并浸泡于干净的PBS溶液中。
- 2、将脾脏置于200目筛网（70μm细胞过滤器）中，用注射器胶塞轻轻研磨至没有明显红色块状物。
- 3、用10 mL PBS冲洗200目筛网（70μm细胞过滤器），并将冲洗液收集于15 mL离心管中，300 g离心5 min，弃上清。
- 4、加入2 mL 1×红细胞裂解液重悬细胞，室温裂解2~3 min后，立刻加入10 mL PBS，300 g离心5 min，弃上清。
- 5、用细胞染色缓冲液重悬脾脏细胞，将细胞悬液用200目筛网（70μm细胞过滤器）再次过滤后计数，并调整细胞浓度至 1×10^7 个/mL。

流式染色流程

➤ 1管细胞进行下面步骤

1. 取 100 μL 细胞/管（约 1×10^6 个细胞）于流式管内。
2. [可选步骤] 根据说明书进行 Fixable Viability Dye（死活细胞鉴定染料）染色。
3. [可选步骤] 根据实验需求对细胞悬液进行 Fc 受体封闭。
4. 加FITC-anti-mouse CD4和APC-anti-mouse CD25，4度反应30min。
5. 孵育完成后加入 1 mL 细胞染色缓冲液，300×g 离心 5min，弃上清，再加入 100 uL 细胞染色缓冲液重悬细胞。
6. 加入 1 mL 1×Fixation Working Solution，涡旋混匀，4°C反应 30min，反应完后，600×g 离心 5min，弃上清。
7. 加入 2 mL 1×Permeabilization Working Solution，涡旋混匀，600×g 离心 5min，弃上清。
8. 重复步骤 7。
9. 加入 100 μL 1×Permeabilization Working Solution 重悬细胞。
10. 加PE-anti-mouse foxp3，混匀后室温避光孵育 30 min。
11. 加入 2 mL 1×Permeabilization Working Solution，600×g 离心 5 min，弃上清。
12. 加入适量细胞染色缓冲液重悬细胞，即可上机检测。

➤ 还有1管细胞做同型对照组

同型对照组，只是第10步把PE-anti-mouse foxp3换成PE Rat IgG2a, κ Isotype Control，其他

谢谢观看

THANKS FOR WATCHING



武汉菲恩生物科技有限公司

公司概况

公司产品：ELISA试剂盒、抗体、蛋白、细胞功能试剂盒

研发团队：技术研发团队：由海内外教授、博士组成的研发和管理团队

公司人员：现有人员110余人，技术人员占比70%

公司荣誉：高新技术企业、科技小巨人、3551人才计划

质量体系：ISO9001:2015、CE认证

拥有专利：38项

累积文献：3800余篇

