

流式细胞仪的基本原理

MACSQuant[®] Analyzer 流式细胞仪培训

日程

- 流式细胞仪可以检测的细胞参数和应用
- 流式细胞仪参数的设置
- 数据的显示
- 数据分析: 逻辑设门, 排除设门, 统计

日程

- 流式细胞仪可以检测的细胞参数和应用
- 流式细胞仪参数的设置
- 数据的显示
- 数据分析: 逻辑设门, 排除设门, 统计

流式细胞仪能测什么？



细胞大小

细胞颗粒性

细胞表面标记和表型

细胞计数

核酸

细胞器

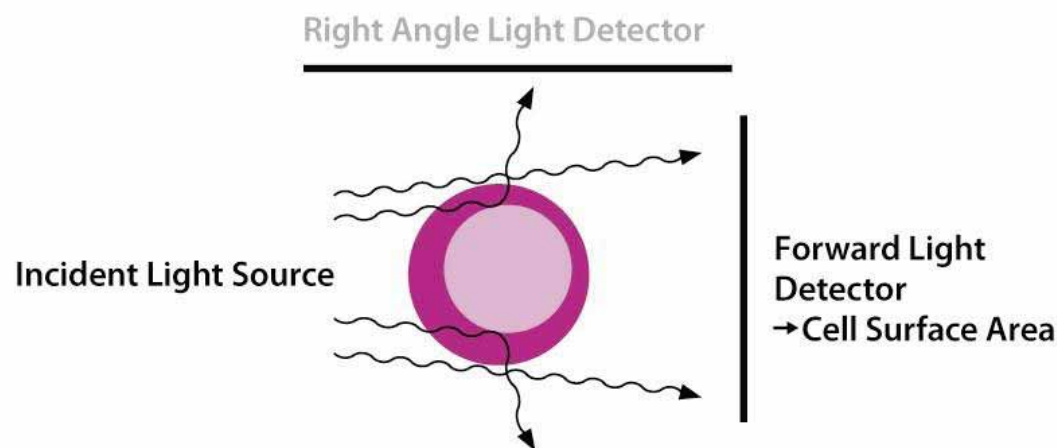
可以检测的细胞参数

散射光信号: 细胞的固有参数(无需荧光探针标记)

- 细胞大小
 - 细胞质的颗粒度
 - 细胞计数
- 角度小的散射光= 前散射(FSC)
角度大的散射光= 侧散射(SSC)
散射光或电阻

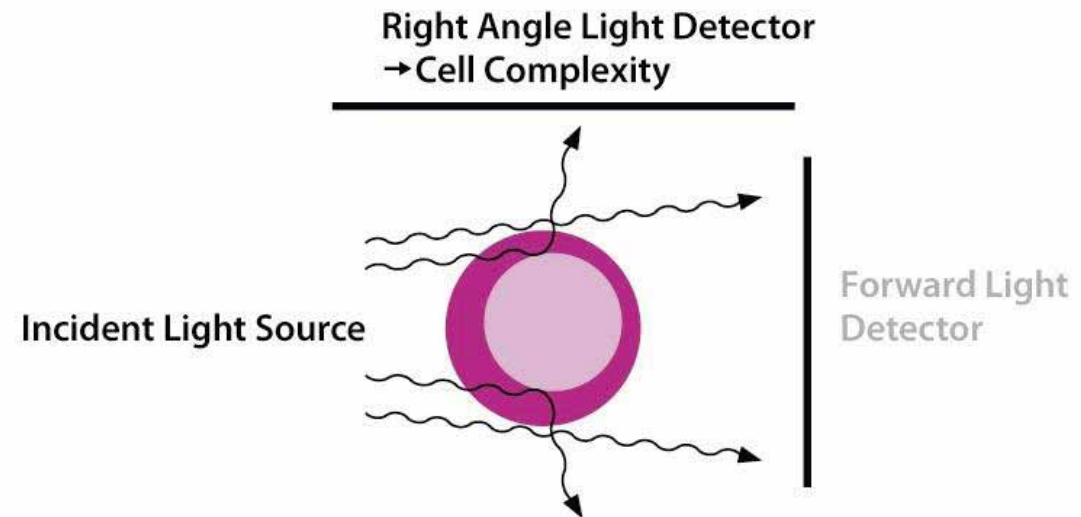
前向角散射光信号(FSC) – 检测相对的细胞大小

- 前向探测器检测到的散射光
(和激光束同轴的散射光)
- 前向角散射光信号的强弱与细胞大小成正比



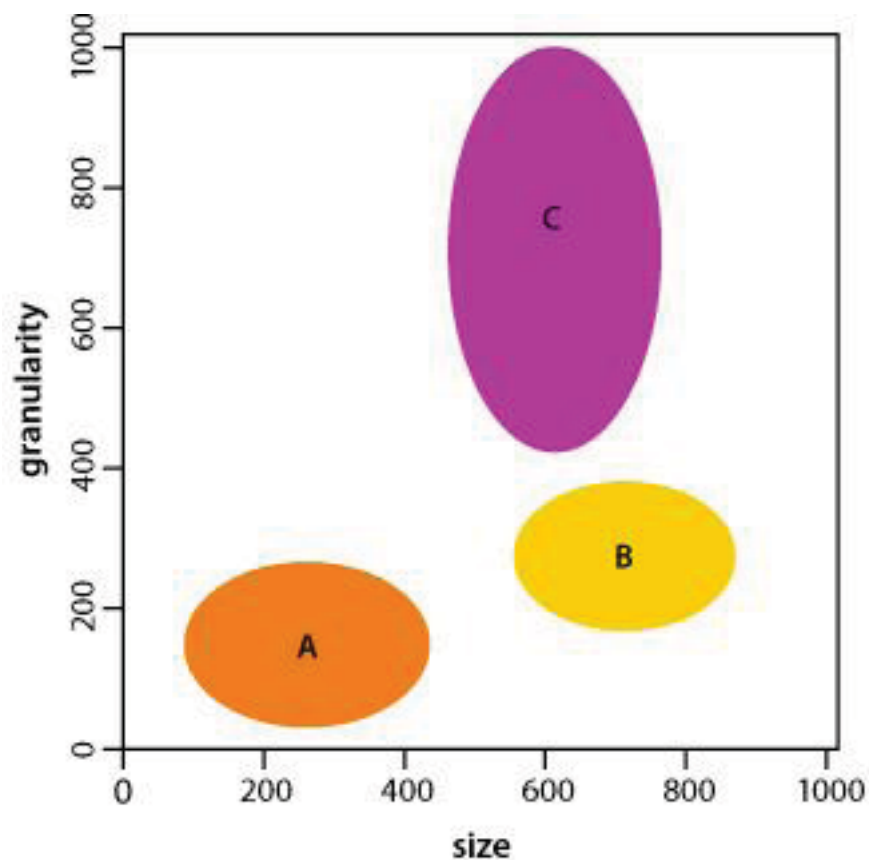
侧向角散射光信号(SSC) – 检测相对的细胞的颗粒性

- 与激光束垂直的散射光信号称为侧向角散射光信号 (**SSC**)
- **SSC**信号的强弱与细胞的形状和颗粒性有关



散射光信号可用于区分主要的细胞亚群

例如：人外周血单个核细胞



可测量的细胞参数

散射光信号: 内在的结构参数 (不需要探针)

- 细胞大小 小角度光散射 = 前向角散射 (**FSC**)
- 细胞颗粒性 大角度光散射 = 侧向角散射 (**SSC**)

荧光信号: 外在的结构和功能参数 (需荧光探针)

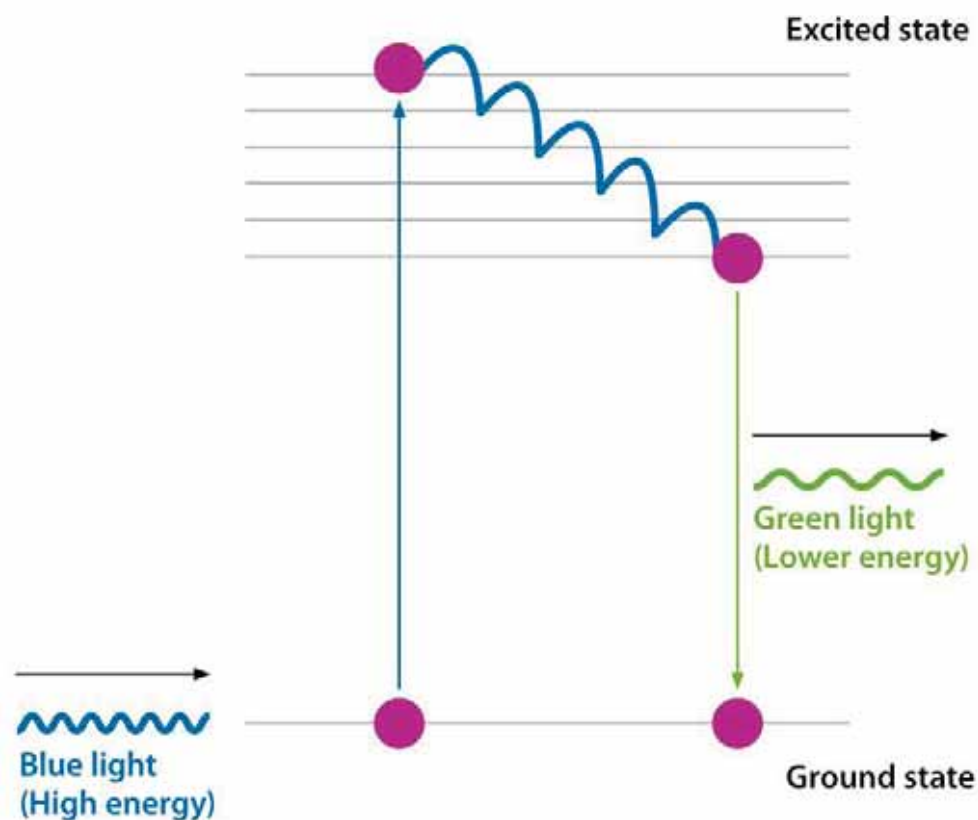
- 表面受体 例：标记抗体
- 活性 例：PI , 7-AAD
- **DNA/RNA** 含量 例：PI/AO
- 总蛋白 例：共价键或离子键的酸性结合染料
- 脂肪 例：Nile red
- 凋亡 例：Annexin V
- 细胞内蛋白 例：细胞因子，信号转导分子 (标记抗体)
- 酶活性 例：荧光底物
- **DNA** 合成 例：BrdU 染色 (增殖)
- 增殖 例：CFSE

什么是荧光



100

荧光的原理



荧光试剂的类型

■ 荧光探针

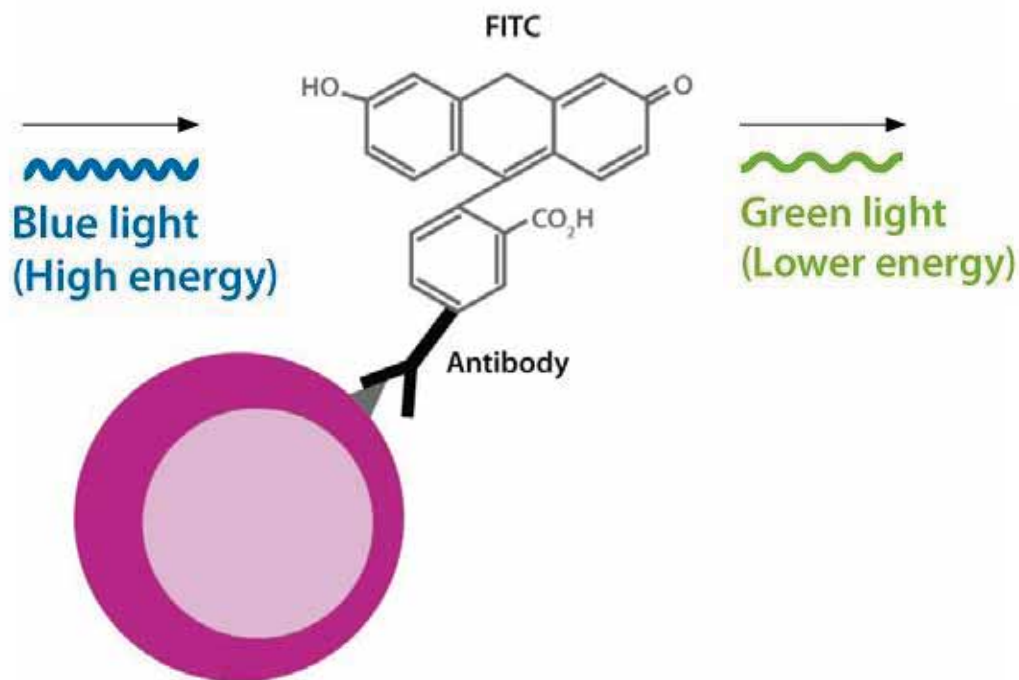
- Nile red – 检测脂肪含量
- CFSE – 标记所有蛋白; 检测细胞增殖
- Propidium iodide – 标记双链核酸; 用于检测细胞活性和DNA含量分析

■ 荧光蛋白

■ 耦联荧光染料的探针

- Annexin – 与凋亡和坏死细胞细胞膜表面外翻的磷脂酰丝氨酸结合
- 可溶的配体 – 与细胞的相应受体结合
- 抗体 – 根据抗体的特异性不同，抗体可以和所有的特异性分子结合

耦联荧光素的探针检测相应的细胞参数



免疫荧光标记

流式抗体的检测范围:

细胞表面蛋白

受体, 黏附分子, 配体, ...

细胞内蛋白

细胞因子, 酶, 骨架蛋白, 细胞信号分子,
转录因子, 核抗原, ...

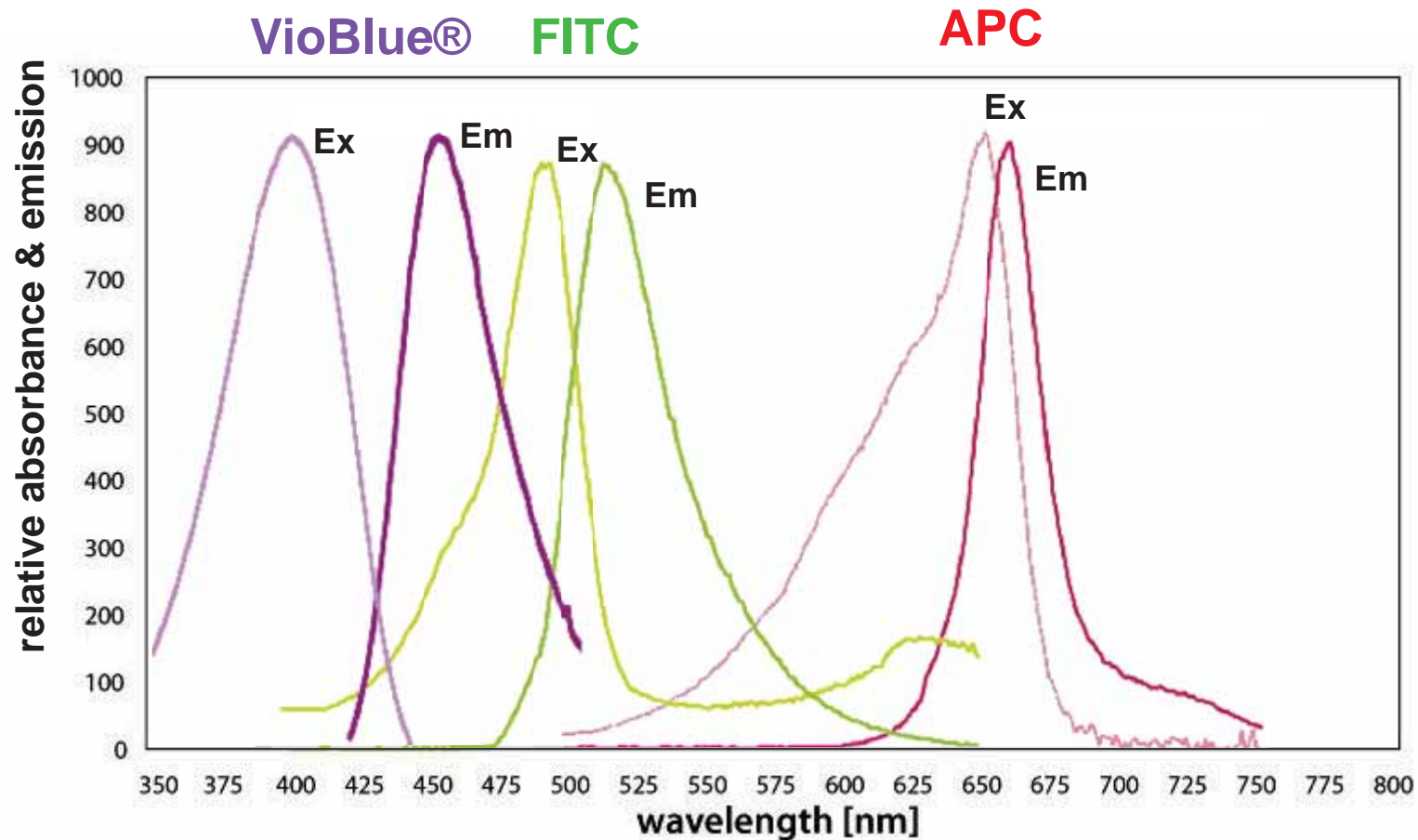
A 抗体标记



B 细胞固定+ 破膜



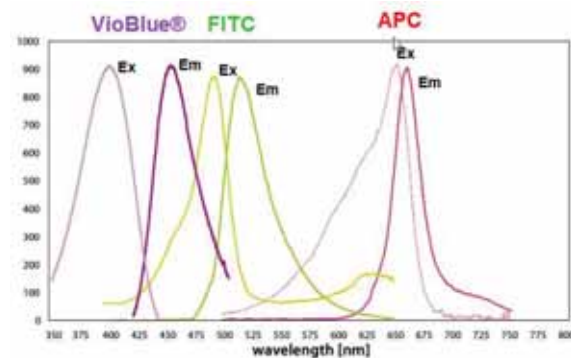
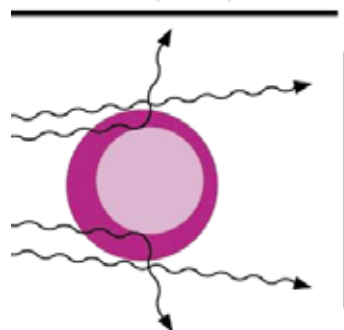
VioBlue, FITC & APC的激发光(Ex)和发射光(Em)光谱



MACSQuant® Analyzer的应用举例

- 7 色的免疫分型
- 死细胞，凋亡细胞的检测— PI, Annexin V
- 胞内染色(细胞因子, 转录因子)
- 细胞因子分泌检测
- 细胞周期分析— PI, BrdU
- 染色体分析
- 微泡分析
- 细胞计数
- 钙离子内流— Fluo4
- 检测ROS(H2DCFDA) and NO (DAF-FM diacetate)
- 用CFSE or CMFDA检测细胞增殖
- 报告荧光蛋白的检测 – GFP, CYP, YFP, tdTomato
- ...

总结: 可以检测的参数



日程

- 流式细胞仪可以检测的细胞参数和应用
- 流式细胞仪参数的设置
- 数据的显示
- 数据分析: 逻辑设门, 排除设门, 统计

流式细胞仪的主要构成系统:

■ 液流系统

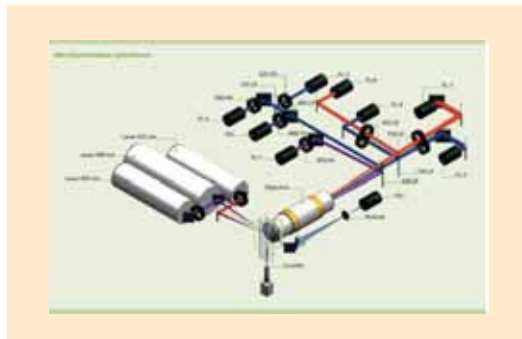
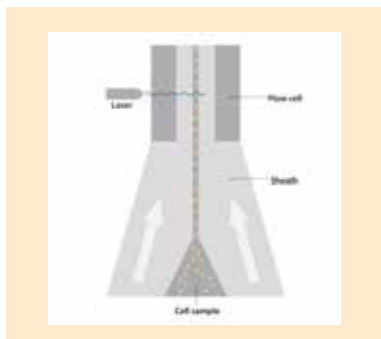
- 将颗粒带到检测点

■ 光学系统

- 产生和收集光学信号

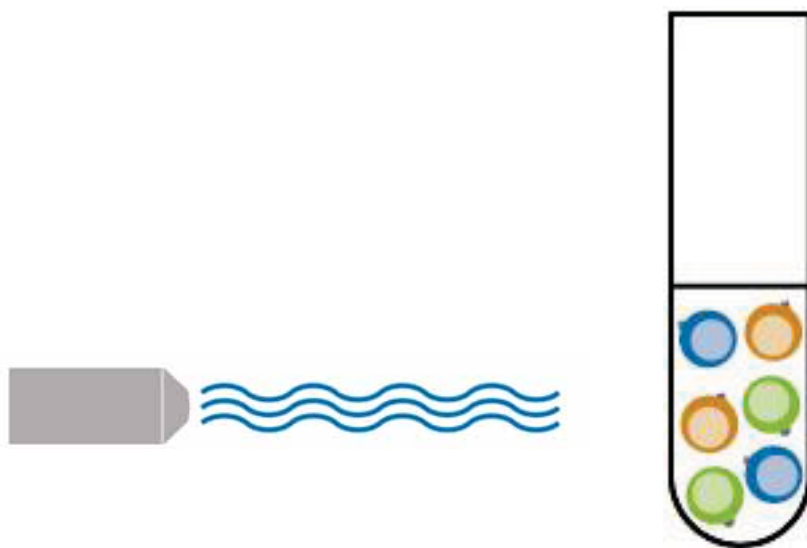
■ 电子系统

- 完成光电信号的转换及信号处理



液流系统

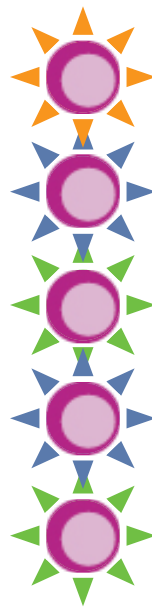
问题:
哪个信号是来自哪个细胞呢?



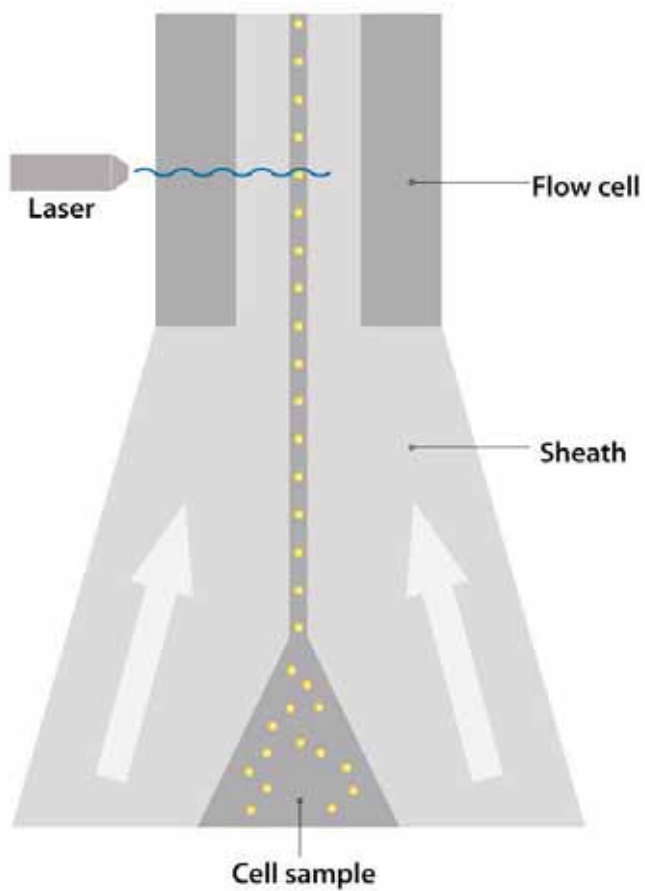
液流系统

解决方案:

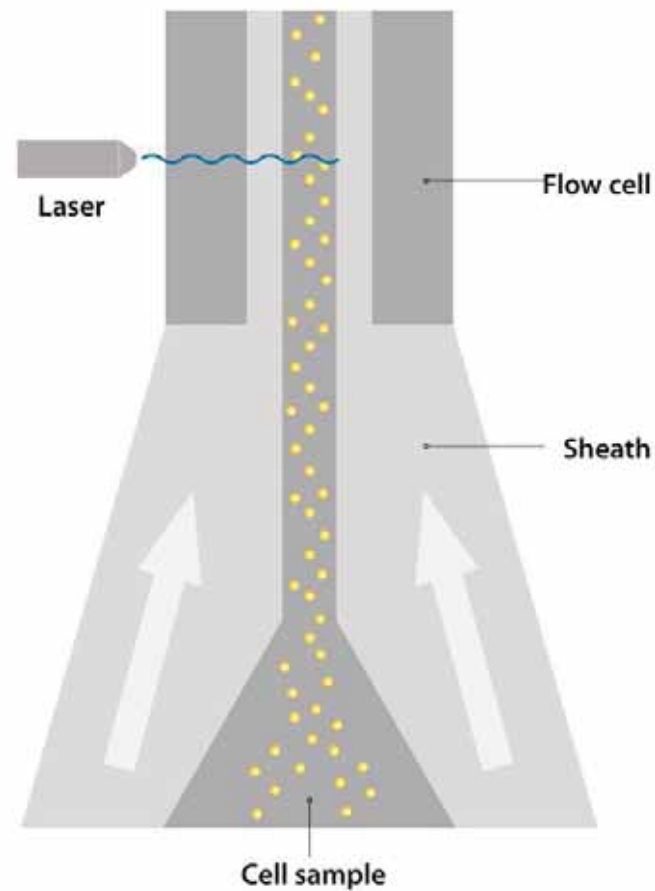
将细胞或其它生物微粒排成单列依次通过检测点



液流系统



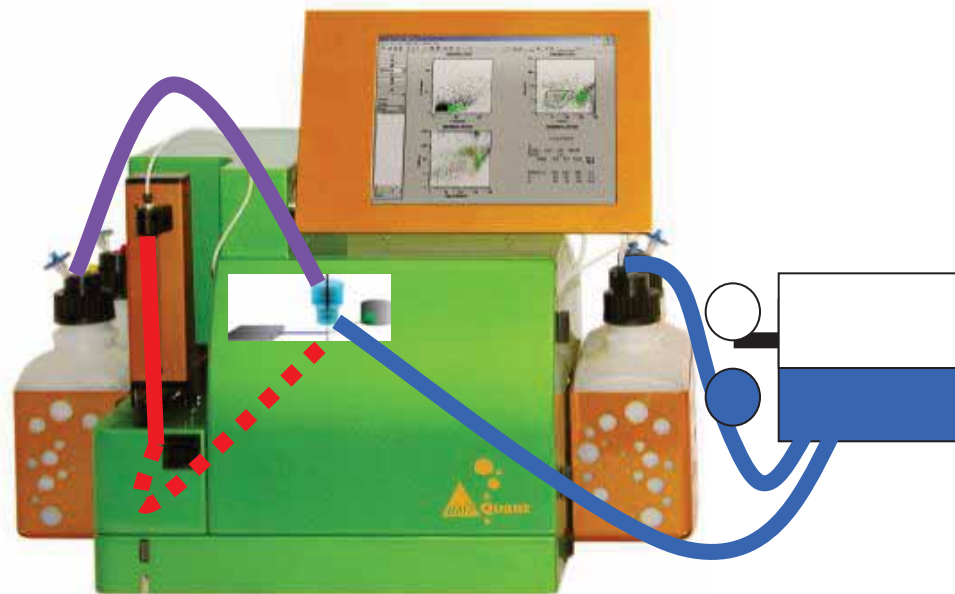
低压



高压

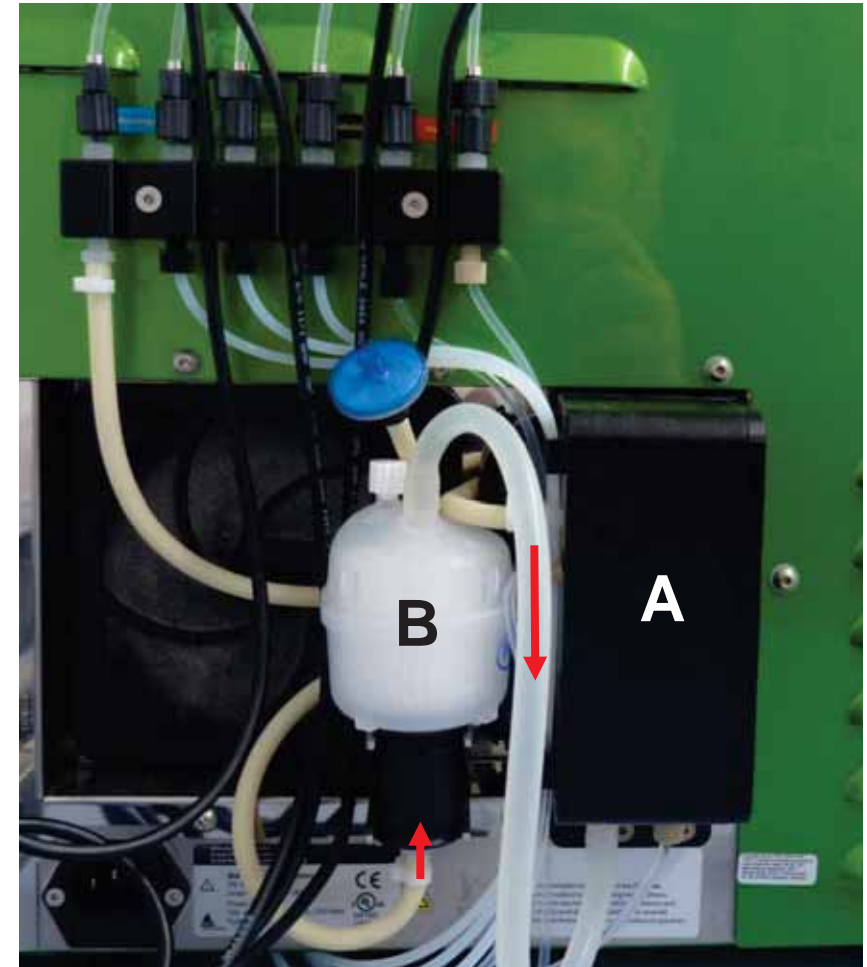
MACSQuant[®] Analyzer的液流系统 – 仪器前面

- 进样针
- 注射泵 (5ml, 0.5ml)
- 清洗工作站
- 压力感受器
- 细胞富集系统(分选) 柱



MACSQuant[®] Analyzer的液流系统 – 仪器后面

- A – 鞘液贮存器
- B – 盐滤器(过滤鞘液)
- 鞘液 & 空气压力泵(不可见)



MACSQuant[®] Analyzer的独特功能

固定体积上样

- 进样针可以吸取预先设定好进样体积的样品
- 进样体积会全部被检测
- 可以自动计算 **events / μ L或mL**
- 每次检测都能进行绝对计数
- 无需计数微球
- 三种不同的进样速度**25 / 50 / 100 μ L/min**



流式细胞仪的光学系统

组成部分:

- 光源
- 光学滤片和双色反射镜
- 检测用的光电倍增管(PMT)

光学系统: 光源- 激光

激光输出的光是:

- 单色光
- 相干光
(同相, 相同频率)
- 高密度
- 单向性



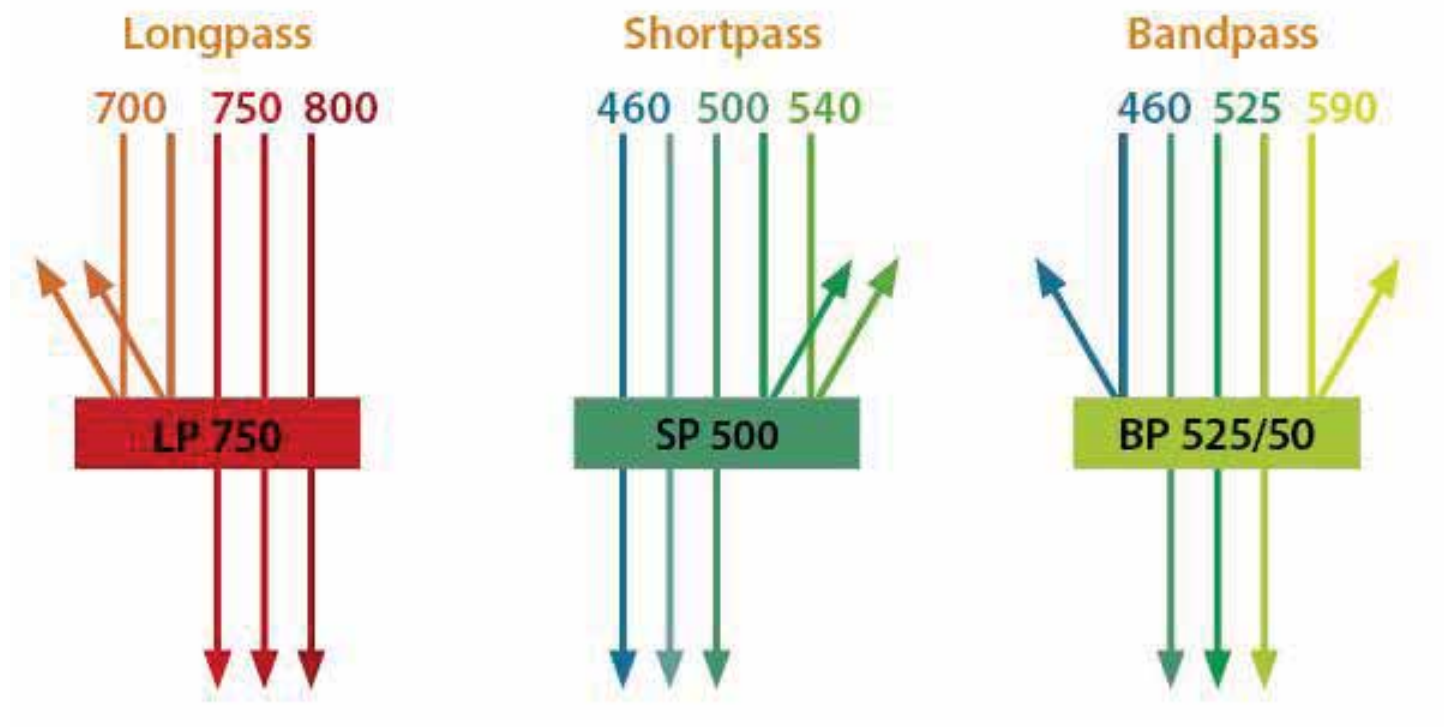
光学系统: MACSQuant[®] Analyzer 的激光

- 蓝激光(氩离子) **488 nm** **25 mW**
- 红色二极管激光器 **635 nm** **20 mW**
- 紫色二极管激光器 **405 nm** **40 mW**

流式细胞仪如何检测光信号？



光学系统：滤光片类型



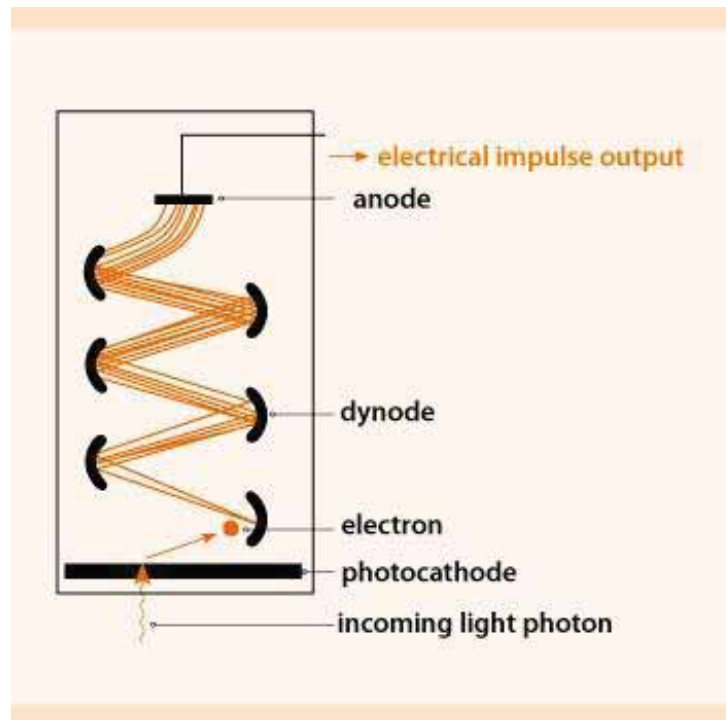
光学系统: 探测 (DETECTION)

- 细胞发射出的多种光学信号（散射光和荧光信号）通过不同的“通道” (**FSC, SSC, V1, V2, B1,...**)被同时捕获和检测
- 探测器的特异性是由滤光片和双色镜控制的
- 检测荧光信号的探测器(**Detector**)为光电倍增管(**PMT**)

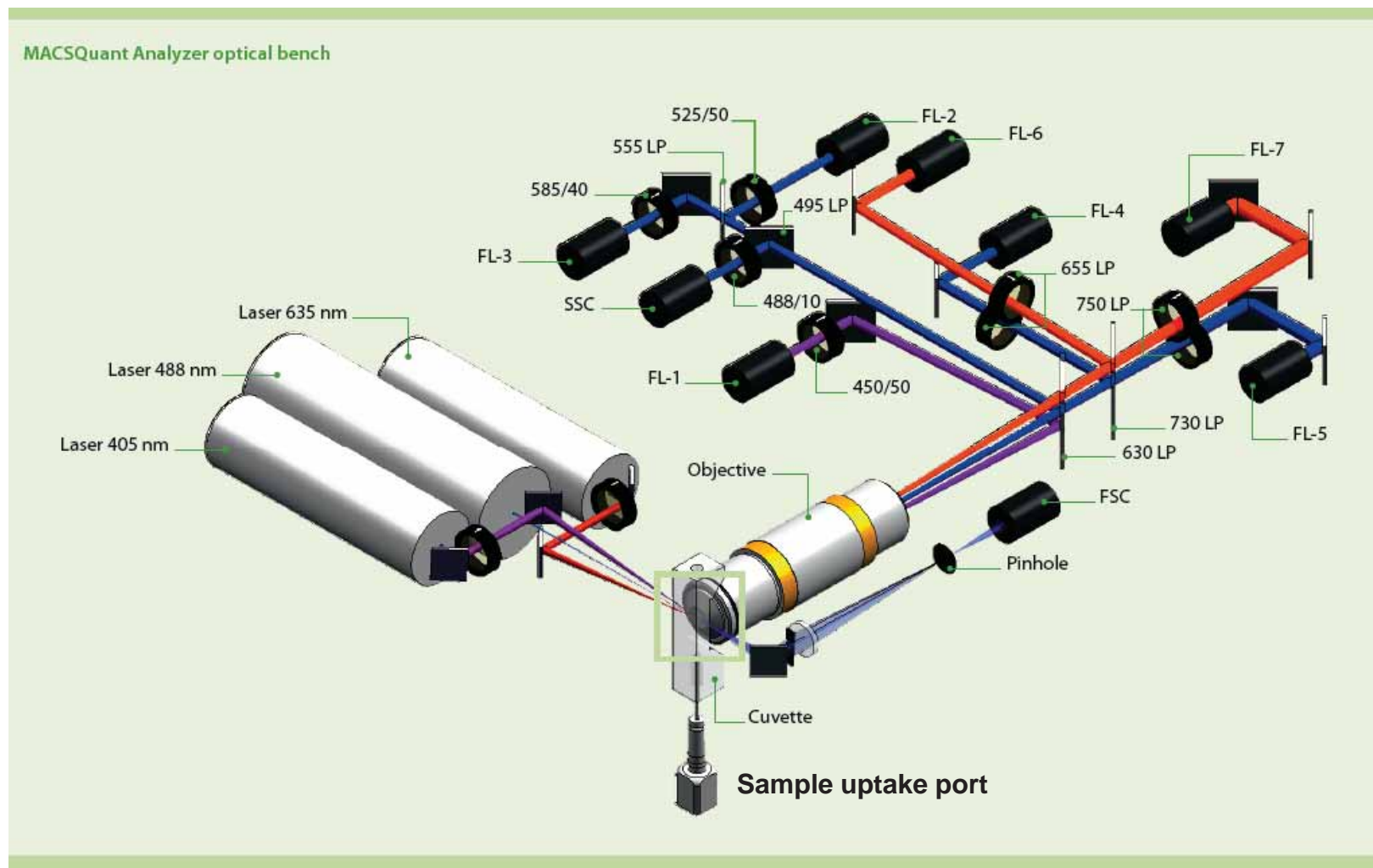
电子信号探测器：它们的作用是什么？

光电倍增管(PMTs):

- 检测光子
- 转换光信号到电信号
- 放大信号



MACSQuant[®] Analyzer的光学设置

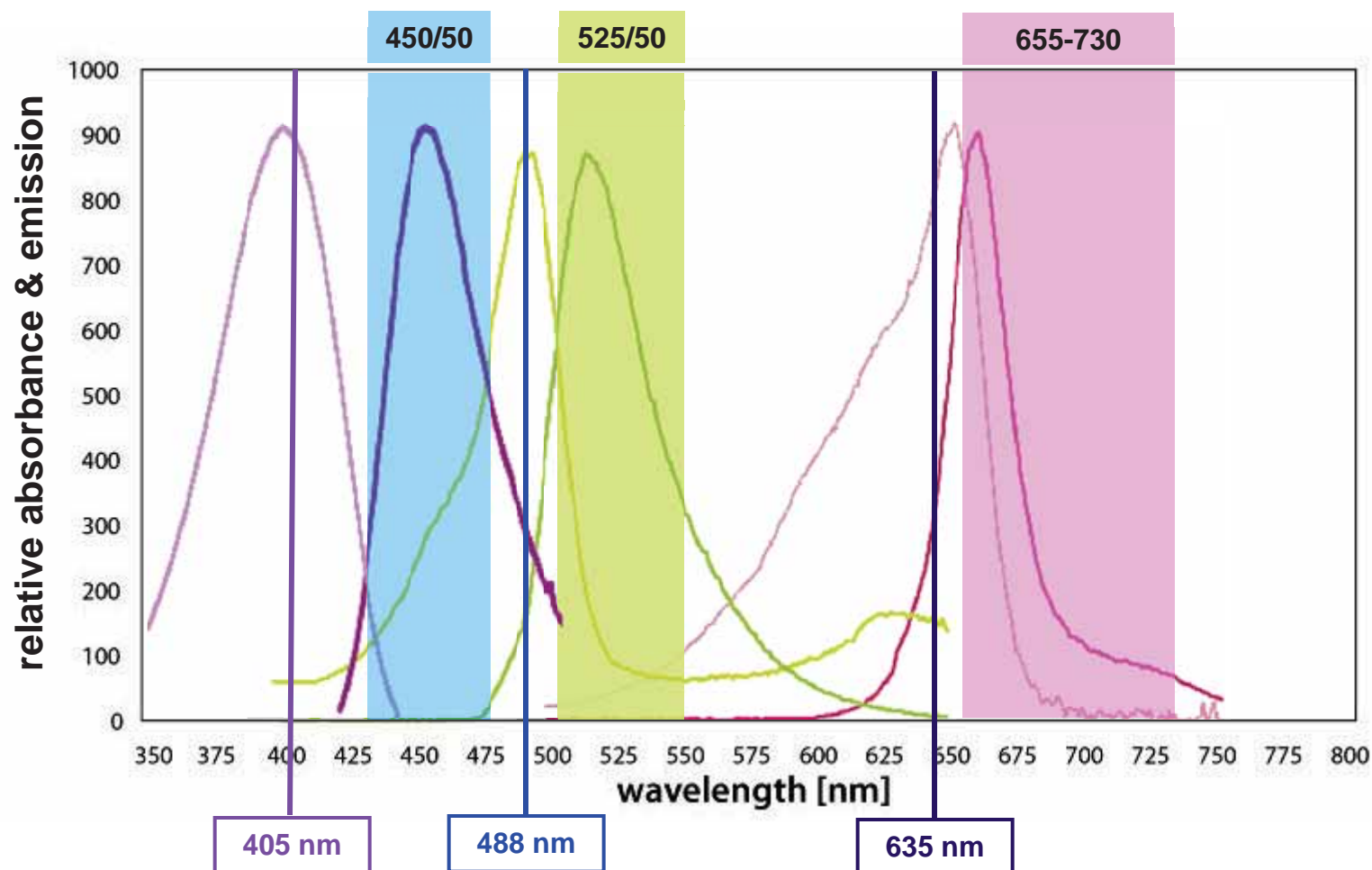


MACSQuant® Analyzer 的光学通道

Excitation	Channel	Filters	Detection range [nm]
405 nm	V1	450/50	425 - 475
	V2*	525/50	500 - 550
488 nm	B1	525/50	500 - 550
	B2	585/40	565 - 605
	B3	655 (LP) <small>+(730 LP DM)</small>	655 - 730
	B4	750 (LP)	750 -
635 nm	R1	655 (LP) <small>+(730 LP DM)</small>	655 - 730
	R2	750 (LP)	750 -
488 nm	FSC/SSC	488/10	

***MQ10 Only**

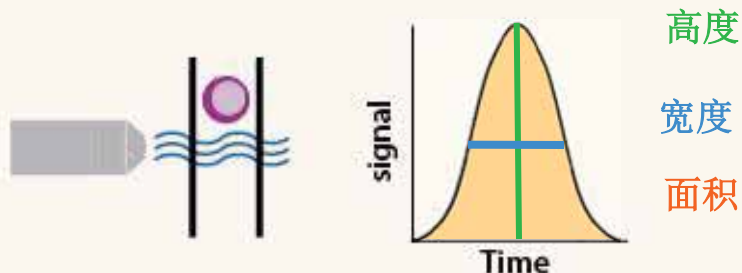
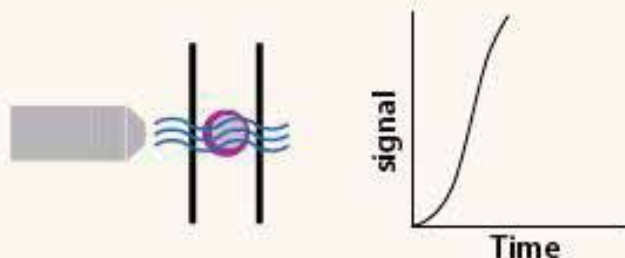
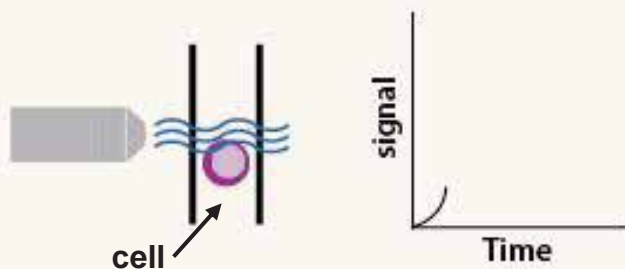
VioBlue, FITC & APC的激发光和发射光光谱



电子系统

- 数据转换的界面
- 将光学信号转化为相应比例放大的电信号 (电脉冲)
- 分析电脉冲的高度，面积或是宽度

电子系统 – 利用PMT转换光学信号



信号的强弱:

- 光子数量
- PMT 电压 / 放大

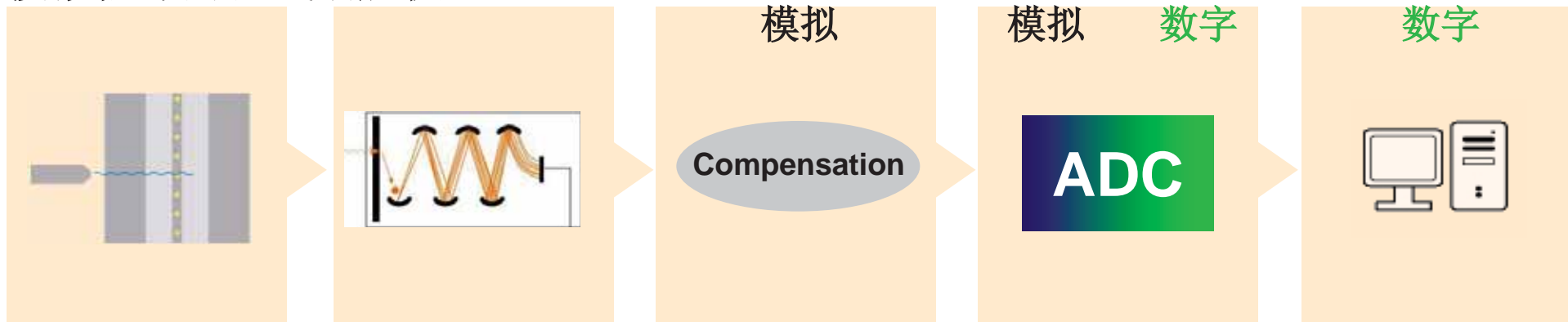
高度 = 信号的强度

宽度 = 细胞的大小

面积 = 高度和宽度的积分

信号转换

模拟信号的流式细胞仪

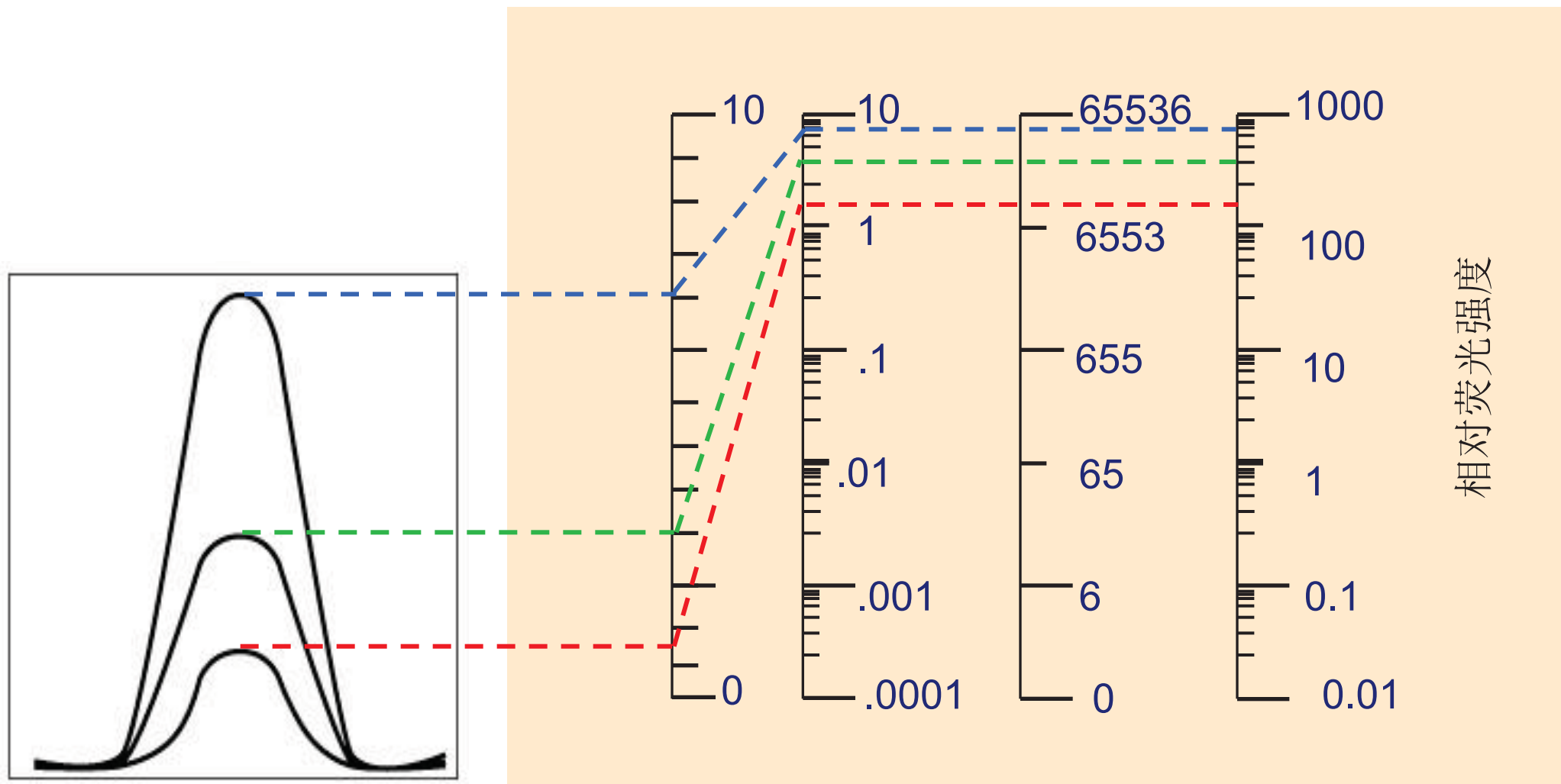


数字信号的流式细胞仪

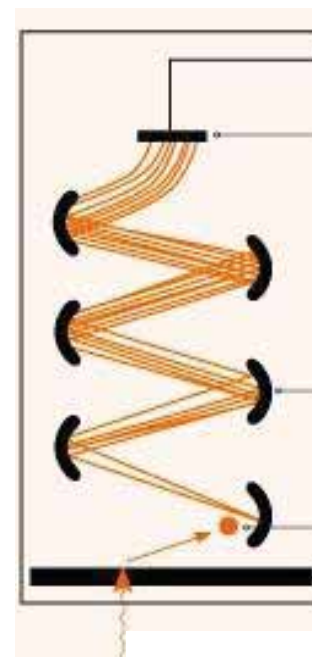
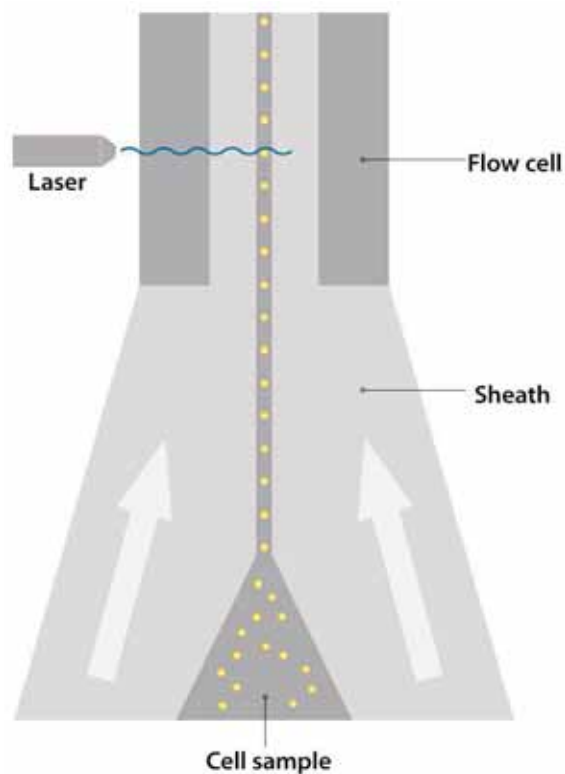


ADC = Analog to Digital signal Converter

电脉冲信号的数字化



总结：液流系统，光学系统，电子系统



Break



日程

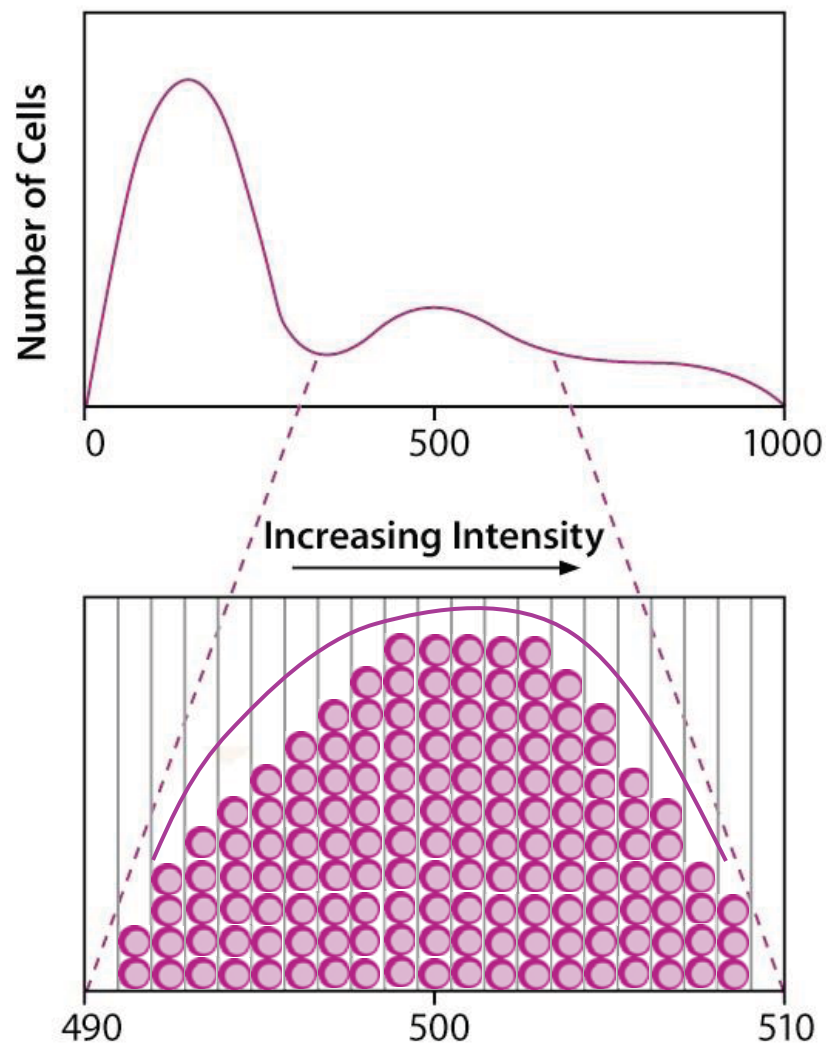
- 流式细胞仪可以检测的细胞参数和应用
- 流式细胞仪参数的设置
- **数据的显示**
- 数据分析: 逻辑设门, 排除设门, 统计

流式数据图

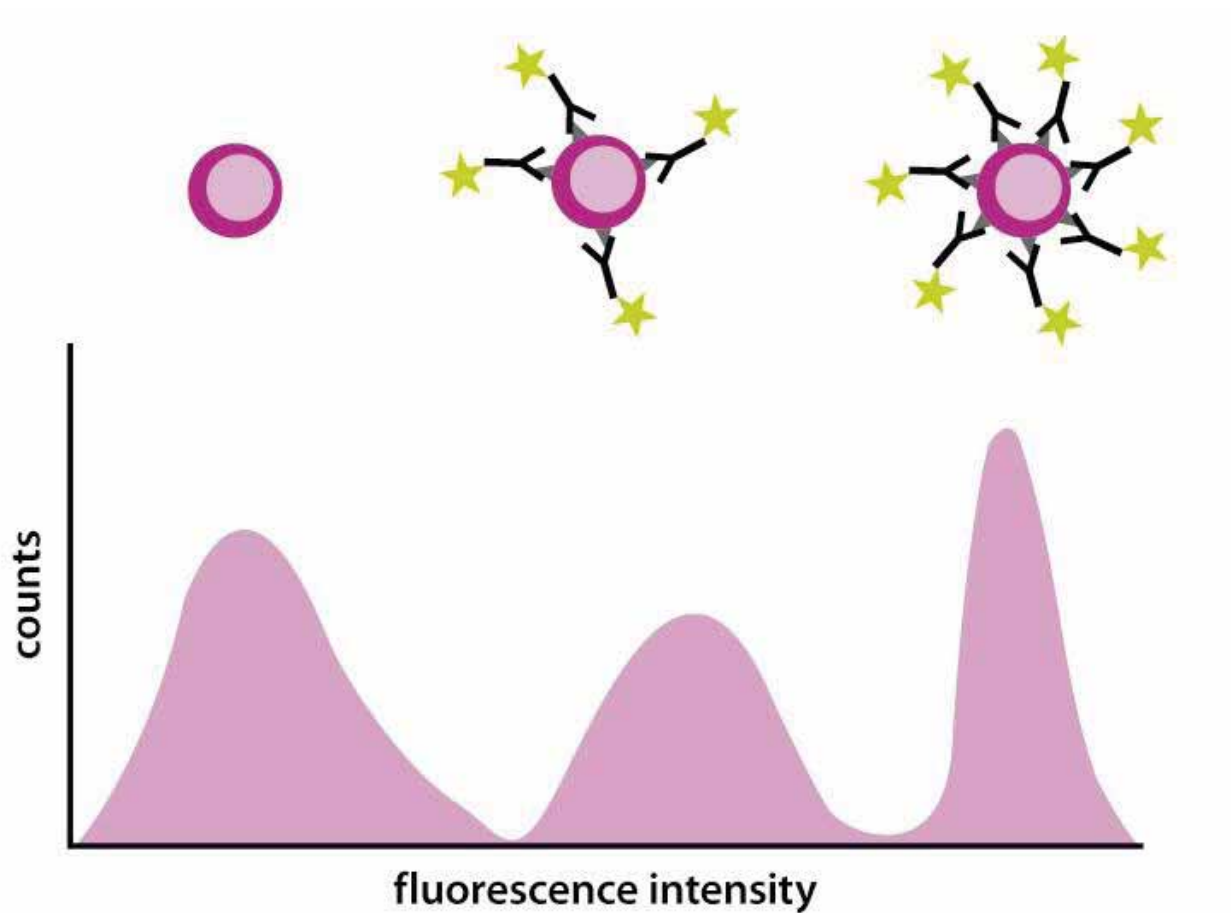
- 单光学参数图：
 - 直方图
- 双光学参数图：
 - 散点图
 - 密度图

直方图

	FSC	SSC	V1	
Event 1	30	60	500	←
Event 2	100	160	492	←
Event 3	300	650	505	←
Event 4	75	790	507	←
Event 5	121	322	507	←
Event 6	297	604	507	←

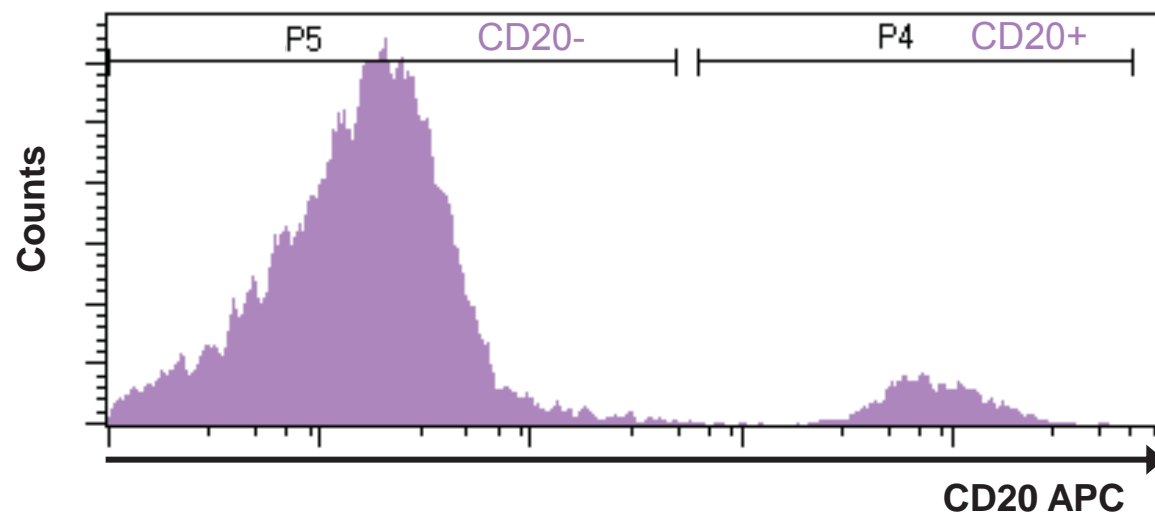


细胞上的荧光强度



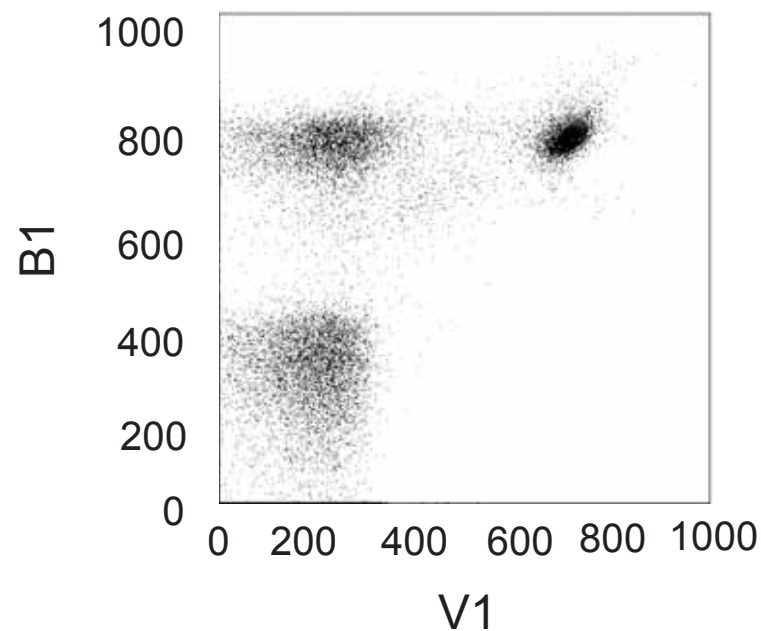
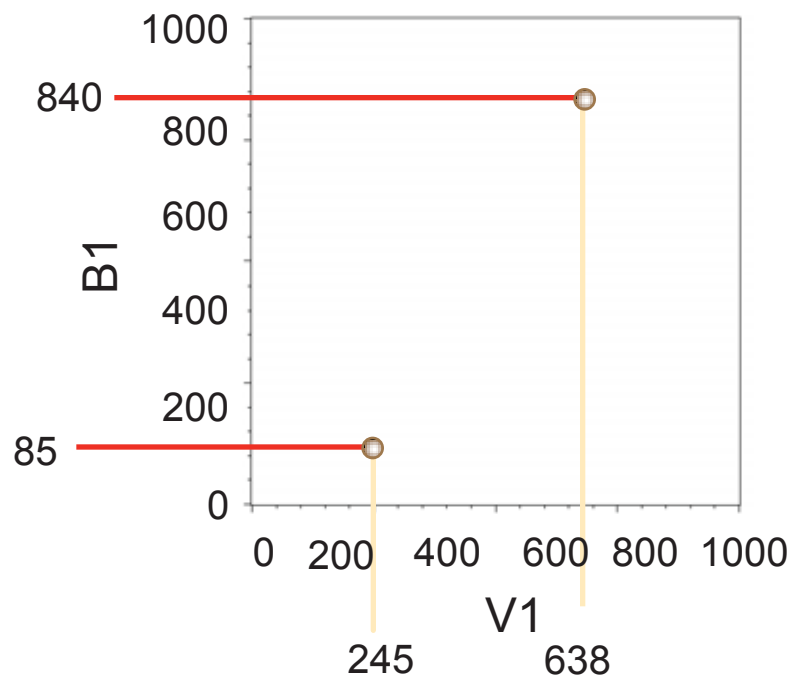
直方图

■ CD20 APC染色的PBMC

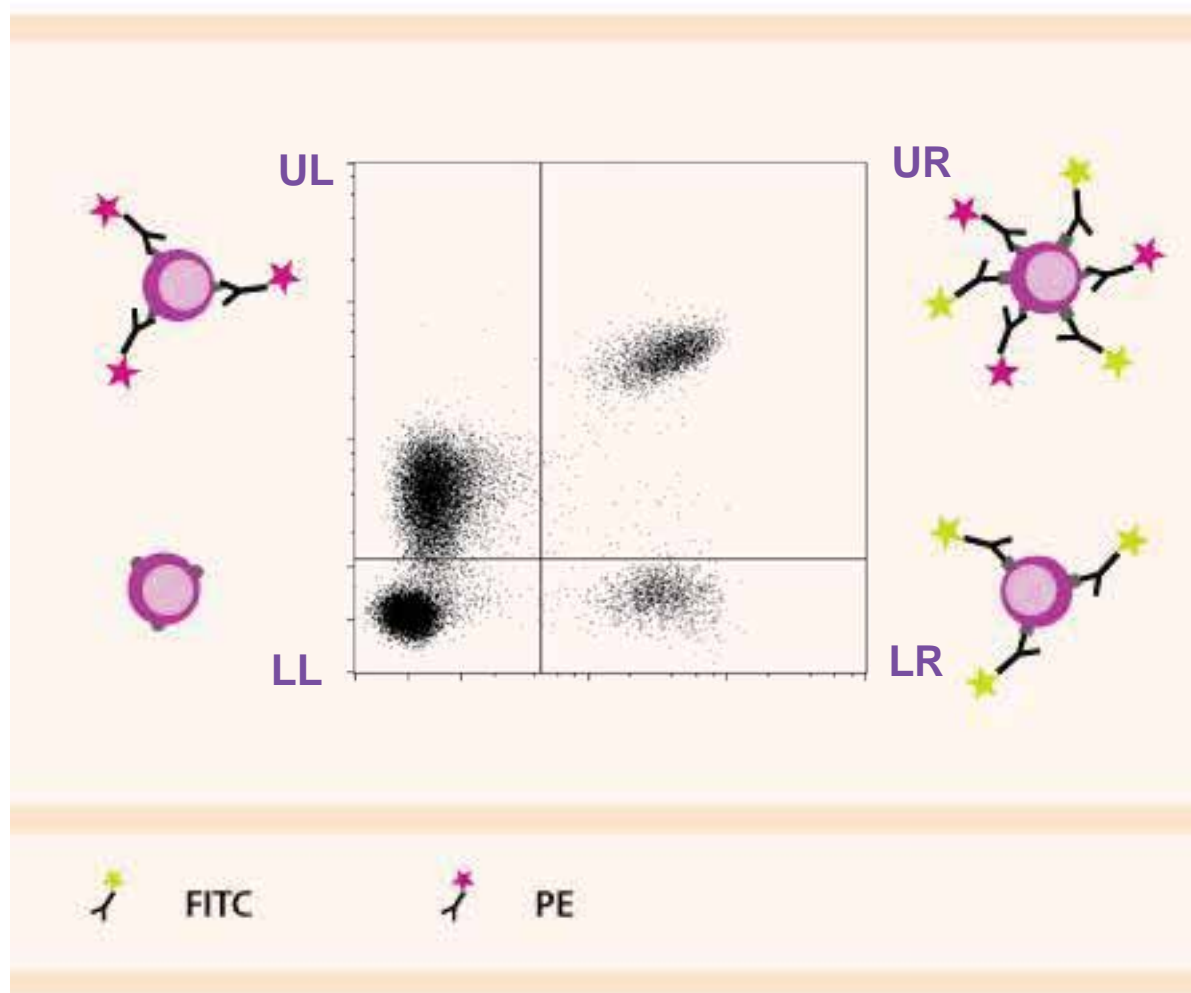


散点图- 2 维

	FSC	SSC	V1	B1
Event 1	30	60	638	840
Event 2	100	160	245	85
Event 3	300	650	160	720

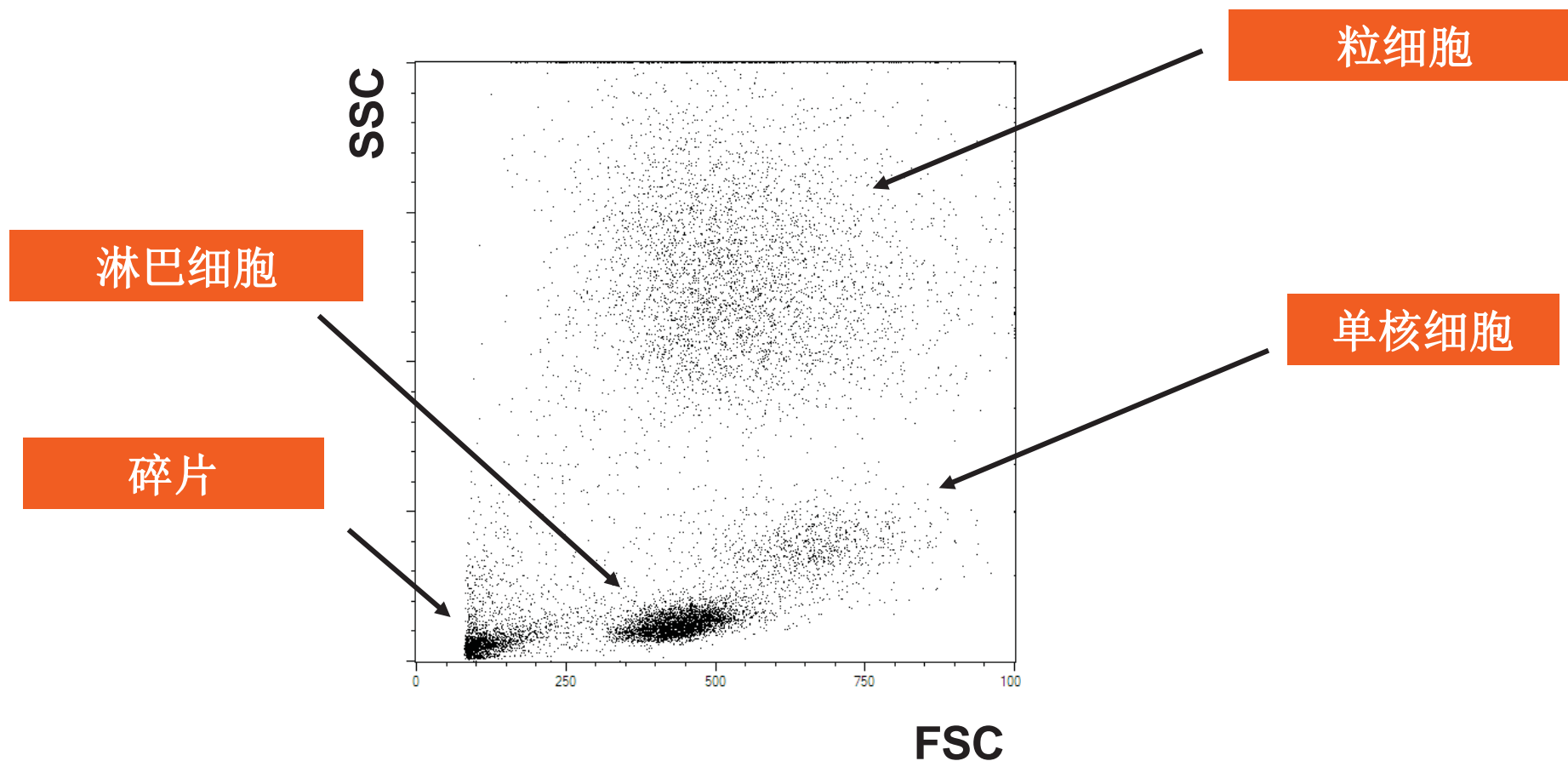


双参数分析——散点图



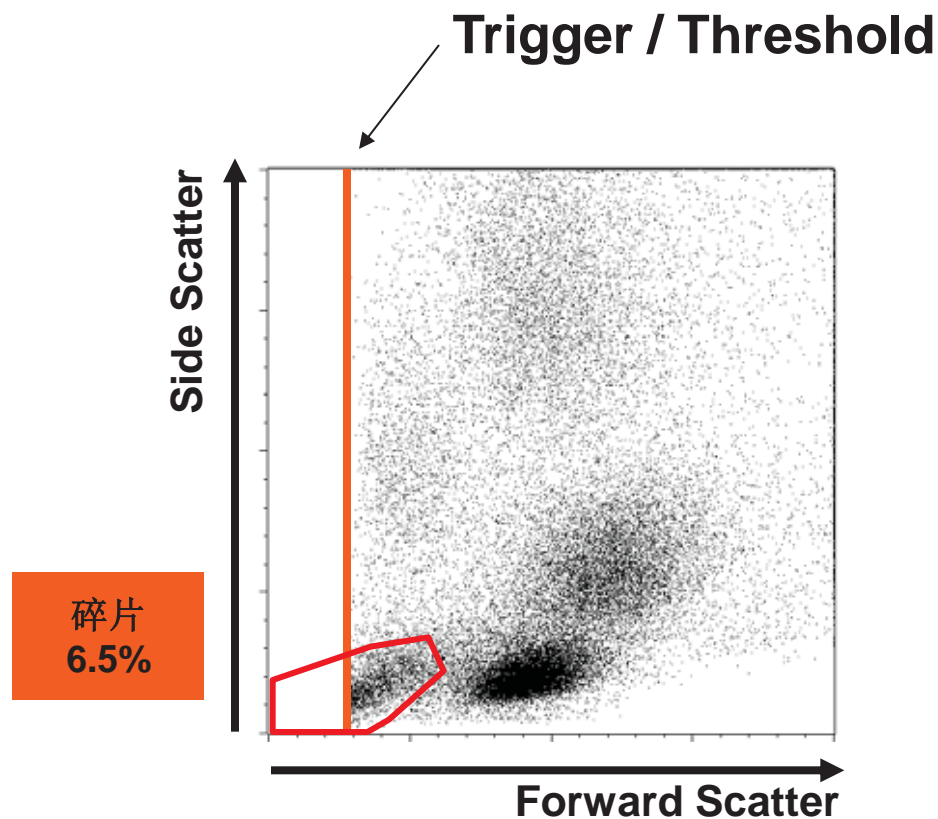
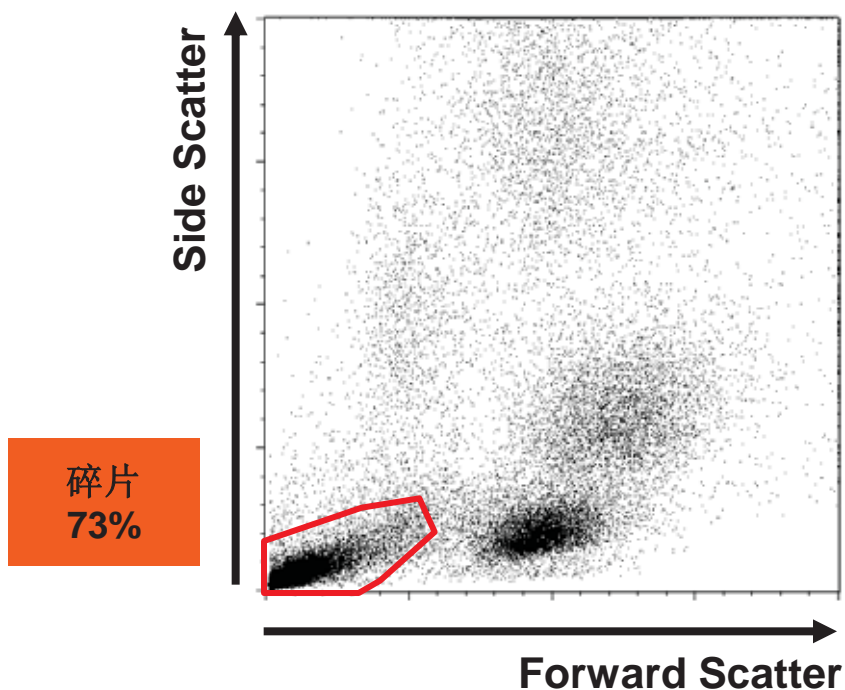
散射光的散点图

裂解后人的外周血PBMC

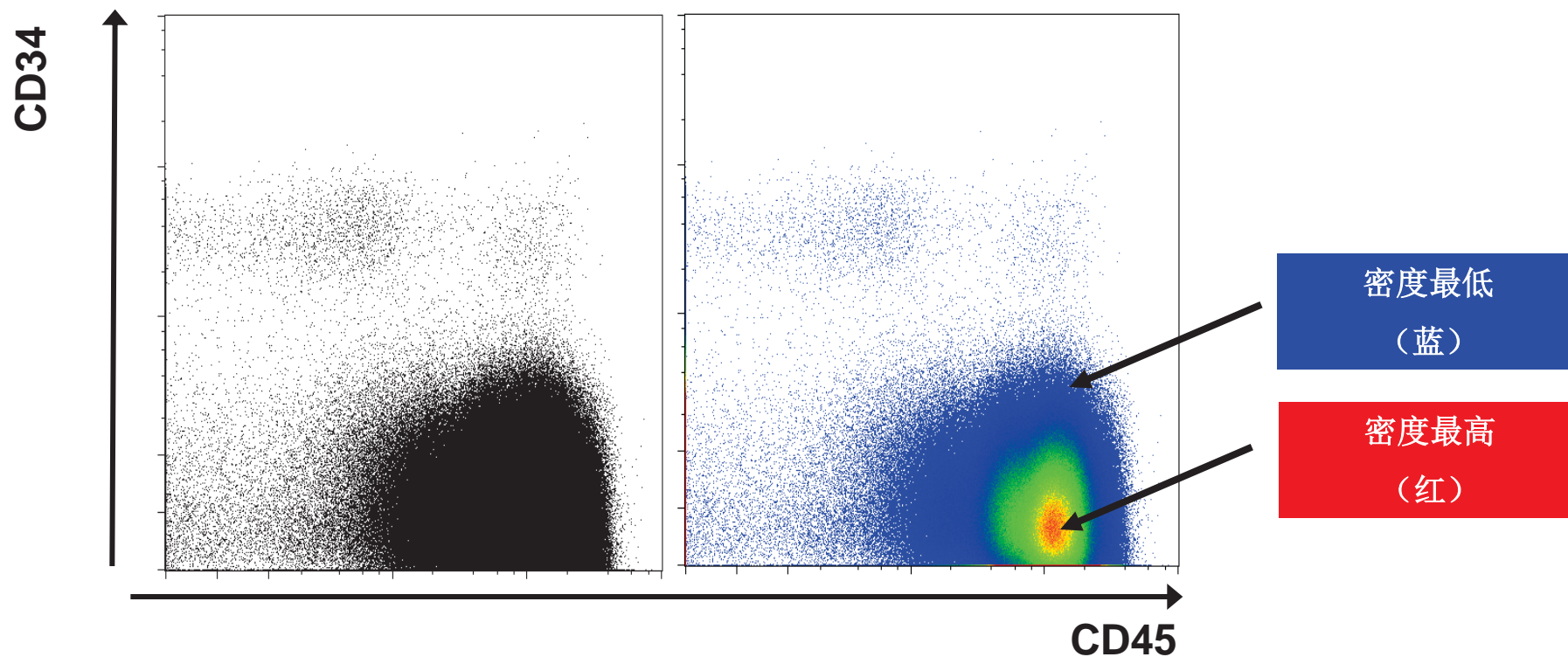


散射光信号- 排除小的细胞碎片

裂解的外周血



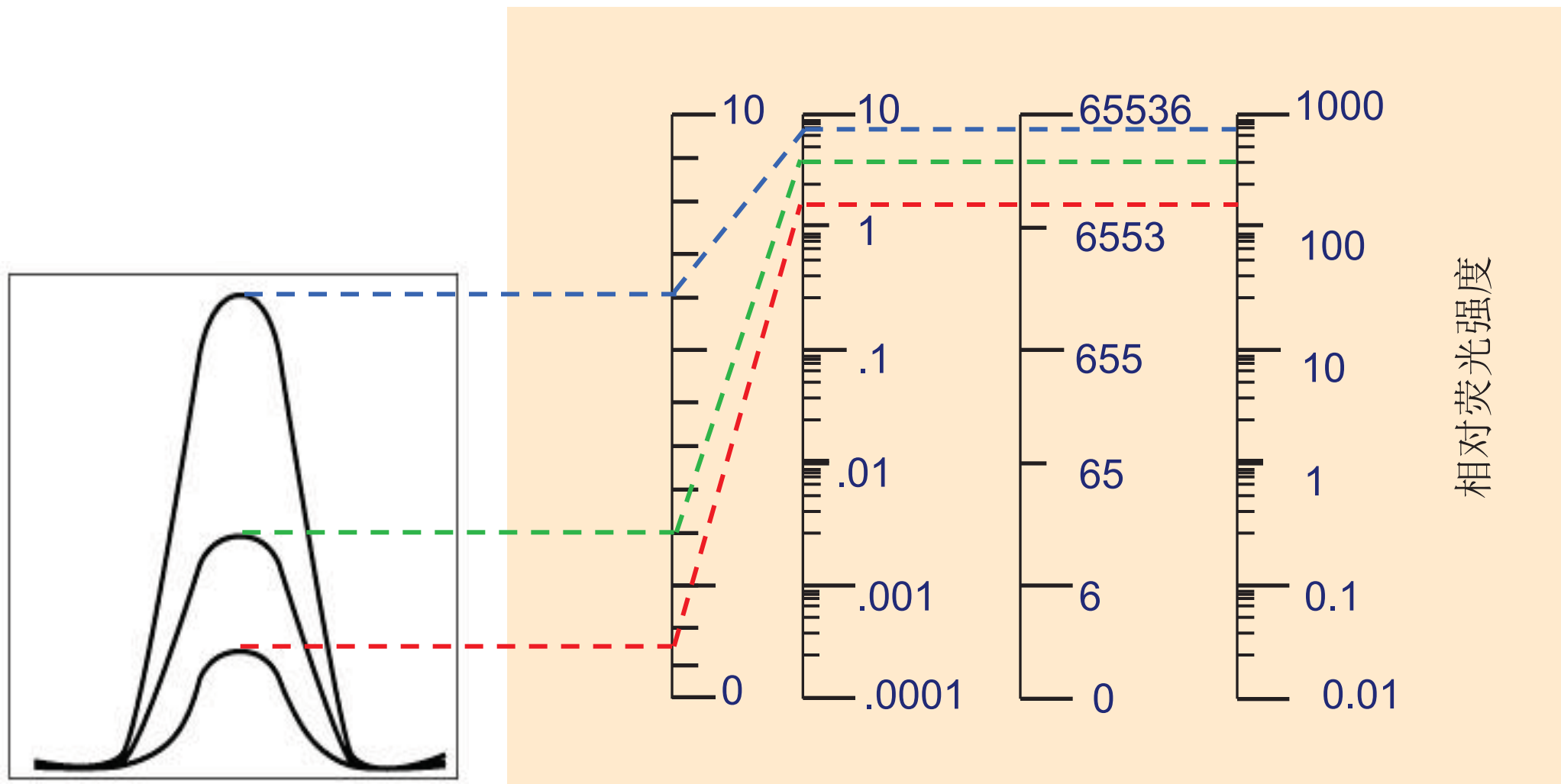
散点图和密度图



散点图

密度图

脉冲信号数字化

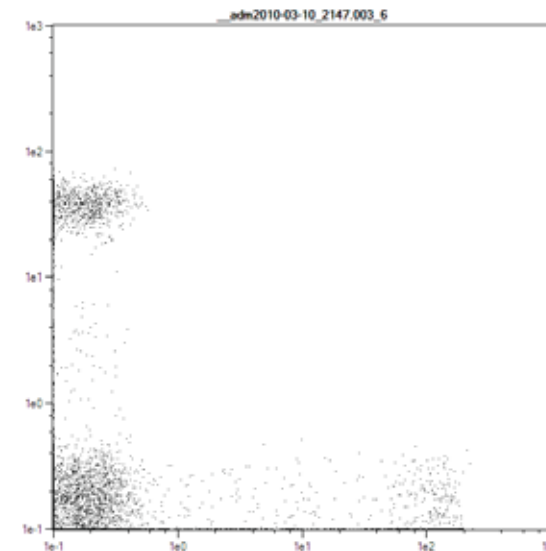
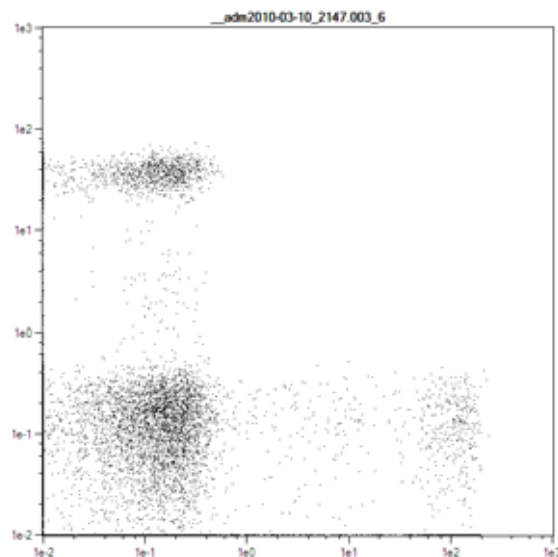
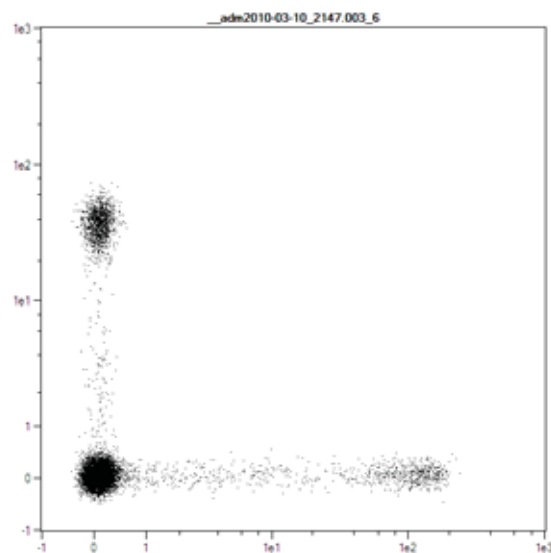
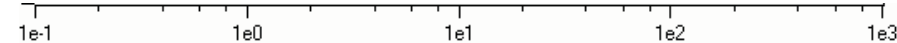
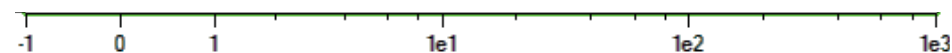


流式数据的显示标尺

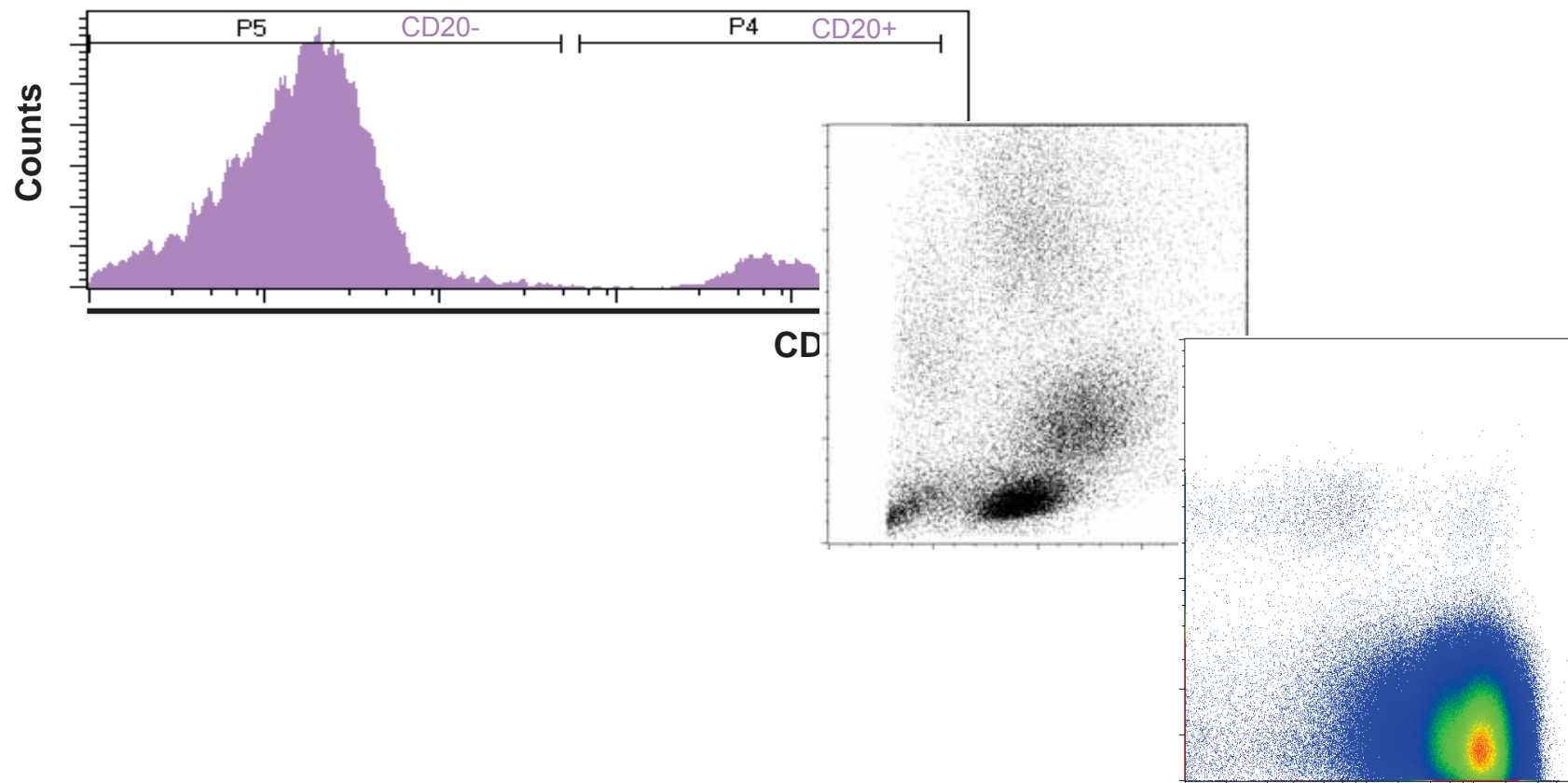
Hlog

log5

log4



总结：数据的显示



日程

- 流式细胞仪可以检测的细胞参数和应用
- 流式细胞仪参数的设置
- 数据的显示
- 数据分析: 逻辑设门, 排除设门, 统计

设门的目的

- 决定分析哪些目的细胞群
- 排除不想要的颗粒(e.g. 死细胞)
- 选择和分析特定的细胞亚群

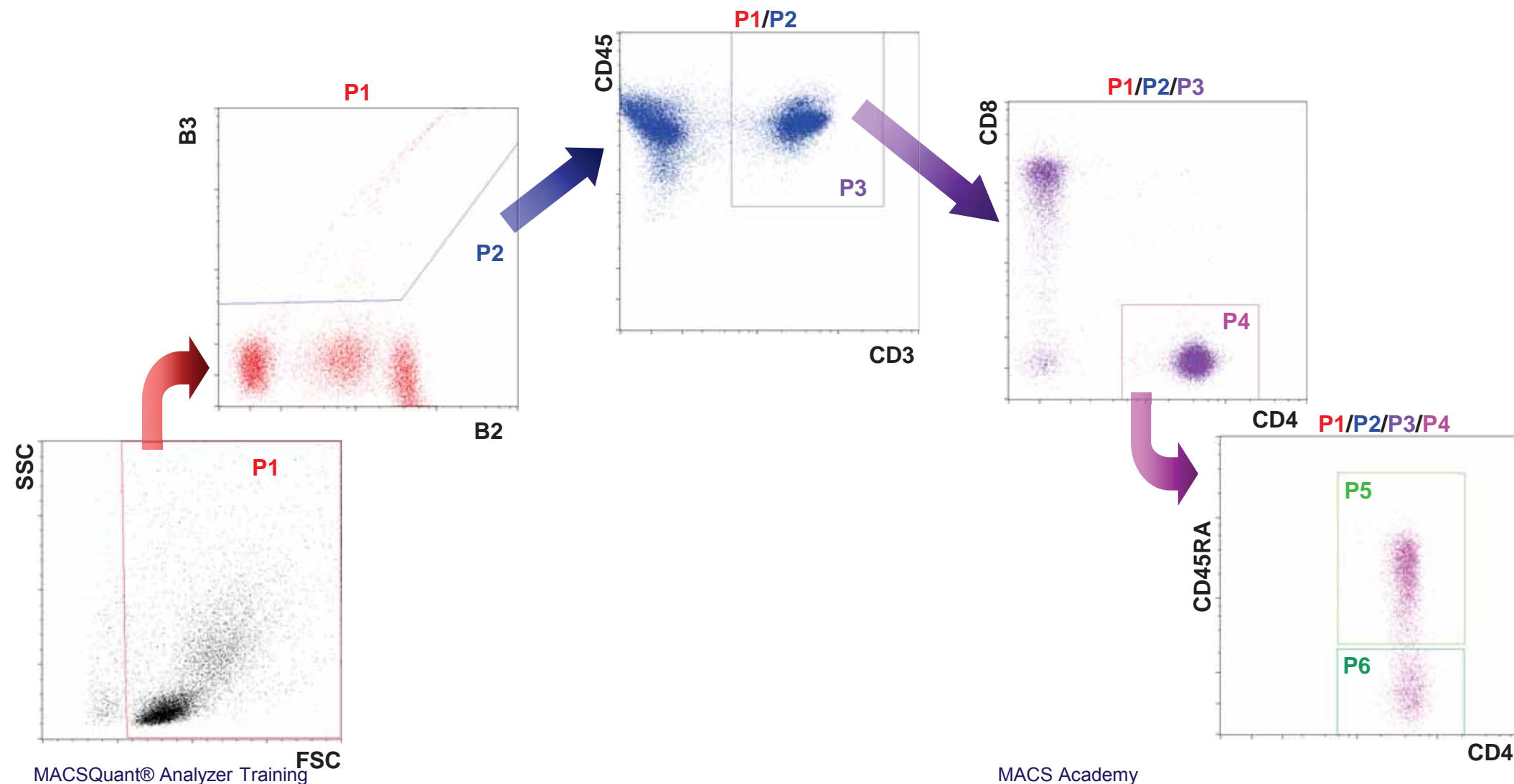
设门是具体分析某一细胞亚群的工具



在戴眼镜的人群中有多少男性和多少女性？



使用设门对多个细胞亚群进行分析

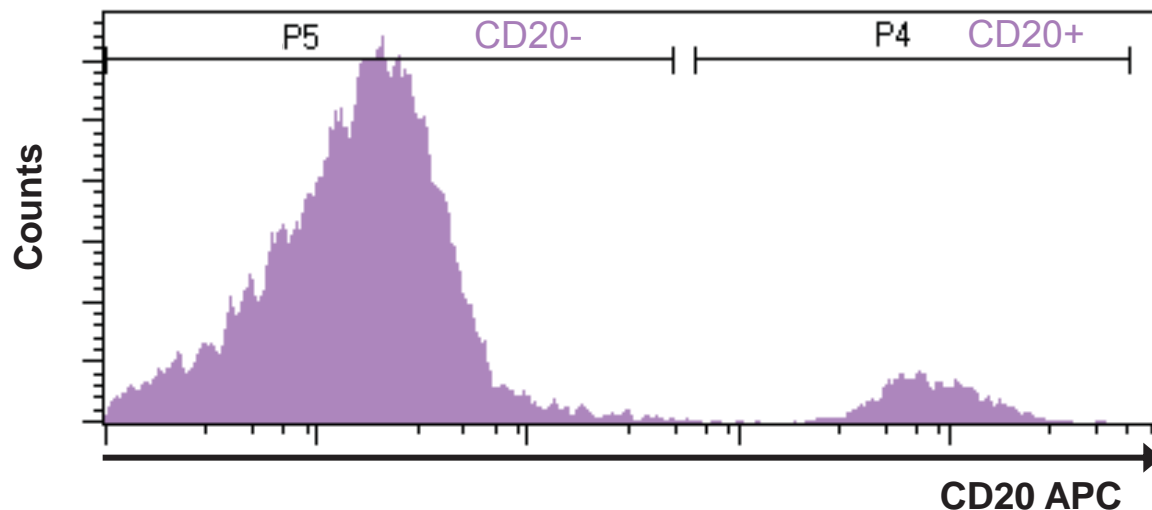


亚群分析的统计值

- Mean -
- Median -
- Mode -
- CV -
- SD -

直方图 - 区间 - 统计

■ CD20 APC染色的PBMC



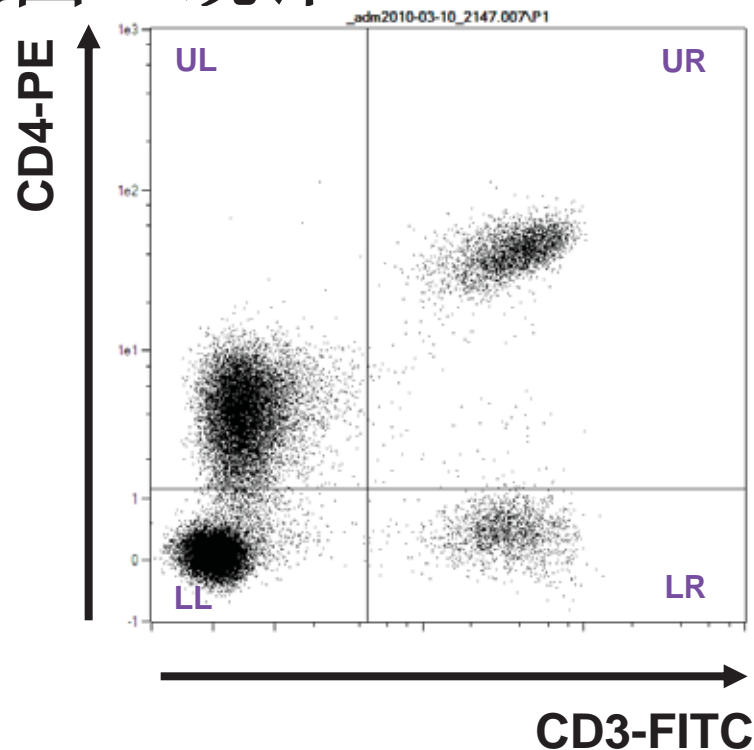
Region	%-#	%-T	CD20-APC-A Mean	CD20-APC-A Median
Srv2009-02-04_2062.052.ori	100.00	100.00	8.67	0.11
P4	4.71	3.84	96.77	79.08
P5	95.23	77.50	0.09	0.06

frequency

MACS Academy

intensity

散点图 - 四象限图 - 统计



Region	%-#	%-T	CD3 FITC-A Median	CD4 PE-A Median
LL4	43.43	34.00	0.05	0.09
UL4	40.33	31.58	0.45	4.16
UR4	10.67	8.35	37.68	41.36
LR4	5.57	4.36	32.17	0.41

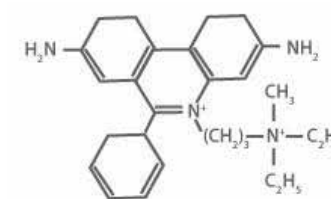
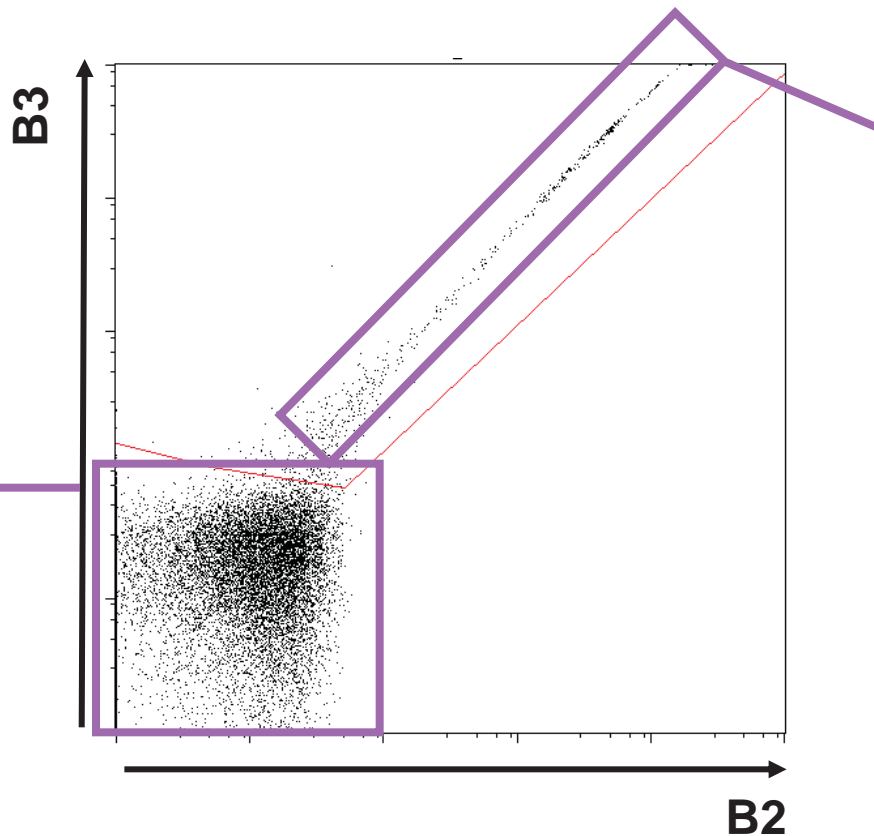
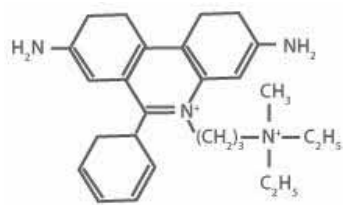
去除干扰的颗粒

为什么要去除死细胞？

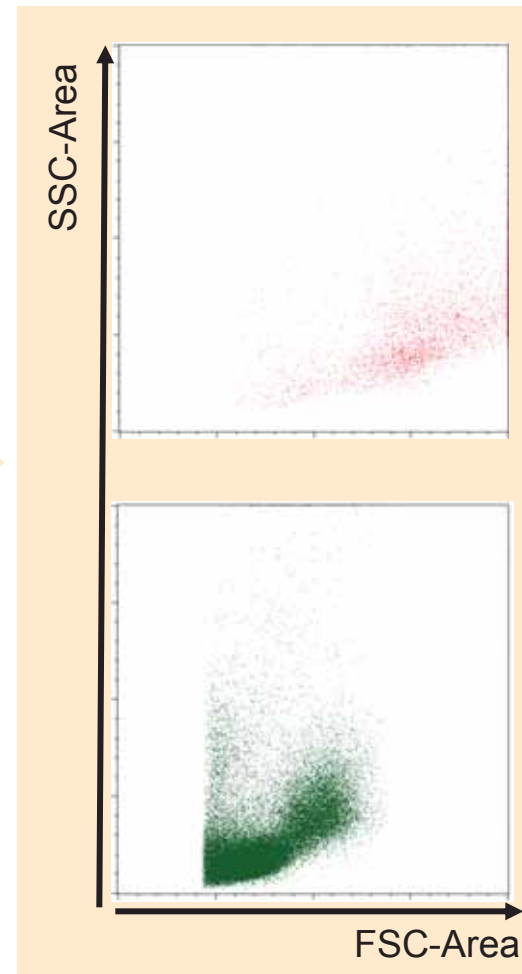
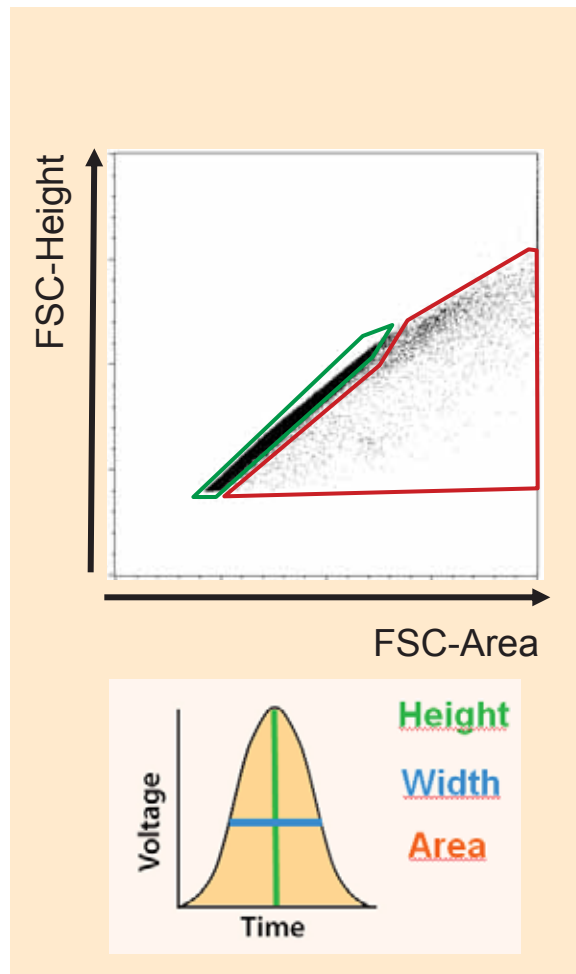
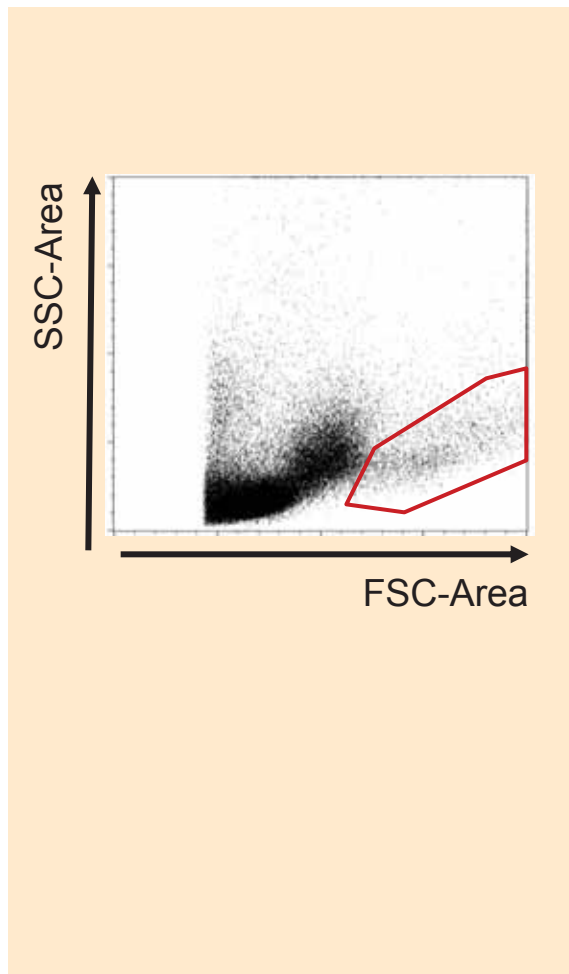
- 死细胞会和抗体有非特异性的结合
- 可以自发荧光
- 结果会有假阳性！

去除死细胞

■ Propidium Iodide (PI)染色



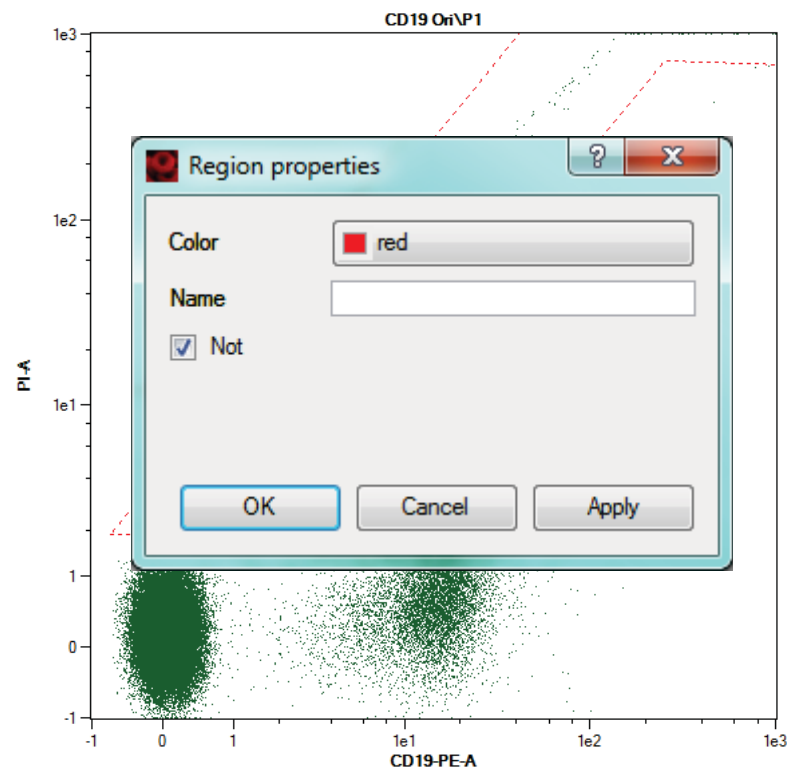
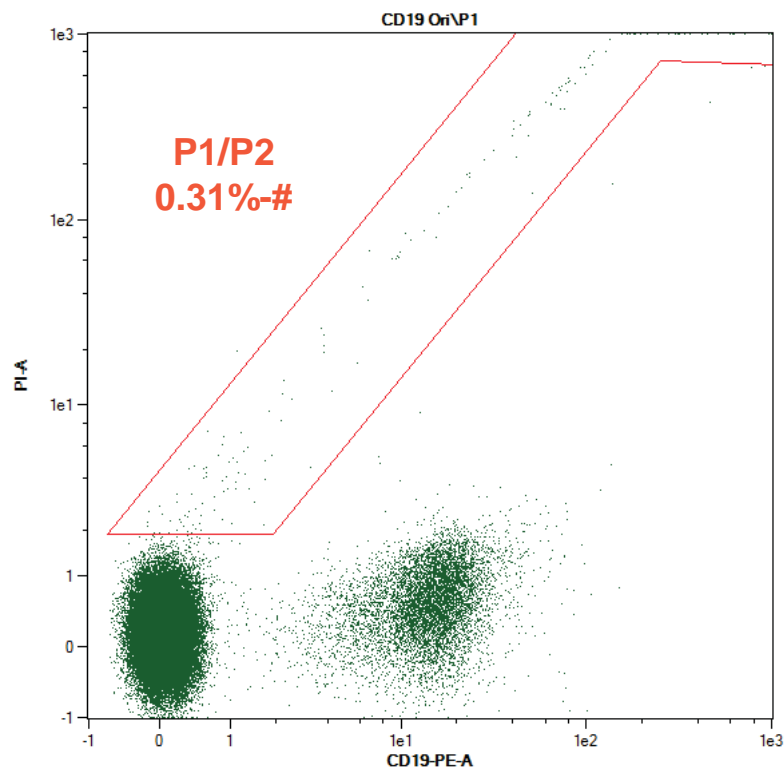
双联体的鉴定和去除



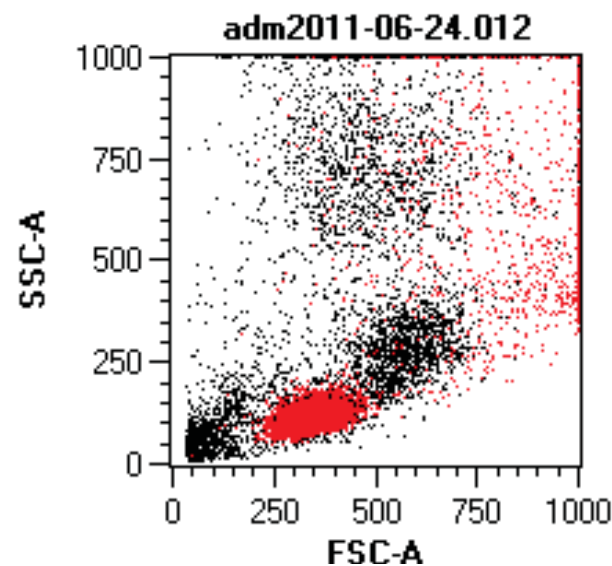
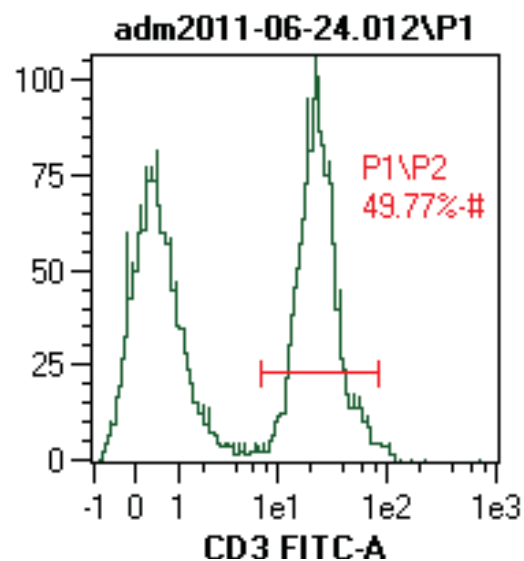
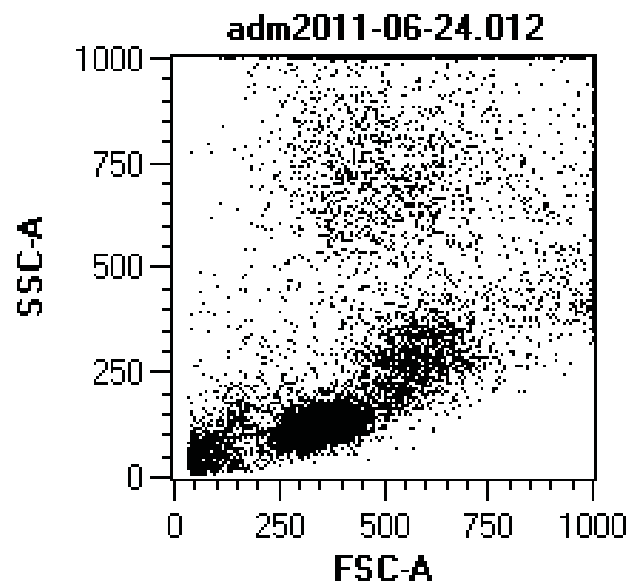
双联体

单个细胞

排除设门– NOT gates



“反向”设门



总结: 设门的作用

- 分析样本中某些特异的细胞亚群
- 分析过程中排除干扰的颗粒 (死细胞, 双联体 etc.)
- 分析特定的细胞亚群

Thank You