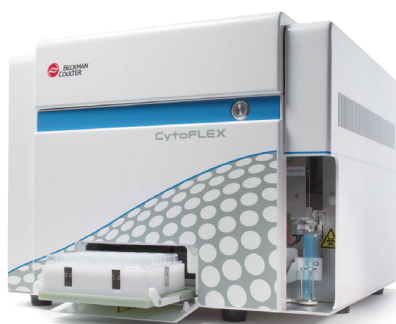


CytoFLEX 流式细胞仪 应用手册



EVERY
event matters.

 **BECKMAN
COULTER**
Life Sciences





目录

1	9 色人白细胞免疫表型分析·····	1
2	13 色淋巴亚群免疫功能检测·····	3
3	BrdU 细胞增殖·····	5
4	CBA·····	7
5	DC 细胞检测·····	9
6	CEN、CTN 周期质控品 DNA 含量检测·····	11
7	CFSE 细胞增殖检测·····	13
8	陈血中红细胞微颗粒、过渡细胞和完整红细胞检测·····	15
9	活细胞周期 -Hoechst 33342·····	17
10	巨噬细胞吞噬实验·····	19
11	蓝藻计数·····	21
12	囊泡检测·····	23
13	微颗粒检测·····	25
14	细胞凋亡·····	26
15	细胞因子检测·····	28
16	细胞周期 - PI·····	30
17	细菌周期倍体分析·····	31
18	小鼠脾细胞表型分析·····	33
19	藻类分类计数·····	34
20	植物倍体·····	36
21	DAPI 检测倍体及 DNA 含量·····	37
22	活性氧检测·····	39
23	小鼠造血前体细胞检测·····	41
24	病毒细菌藻类绝对计数·····	43
25	自然水体中病毒细菌区分·····	45
26	精子染色质结构分析 (SCSA)·····	47

➤ 9 色人白细胞免疫表型分析

实验简介

对人外周血白细胞细胞表型的多色检测，可以一管实现 B 细胞、T 细胞及 T 细胞亚群、活化、分化的检测，在免疫功能监测中有重要的意义。

实验方法

1. 实验材料

1.1 单克隆抗体

Laser	405 nm		488 nm				638 nm		
Fluor	KrO	PB	FITC	PE	PC5.5	PC7	APC	APCA 700	APCA 750
Marker	CD45	CD45RA	HLA-DR	CD127	CD25	CD19	CD4	CD8	CD3

2. 样本制备

- 按照说明书，将上述抗体和人外周血共同孵育，室温避光 15 min;
- 用 Optilyse C 红细胞裂解液裂解红细胞，15 min;
- 溶血后离心洗涤一次，重悬后上机获取。

实验结果

- 仪器操作：如下图绘图及设门（图 1），选择自动电压调节，导入由自动补偿调节程序调节好的补偿并应用到当前电压下。收集细胞数 >10,000 后停止；
- 设门策略：用 CD45/SS 选择淋巴细胞进行分析得到 T 细胞、T4 细胞、T8 细胞、B 细胞、活化 T 细胞、初始 T 细胞及调节 T 细胞（CD4+CD25+CD127dim）百分比。（图 2）

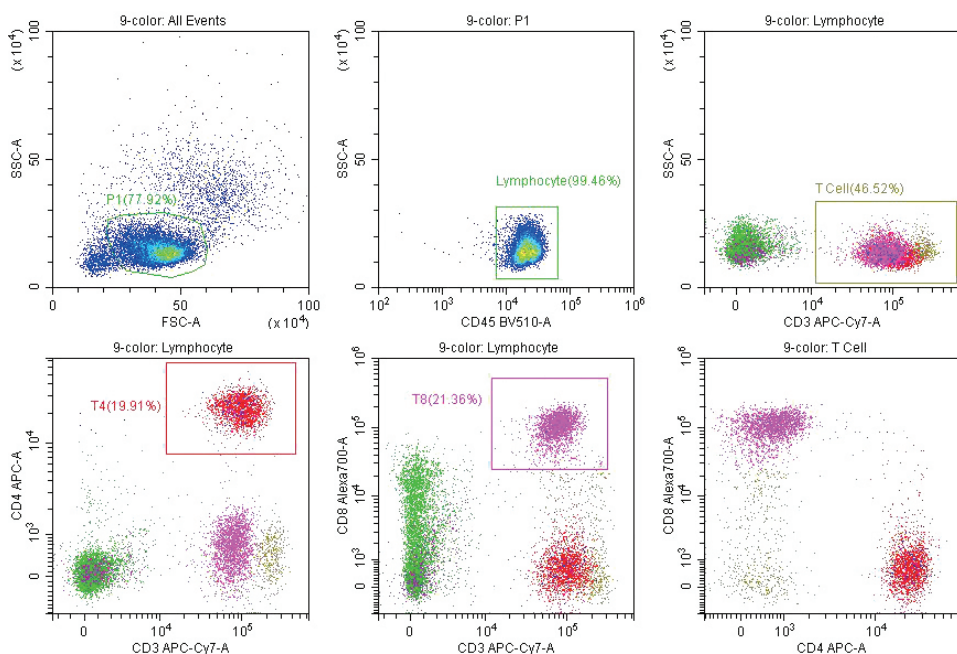


图 1

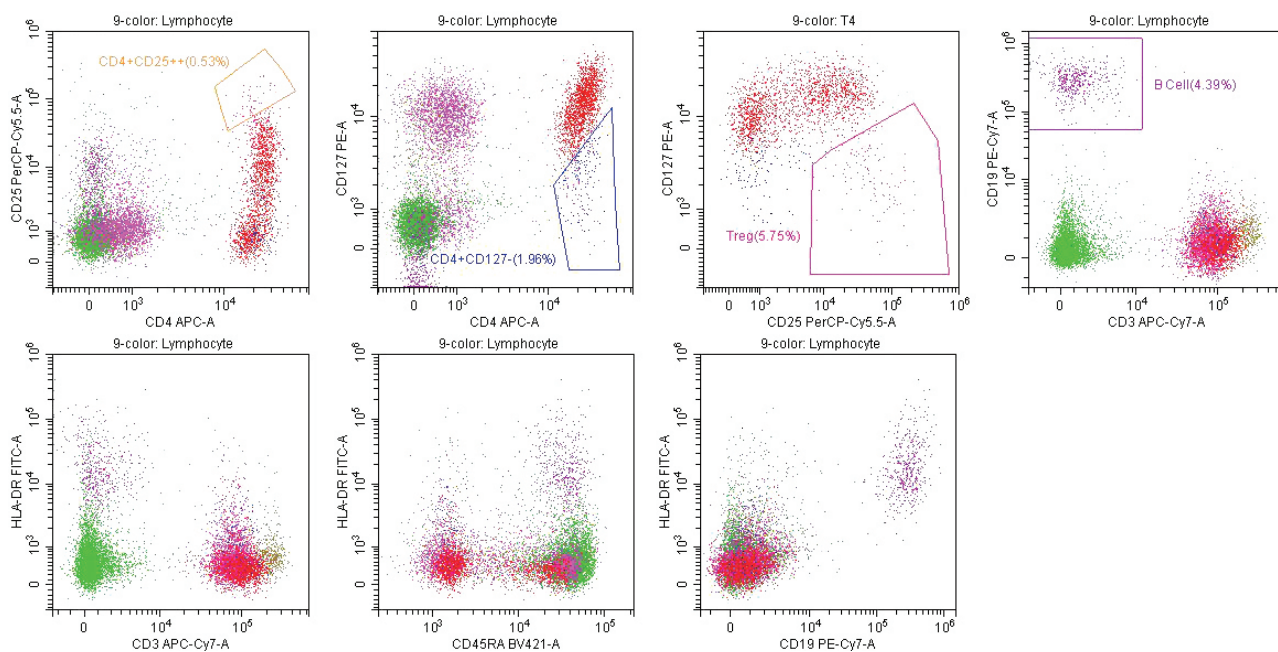


图 1

Tube Name: 9-color

Sample ID:

Population	Events	% Total	% Parent
▼ All Events	12963	100.00%	100.00%
▼ P1	10101	77.92%	77.92%
▼ Lymphocyte	10046	77.50%	99.46%
T Cell	4673	36.05%	46.52%
▼ T4	2000	15.43%	19.91%
Treg	115	0.89%	5.75%
T8	2146	16.55%	21.36%
B Cell	441	3.40%	4.39%
CD4+CD25++	53	0.41%	0.53%
CD4+CD127-	197	1.52%	1.96%

图 2

结果分析

细胞阴阳性群体分群明显，群体集中，仪器性噪比完全满足实验需求。软件操作方便，手动补偿和自动补偿都很简单准确，分析功能强大，可根据需要选择不同图形（散点、伪色彩、等高线等）展现结果。

➤ 13 色淋巴亚群免疫功能检测

实验简介

13 色淋巴亚群免疫功能检测，利用高度集成，卓越检测性能的 CytoFLEX 对外周血中高度异质的 T 淋巴细胞亚群进行分析，10 色 Duraclone IM T 细胞试剂盒 (CD45RA-FITC, CD197-PE, CD28-ECD, CD279-PC5.5, CD27-PC7, CD4-APC, CD8-Alexa-Fluor 700, CD3-APC-AF750, CD57-Pacific Blue, CD45-Krome Orange) 为贝克曼最新用于淋巴亚群检测的干粉试剂，加上 3 个液体试剂 (CD95-BV 605TM, CD25-BV650TM 以及 CD127-BV768TM) 可进行 T 细胞 (CD3+) 及其亚群细胞 T4 (CD3+CD4+)，T8 细胞 (CD3+CD8+)，中央记忆 T 细胞 (CD45RO-CCR7+)，效应记忆 T 细胞 (CD45RO-CCR7-)，天然 T 细胞 (CD45RO+CCR7+)，调节 T 细胞 (CD4+CD25+CD127low)，干样 T 细胞 (CD45RA+CCR7+CD95+CD127+) 百分比及数量检测，有助于了解机体所处于的免疫功能状态，对疾病的辅助诊断、疗效评估、预后判断等十分重要，对机体亚健康状态的诊断及发生相关疾病的风险评估具有重要意义，也是近年来研究的热点之一。

材料与方法

试剂

Laser	405 nm					488 nm					638 nm		
Fluor	PB	KO	BV605	BV650	V785	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	APCA 700	APCA 750
Marker	CD57	CD45	CD95	CD25	CD127	CD45RA	CCR7 (CD197)	CD28	PD1 (CD279)	CD27	CD4	CD8	CD3

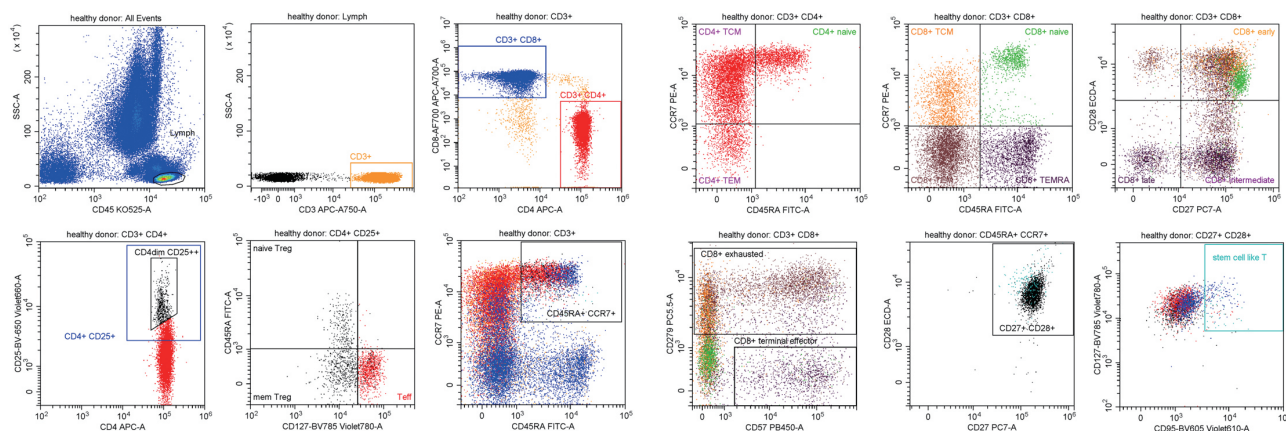
样品制备

Sample Type	外周血
Species	人
Age of specimen	新鲜 EDTA 抗凝
Prep Method	1. 取新鲜抗凝人外周血 100 ul 放入 Duraclone T panel 流式管底，再各加入 5 ul 述适量的抗体 (CD95-BV 605TM, CD25-BV650TM 以及 CD127-BV768TM)，涡旋 30sec，充分混匀； 2. 室温避光孵育 15 min； 3. 加入 1 mL 溶血素 Versa lysis，和 50ul 固定剂 IOTest 3 Fixative Solution（试剂均来自 Beckman）涡旋 30 sec，充分混匀，并避光孵育 20 min； 4. 待红细胞溶解充分后，200 g 离心 5 min 去除上清，并加入 3 mL 1 x PBS 洗涤一次，离心，重悬于 500 ul 1 x PBS，上机检测。

数据分析

1. 创建一个新的实验;
2. 按下图选择相应的通道及建立实验方案;
3. 采集的数据以 Lymph 门内至少获取 20000 个 events。

淋巴细胞 (Lymph) 通过 CD45/SS 设门, 进一步利用 CD3/SS 散点图圈选淋巴细胞门内 (Lymph) 的 CD3+ 细胞, 对 CD3+ 细胞进行 CD4/CD8 作图, 并分别对 CD4+, CD8+ 细胞 CCR7/CD45RA 表达情况进行分析, 四象限分别代表纯真 T 细胞 (CCR7+CD45RA+), 效应 T 细胞 (CCR7-CD45RA+), 中央记忆 T 细胞 (CCR7+CD45RA-), 效应记忆 T 细胞 (CCR7-CD45RA-)。对 CD4+ 细胞 CD4/CD25 作图可分析调 T 表达, 对 CD4+CD25+ 的细胞进一步设门至 CD127/CD45RA, 分析天然调 T 细胞 (CD127+CD45RA+) 以及记忆调 T 细胞 (CD127+CD45RA-), 效应调 T 细胞 (CD127hi+CD45RA-)。T8 细胞的成熟过程及活化可以用 CD27/CD28, CD57/CD279 散点图分析, 纯真 T 细胞 (CD3+CCR7+CD45RA+) 关联至 CD27/CD28, 双阳性细胞群进一步关联至 CD96/CD127 散点图, 其中 CD96hi+CD127+ 的细胞群为干样 T 细胞, 具有分生潜能的 T 淋巴细胞。



实验结果

该 13 色的 T 淋巴亚群 panel 不仅可检测最常见的 T 淋巴亚群抗原, 而且更注重对 T 淋巴细胞亚群及功能的研究, 初始 T 细胞及效应 T 细胞, 以及表达稀有的 Treg 细胞干样淋巴细胞都是临床科研的重要研究对象, 从以上数据可以非常清楚区分各群细胞, 而常规的流式检测需要进行 2-3 管的检测, 操作及检测过程复杂, 费时费力, CytoFLEX 的卓越的检测灵敏度, 以及多达 13 个荧光检测通道, 友好的操作系统可以非常轻松地完成非常复杂的多色检测。

► BrdU 细胞增殖

实验简介

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

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

材料与方法

试剂

Laser	405 nm					488 nm					638 nm		
Fluor	KrO	PB	V610	V660	V780	FITC	PE	ECD	PC5	PC7	APC	APCA 700	APCA 750
Marker						BrdU			7-AAD				

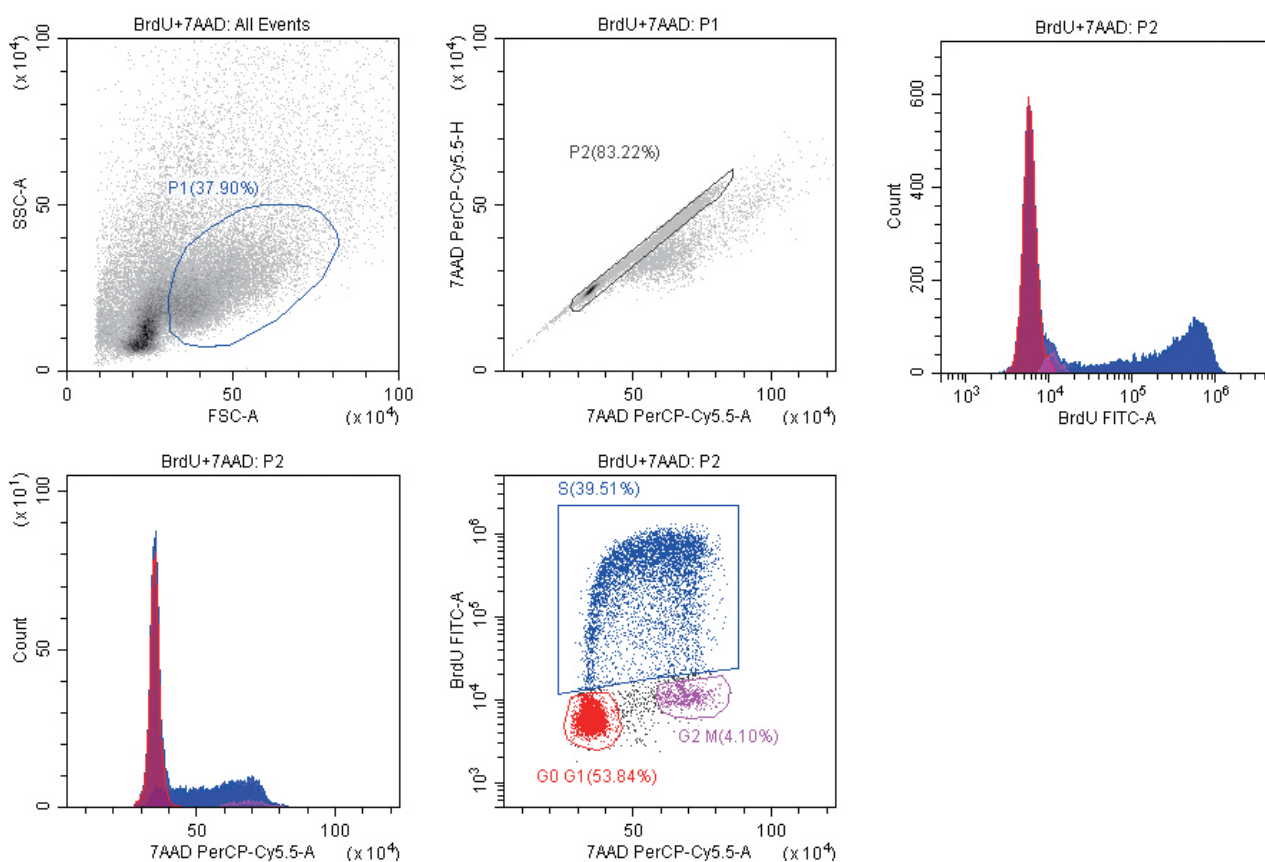
样品制备

Sample Type	外周血单个核细胞 PBMC
Species	人
Age of specimen	PBMC 经过 BrdU 共培养一定时间后检测。
Prep Method	1. 收集 PBMC，接种至完全培养基中； 2. 加入 BrdU-FITC，使终浓度为 10 µg/mL； 3. 培养至所需时间后，PBS 洗两次。70% 酒精 4℃ 固定过夜； 4. 根据 BrdU 说明书处理细胞，包括变性及二抗孵育； 5. 离心，使用含有 RNA 酶及 7-AAD 的 PBS 重悬细胞，避光孵育 20 min 后上机检测。

数据分析

在 FSC/SSC 上圈出淋巴细胞，使用 7-AAD-A/7-AAD-H 排除黏连体，使用 BrdU-FITC (Log)、7-AAD (Lin) 分别观察增殖情况及周期分布，使用 7-AAD/BrdU 散点图可进一步将周期细分。

实验结果



➤ CBA

实验简介

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

材料与方法

试剂

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

样品制备

Sample Type	细胞培养上清
Species	小鼠
Age of specimen	收集细胞培养上清，-20℃保存，检测时取出平衡至室温
Prep Method	1. 使用试剂盒中的 Setup Beads 进行仪器方案调节； 2. 按照试剂盒中操作步骤制备标准品，用于制作标准曲线； 3. 按照试剂盒说明制备样品，上机检测。

数据分析

使用FSC/SSC设门, 选取微球群体(设逻辑门排除掉混杂的信号), 然后再以PE (Reporter Parameter) 为横坐标, APC (Clustering Parameter) 为纵坐标, 检测各炎性因子的表达情况。

实验结果

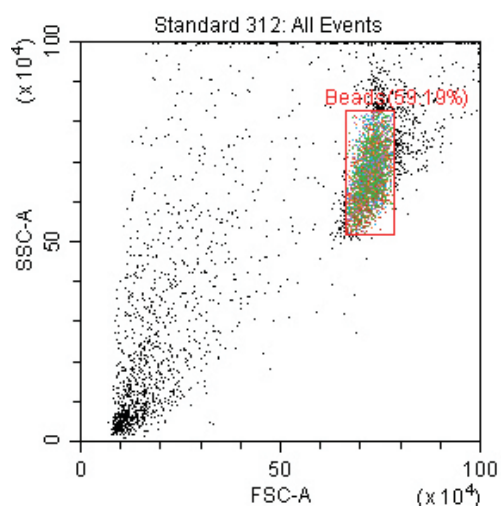


图 1

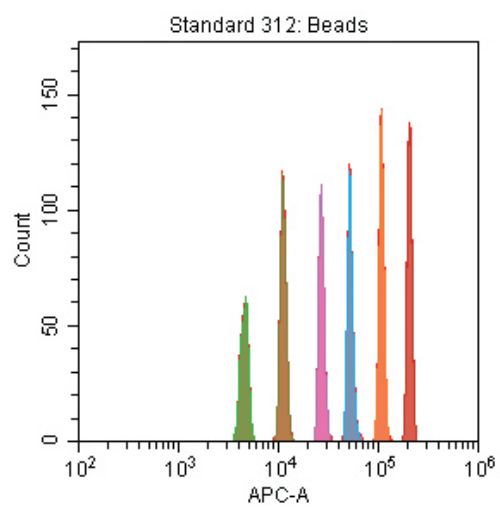


图 2

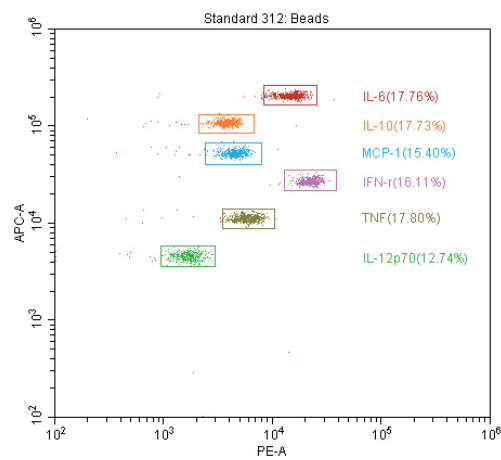


图 3

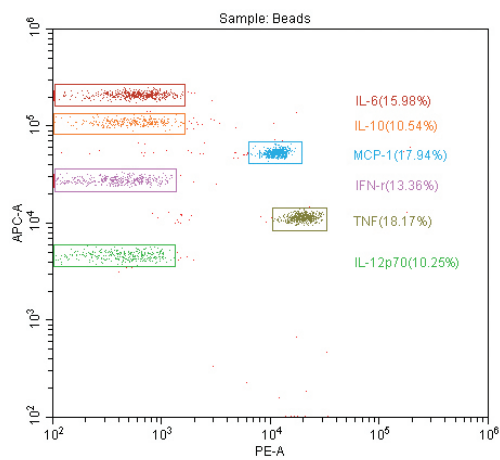


图 4

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

➤ DC 细胞检测

实验简介

DC 细胞是已知体内功能最强、唯一能活化静息 T 细胞的专职抗原提呈细胞，是启动、调控和维持免疫应答的中心环节。通过大量体外活化培养负载肿瘤抗原的 DC 细胞，当细胞数量达到一定数量后回输给病人，可诱导机体产生强烈的抗肿瘤免疫反应。

材料与方法

试剂

Laser	405 nm					488 nm					638 nm		
Fluor	KrO	PB	V610	V660	V780	FITC	PE	ECD	PC5	PC7	APC	APCA 700	APCA 750
Marker						Lin (CD14+ CD16)	CD85K		CD33/ CD123	CD45	HLA-DR		

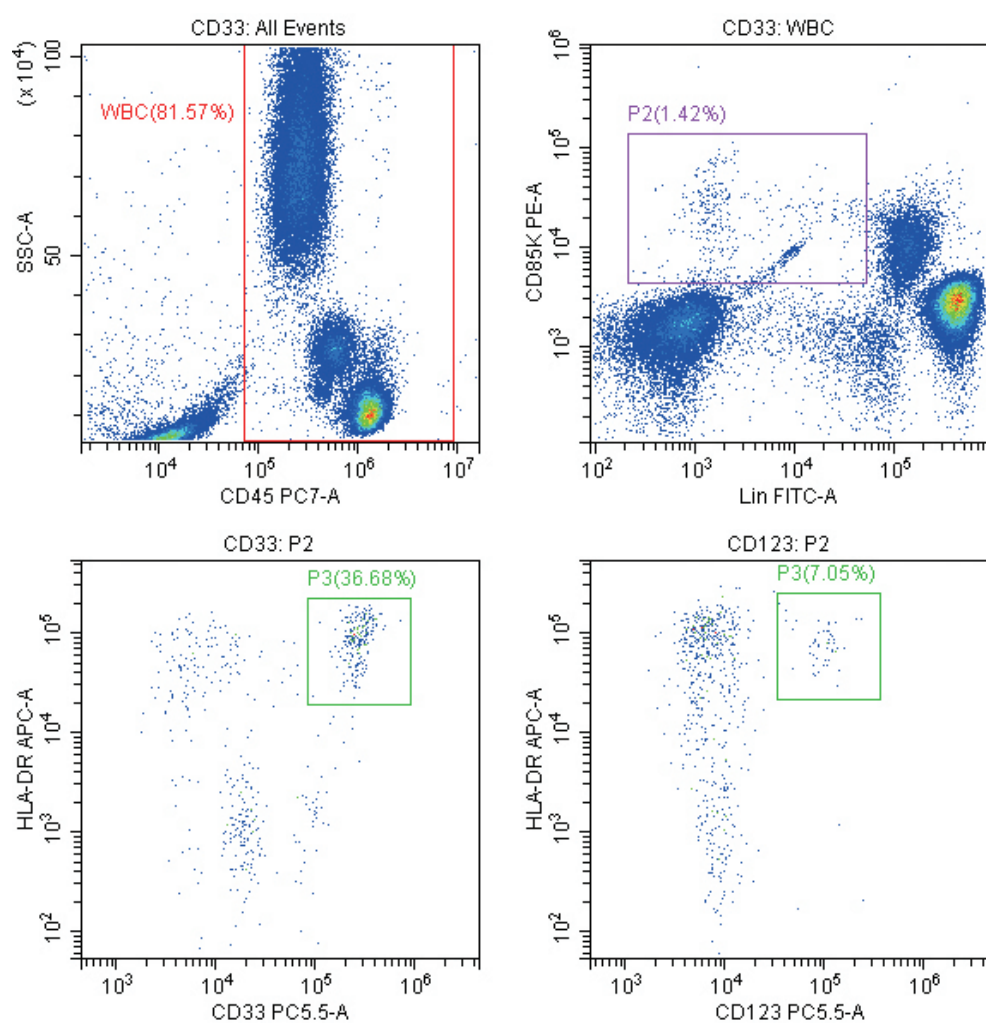
样品制备

Sample Type	全血
Species	人
Age of specimen	新鲜采集人全血，采用 EDTA 抗凝。
Prep Method	1. 取新鲜抗凝人外周血 100 ul 放入流式管底，再各加入适量的抗体，涡旋 30 sec，充分混匀； 2. 室温避光孵育 15 min； 3. 加入 500 μl OptiLyse® C 溶血素涡旋 30 sec，充分混匀，并避光孵育 20 min； 4. 待红细胞溶解充分后，200 g 离心 5 min 去除上清，重悬于 500 ul 1 x PBS，上机检测。

数据分析

在 CD45/SSC 上圈出 CD45 阳性的白细胞，在白细胞中找到 Lin-/CD85K 阳性细胞群（P2），在分别用 HLA-DR+/CD33+ 找出髓系 DC 细胞，HLA-DR+/CD123+ 找出淋系 DC 细胞。

实验结果



从时间结果可以看出，在 CytoFLEX 的检测下，细胞分群十分明显，阴阳性及弱阳性细胞分群清晰，有助于划门。另外充分体现出 CytoFLEX 对于微弱含量细胞检测的优势。

➤ CEN、CTN 周期质控品 DNA 含量检测

实验简介

流式细胞仪分析大量细胞的细胞周期和 DNA 倍体已经成为一种日益重要的研究细胞增殖的方法，有助于研究不同药物和疾病对于生长的影响。通过核酸染料标记 DNA，并由流式细胞仪进行分析，可以得到细胞各个时期的分布状态。小鸡红细胞核（CEN）和小牛胸腺细胞核（CTN）这两个 DNA 质量控制试剂为流式细胞仪提供了一种检测和评价仪器性能的方法。CEN 试剂经过特殊处理而成，包括单个核，双联体核，三联体核和更大的聚集体，用于检测仪器的线性度和分辨率。若染色正常，仪器的线性度良好，则后三个峰所在道数的平均值与第一个峰值的比值应接近于 2，3，4。CTN 试剂具有细胞周期的各个时期，大部分核处于 G0/G1 期，小部分处于 S 期和 G2/M 期，用于细胞周期统计分析的质控。

材料与方法

试剂

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

样品制备

Sample Type	标准品，核酸染料 PI
Species	CEN: 小鸡红细胞核，CTN: 小牛胸腺细胞核
Age of specimen	
Prep Method	1. 取两个流式管分别加入混匀后的 CEN 和 CTN 40 ul; 2. 每管加入 1 mL 的 PI 染料，混匀，室温避光孵育 10 min; 3. 将检测管放于 2-8℃ 在 4 h 内上机检测。

数据分析

1. 打开 CytExpert 软件，确保仪器连接正常。
2. 模板建立，一共画三个图：前两个图为散点图，第三个为单参数直方图。

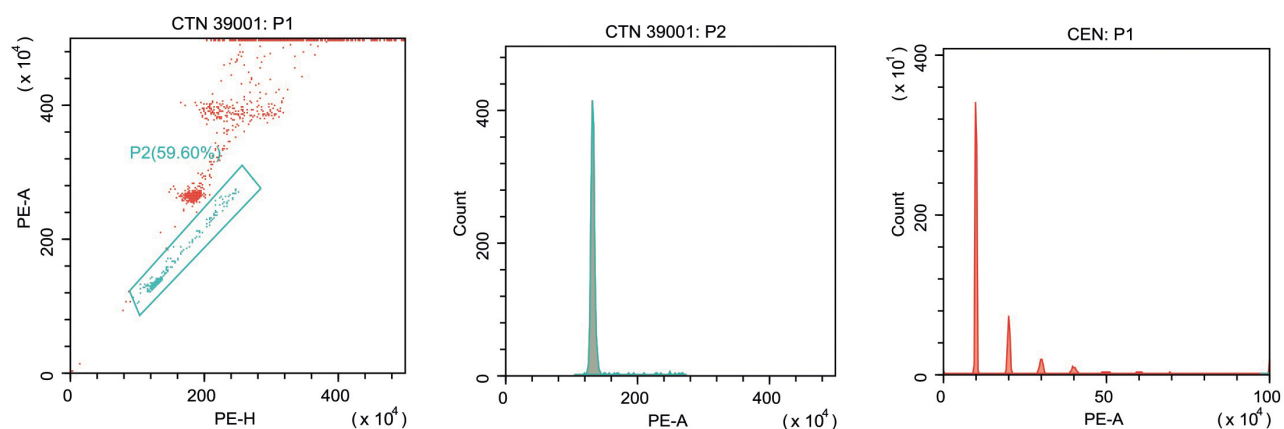
第一个图，横轴 FSC-A，纵轴 SSC-A，用以圈定所有标准品；

第二个图，横轴 PE-H，纵轴 PE-A，用以排除粘连细胞；

第三个图，横轴 PE-A，用以显示最终结果。

所有参数均设为线性。

实验结果



CTN 结果：PI 染色后，能清楚地看到完整的细胞周期的分布图，有效的排除了粘连细胞；

CEN 结果：PI 染色后，由于这些细胞核聚集程度的不同，在 PE-A 的直方图中出现了至少 4 个峰，而前 4 个峰分别代表单个核，双联体核，三联体和四联体。且后三个峰所在道数的平均值与第一个峰值的比值应接近于 2，3，4，形成了很好的倍体关系。证明仪器的线性度和分辨率良好。

➤ CFSE 细胞增殖

实验简介

荧光染料 CFSE(CFDA-SE)，是一种可对活细胞进行荧光标记的新型染料，可以标记活体细胞。其基本原理如下：CFSE 能够轻易穿透细胞膜，在活细胞内与胞内蛋白共价结合，水解后释放出绿色荧光。在细胞分裂增殖过程中，它的荧光强度会随着细胞的分裂而逐级递减，标记荧光可平均分配至两个子代细胞中，因此其荧光强度是亲代细胞的一半，根据这一特性，它可被用于检测细胞增殖、细胞周期的估算及细胞分裂等方面。

材料与方法

试剂

Laser	405 nm					488 nm					638 nm		
Fluor	KrO	PB	V610	V660	V780	FITC	PE	ECD	PC5	PC7	APC	APCA 700	APCA 750
Marker						CFSE				CD19			

样品制备

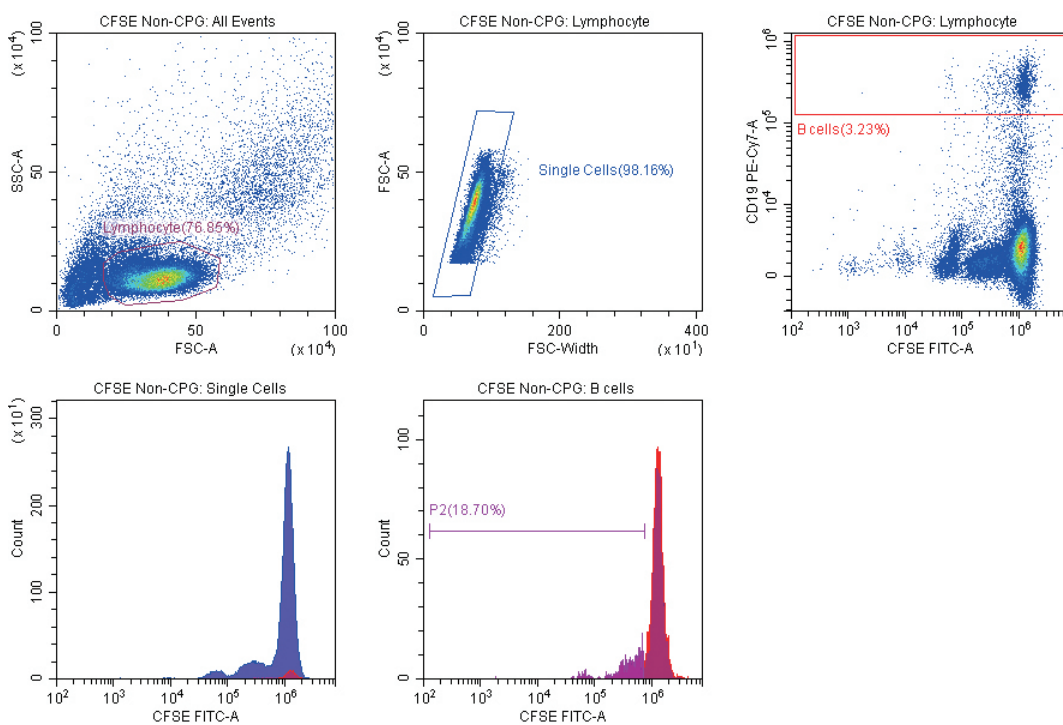
Sample Type	外周血单个核细胞 PBMC
Species	人
Age of specimen	PBMC 经过 CFSE 染色后，在 IL-2 刺激下继续培养 3 天。实验组与对照分别使用与不使用 CpG 刺激。
Prep Method	1. 收集 PBMC，使用 PBS 清洗一遍去掉血清； 2. 去上清加入 37℃ CFSE 工作液孵育 15 min； 3. 加入血清（终浓度 10%）终止反应； 4. PBS 清洗表面黏附的 CFSE 分子； 5. 完全培养基重悬、技术，接种到培养皿中，实验组加入 CpG 刺激增殖； 6. 3 天后取出细胞，离心，CD19 染色后清洗重悬上机检测。

数据分析

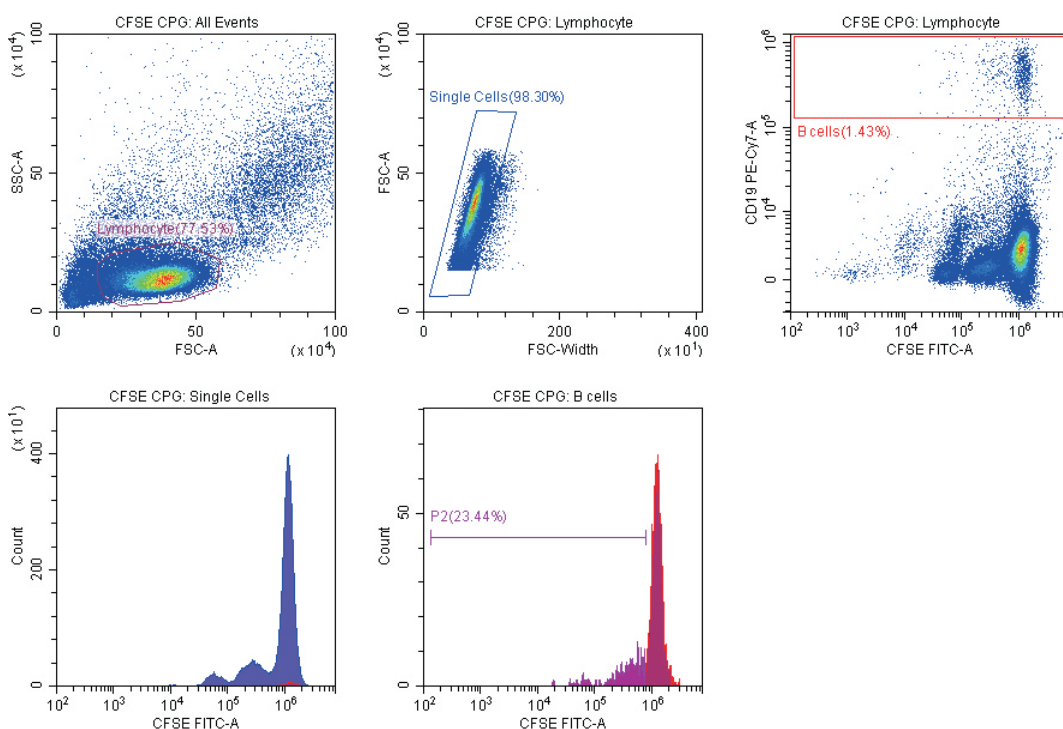
在 FSC/SSC 上圈出淋巴细胞，使用 FSC-W/FSC-A 排除黏连体，CFSE/CD19 图中圈出 CD19 阳性细胞，使用 CFSE 单参分别看淋巴细胞与 CD19 阳性（B 细胞）的增殖情况。

实验结果

对照组:



实验组:



结果显示, 经过 CpG 刺激 3 天后的 CD19 阳性细胞增殖效率比对照组有明显的提升 (23.44%:18.70%)。CytoFLEX 能明显地区分淋巴细胞增殖的不同代数, 从图中看至少有明显的 5 代细胞, 而且 CD19 阴阳性区分也十分明显, 体现出了出众的仪器灵敏度与分辨率。

➤ 陈血中红细胞微颗粒、过渡细胞和完整红细胞检测

实验简介

流式细胞仪在微颗粒检测方面的能力不断提高，不论是在工业、科研还是临床都有较广泛的应用。本实验主要是对陈血中红细胞微颗粒、过渡红细胞以及完整红细胞的检测，对临床诊断具有非常重要的意义。

材料与方法

试剂

Laser	405 nm					488 nm					638 nm		
Fluor	KrO	PB	V610	V660	V780	FITC	PE	ECD	PC5	PC7	APC	APCA 700	APCA 750
Marker						Anne xin-V	Gly-A						

样品制备

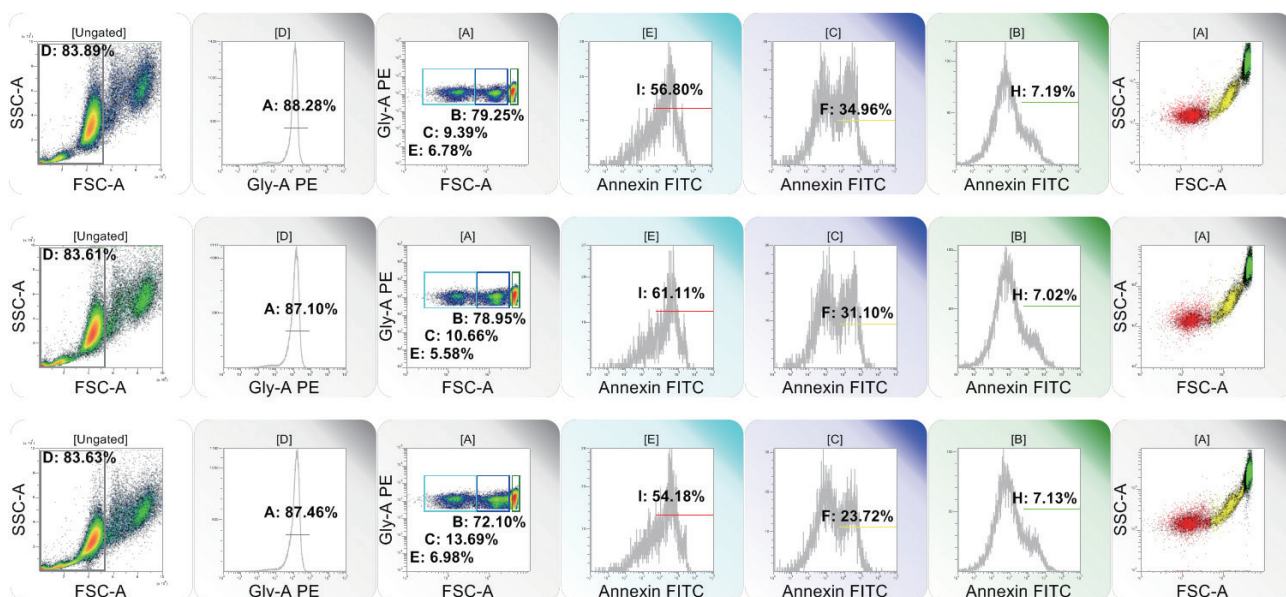
Sample Type	3 个月陈血，三个样本，重复三次
Species	人
Age of specimen	样本染色后 1 h 之内完成上机检测
Prep Method	10 ul 血稀释到 100 ul, 加入抗体孵育 20 min 上机

数据分析

D 门去除红细胞粘连群体，A 门选取 Gly-PE 强表达的细胞，与 FSC 强度区分为三群细胞 B（高）、C（中间）、E（低），再分析 annexin 与这三群细胞结合的细胞比例。E 门里 annexin 阳性细胞群（红色）为红细胞微颗粒，C 门里 annexin+（黄色）为过渡红细胞，B 门里 annexin+（绿色）为完整的红细胞，最后用 FSC 和 SSC 来表现这三群的分布情况。

* 实验数据由 University of Pittsburgh Cancer Center 提供（由 Kaluza 软件分析）

实验结果



					Microparticles	Transitional	Intact RBC
Sample	Total clean events (A)	FS_Low	FS_Int	FS_Hi	AnnexP_FS_Low	AnnexP_FS_Int	AnnexP_FS_Hi
W084514A	84010	11.2%	1.0%	86.4%	63.0%	18.9%	7.6%
W084514B	83365	11.7%	2.6%	83.7%	59.0%	19.6%	7.4%
W084514C	82680	11.0%	4.4%	81.8%	61.9%	17.5%	7.2%
Mean	83352	11.3%	2.7%	84.0%	61.3%	18.7%	7.4%
SD	665	0.4%	1.7%	2.3%	2.1%	1.1%	0.2%
CV	0.8%	3.2%	64.1%	2.7%	3.4%	5.7%	2.5%
W085315A	84586	9.7%	1.8%	86.2%	55.9%	15.6%	5.2%
W085315B	82371	9.2%	0.4%	88.5%	57.0%	31.0%	5.7%
W085315C	85298	8.6%	1.9%	87.1%	54.8%	15.1%	4.8%
Mean	84085	9.2%	1.4%	87.3%	55.9%	20.6%	5.2%
SD	1526	0.5%	0.9%	1.1%	1.1%	9.0%	0.4%
CV	1.8%	5.8%	62.6%	1.3%	2.0%	43.8%	8.4%
W086114A	79488	6.8%	9.4%	79.3%	56.8%	35.0%	7.2%
W086114B	73871	5.6%	10.7%	79.0%	61.1%	31.1%	7.0%
W086114C	79430	7.0%	13.7%	72.1%	54.2%	23.7%	7.1%
Mean	77596	6.4%	11.2%	76.8%	57.4%	29.9%	7.1%
SD	3226	0.8%	2.2%	4.0%	3.5%	5.7%	0.1%
CV	4.2%	11.7%	19.6%	5.3%	6.1%	19.1%	1.2%

► 活细胞周期 -Hoechst 33342

实验简介

常用的细胞周期染料如 PI、7-AAD、DAPI 等都不具备透膜能力，使用该类方法均需使用如酒精、皂素、Triton 等给细胞固定打孔，如果检测目标包括胞内表达的游离荧光蛋白，则对结果准确性有很大影响。

Hoechst 33342 也是 DNA 染料之一，其特点是不需要固定便可透过细胞膜。所以，可以在周期检测同时可以进行荧光蛋白检测。

材料与方法

试剂

Laser	405 nm					488 nm					638 nm		
Fluor	KrO	PB	V610	V660	V780	FITC	PE	ECD	PC5	PC7	APC	APCA 700	APCA 750
Marker		Hoechst 33342											

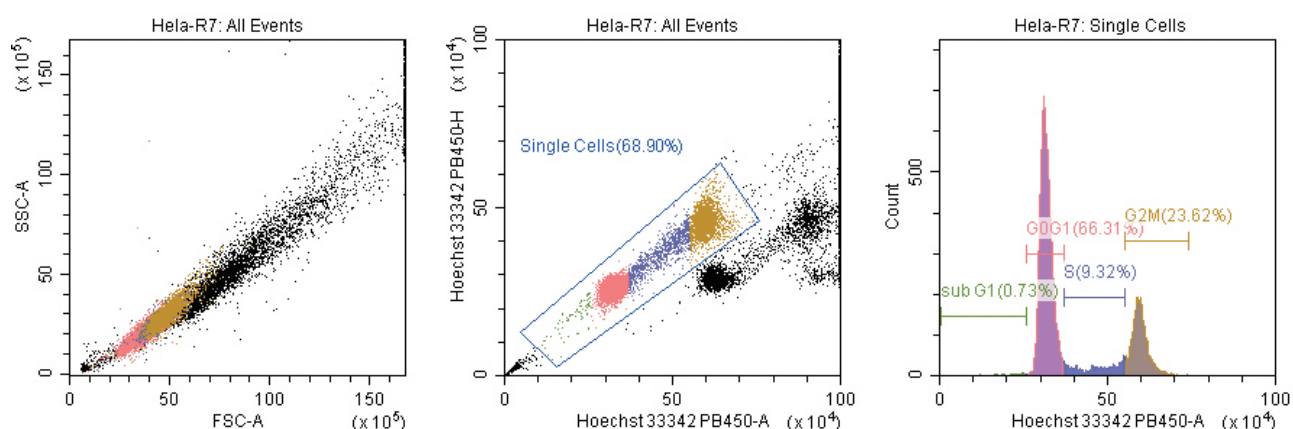
样品制备

Sample Type	Hela
Species	人
Age of specimen	样本染色后 1 h 之内完成上机检测
Prep Method	1. Hela 细胞消化后至于离心管，重悬于完全培养基中，细胞浓度调整至 1×10^6 ； 2. 加入 Hoechst 33342 工作液至终浓度 $5 \mu\text{g/mL}$ ； 3. 避光 37°C 水浴染色 60 min，每 15 min 混匀一次； 4. 离心，去上清。PBS 重悬，上机检测。

数据分析

先使用 FSC/SSC 找到待测细胞，并设定适当的阈值；使用 Hoechst 33342-A/Hoechst 33342-H 散点图圈出单个细胞，排除黏连体及碎片；将单细胞门应用至 Hoechst 33342-A 单参图得到经典周期图，使用水平门划出 subG_1 、 G_0/G_1 、S、 G_2/M 的位置，或用第三方软件进行周期拟合。

实验结果



Tube Name: HeLa-R7

Sample ID:

Population	Events	% Total	% Parent	rCV Hoechst 33342 PB450-A
● All Events	14924	100.00%	100.00%	47.96%
● Single Cells	10283	68.90%	68.90%	11.10%
● sub G1	75	0.50%	0.73%	19.67%
● G0G1	6819	45.69%	66.31%	5.29%
● S	958	6.42%	9.32%	16.06%
● G2M	2429	16.28%	23.62%	3.54%

Hoechst 33342 通常在流式细胞仪中使用 355 nm 激发以达到最佳的激发效果，405 nm 激光激发效率不到 20%，但凭借 CytoFLEX 高达 80 mW 功率的 405 nm 激光与最佳的检测灵敏度使得使用 405 nm 检测 Hoechst 成为可能。

结果中 G₀/G₁ 及 G₂/M 期细胞集中，显示出非常好的 CV 值，不管用手动水平门分析或第三方软件拟合分析都能获得非常漂亮的结果。

巨噬细胞吞噬实验

实验简介

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

激活的巨噬细胞具有吞噬表面带有阳性可调理基团荧光微球的功能，将含有巨噬细胞的腹腔液与调理过的荧光微球孵育一定时间后，去除多余未被吞噬的微球，收集以巨噬细胞为主的标本，用流式细胞仪检测巨噬细胞，计数吞噬荧光微球的巨噬细胞，计算吞噬百分率和吞噬指数。用流式细胞仪检测巨噬细胞吞噬能力具有检测快速、准确的特点。

材料与方法

试剂

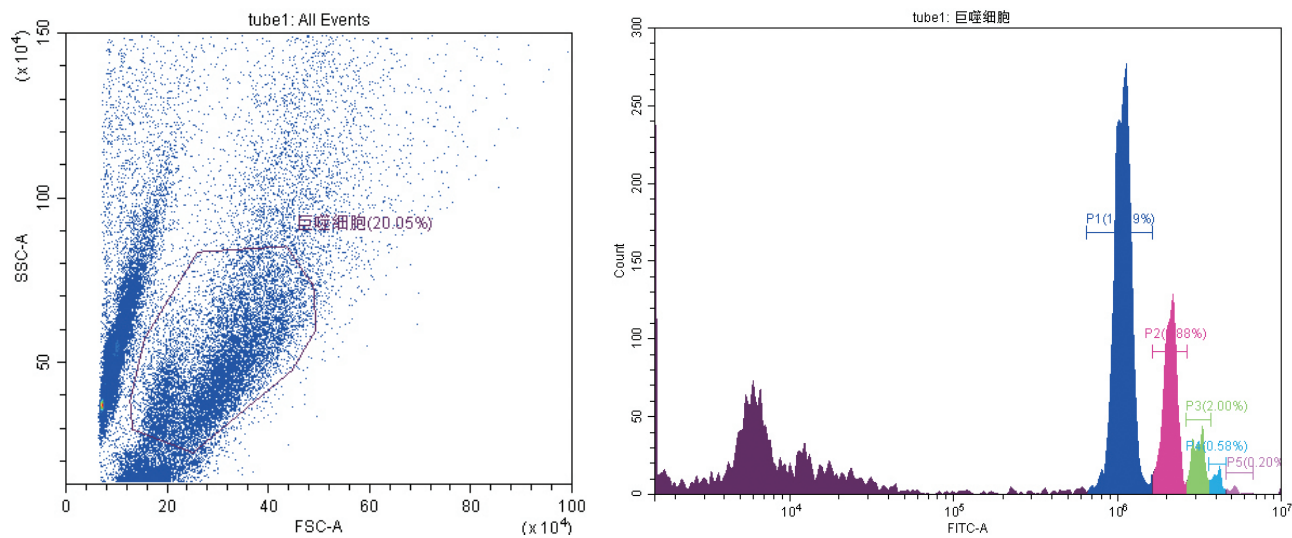
Laser	405 nm					488 nm					638 nm		
Fluor	KrO	PB	V610	V660	V780	FITC	PE	ECD	PC5	PC7	APC	APCA 700	APCA 750
beads						2 μm							

样品制备

Sample Type	巨噬细胞
Species	小鼠
Age of specimen	实验当天取小鼠腹腔巨噬细胞进行实验。
Prep Method	荧光微球预调理： 取荧光微球与 1% BSA 以 1:100 体积比混匀，37℃孵育 30 min，超声处理 5 min。 巨噬细胞获取： 1. 实验当天用颈椎脱臼法处死小鼠，腹腔注射 5% 小牛血清的 Hank's 液 3 mL / 只，轻轻按揉腹部 20 次，以充分洗出腹腔巨噬细胞，然后将腹壁剪开一个小口，吸取腹腔洗液； 2. 用 75 μm 过滤器过滤至试管内调整巨噬细胞数为 $4-6 \times 10^5$ /mL。 荧光微球与巨噬细胞孵育： 1. 用移液枪吸取 1mL 腹腔洗液于 6 孔培养板中，加入已经预调理过的荧光微球 (1×10^7 / 孔)，37℃细胞培养箱避光孵育 120 min； 2. 孵育结束后弃上清 (含未贴壁细胞和多余荧光微球)，每次使用 1 mL PBS 缓冲液轻轻洗涤 2 次，去上清后再加入 4℃ PBS 缓冲液 0.3 mL，用细胞刮刮下贴壁细胞，轻轻吹打均匀后经 300 目滤膜过滤后上机分析。

数据分析

- 1. 建立 FSC/SSC 双参数散点图，525/40 BP（FITC）通道单参数直方图；
- 2. 根据细胞大小及阴性峰的位置调节 FSC 及 SSC 的 gain 值；
- 3. 圈中巨噬细胞群，FITC 通道直方图 gate 到要研究的巨噬细胞。调节 FITC 通道的 gain 值；
- 4. 检测样本管。



实验结果

Sample ID:

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

结果中“巨噬细胞”代表总的巨噬细胞，“P1”代表吞噬一个荧光微球的巨噬细胞，“P2”代表吞噬两个荧光微球的巨噬细胞，“P3”代表吞噬三个荧光微球的巨噬细胞，“P4”代表吞噬四个荧光微球的巨噬细胞，“P5”代表吞噬五个荧光微球的巨噬细胞。

常用吞噬百分率和吞噬指数来反映巨噬细胞的吞噬能力。

吞噬百分率（%）= $\frac{\text{吞噬荧光微球的巨噬细胞数}}{\text{计数的巨噬细胞数}} \times 100 = 28.75\%$

吞噬指数= $\frac{\text{被吞噬的荧光微球总数}}{\text{计数的巨噬细胞数}} = 0.42$

➤ 蓝藻计数

实验简介

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

材料与方法

试剂

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

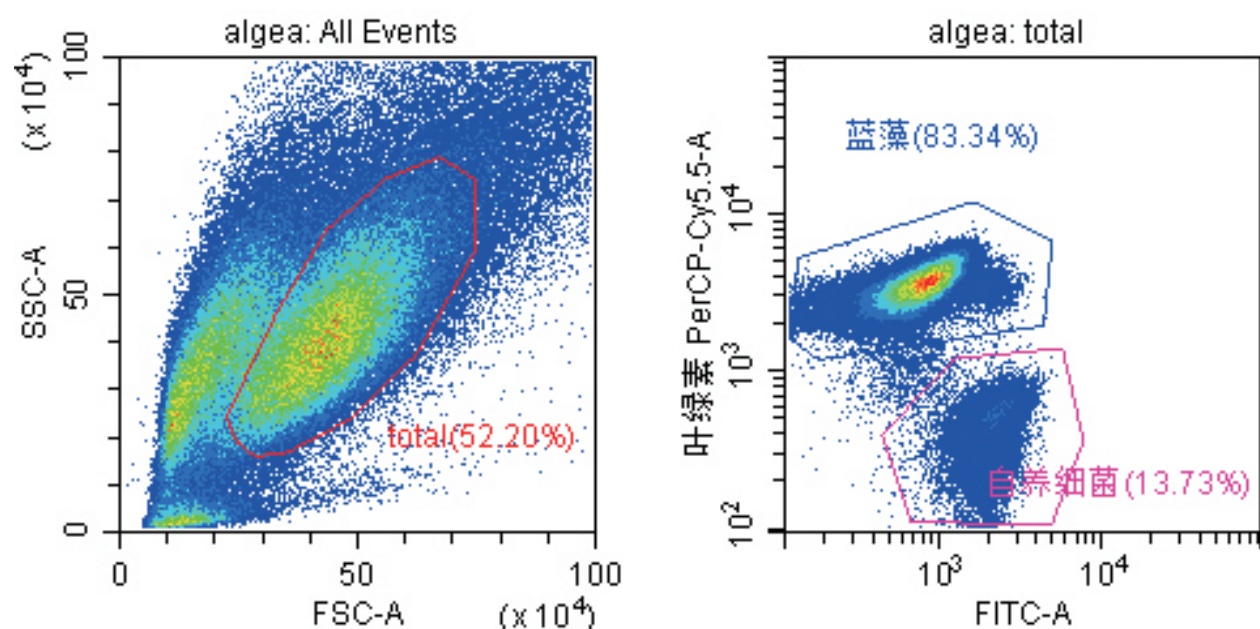
样品制备

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

数据分析

在 FSC-SSC 上圈选 FSC 较大的细胞群，排除水中杂质及小颗粒。在细胞群 total 中选择 FL3 阳性的为带红色自发荧光（叶绿素）的蓝藻群体，FL3 阴性的为水中的自养细菌，在统计中勾选“体积”、“events/ul (V)”即可对样本进样体积和各群体浓度测算。

实验结果



Tube Name: algea

Sample ID:

Volume(μ L): 3.7

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

➤ 囊泡检测

实验简介

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

材料与方法

试剂

Laser	405 nm					488 nm					638 nm		
Fluor	KrO	PB	V610	V660	V780	FITC	PE	ECD	PC5	PC7	APC	APCA 700	APCA 750
Marker						Anne xin-V	CD63			CD41			

样品制备

Sample Type	Species	Age of specimen	Prep Method
全血	小鼠	新鲜	1. 取新鲜的小鼠全血，加入柠檬酸钠抗凝剂。用离心机 2500 xg 离心 15 min，将上清液倒掉； 2. 画 FSC/VSSC 散点图，用 Megamix-Plus FSC beads（100, 160, 200, 240, 300, 500, 900 nm）来标定囊泡微颗粒的位置； 3. 用 Annexin V FITC, CD41 PE and CD63 PE-Cy7 对囊泡微颗粒进行染色，用 CytoFLEX 进行检测。

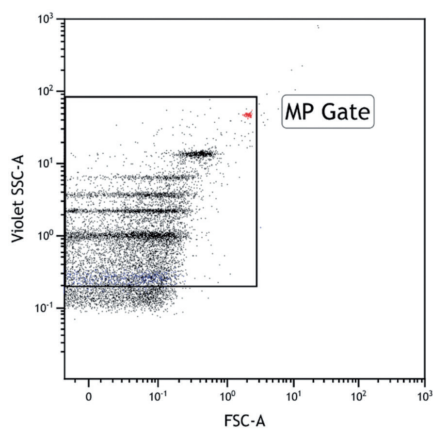
数据分析

1. 建立 FSC / VSSC 散点图，检测 Megamix-Plus FSC beads（100, 160, 200, 240, 300, 500, 900 nm），调整 gain 值。圈定 100 nm - 900 nm 微颗粒分布区域，设定门 MP Gate。同样电压条件下，样本检测管分布于 MP Gate 门内的即为囊泡微颗粒；
2. 建立 AnnexinV-FITC/APC 双参数散点图，通过 AnnexinV 表达量的多少，区分不同类型的微颗粒。并建立 CD63-PE/CD41-PC7 双参数的散点图，来检测不同类型的囊泡微颗粒，细胞表面抗原的不同。

* 实验数据由 Kaluza 软件分析

实验结果

1. Megamix-Plus FSC beads 检测结果



根据微球（100, 160, 200, 240, 300, 500, 900 nm）的分布，界定微颗粒的位置，将门命名为“MP Gate”。

2. 囊泡微颗粒检测结果

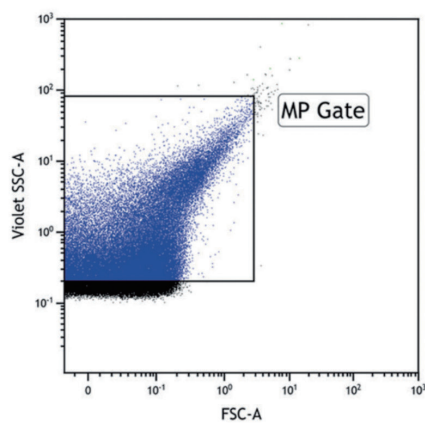


Figure A

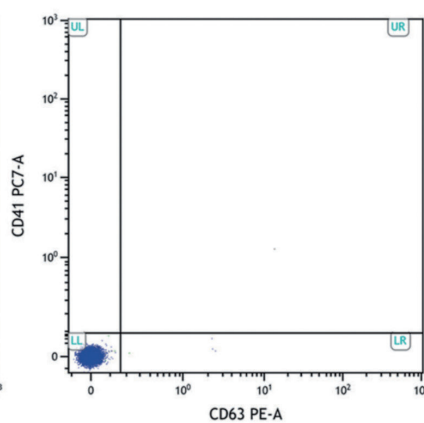


Figure B

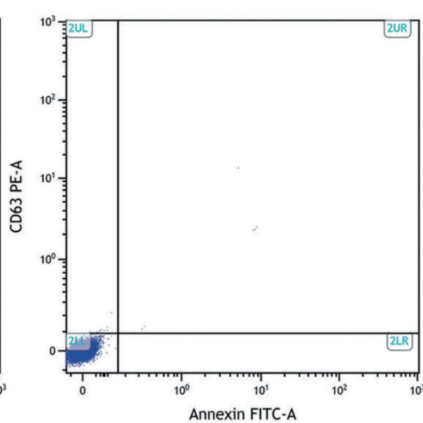


Figure C

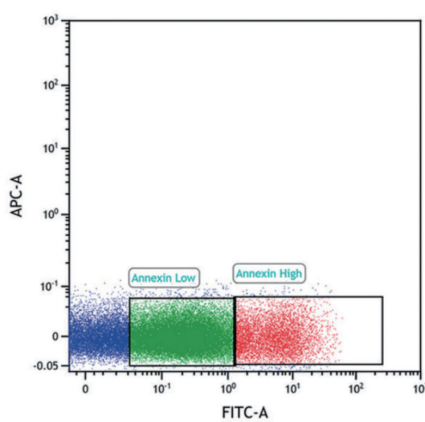


Figure D

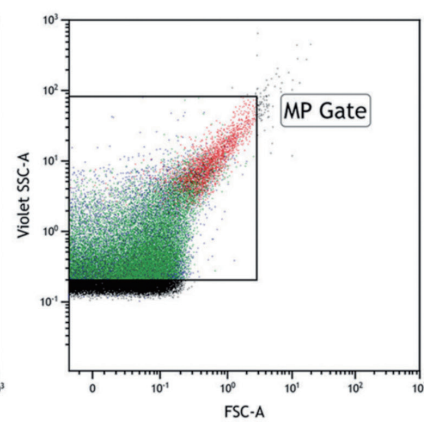


Figure E

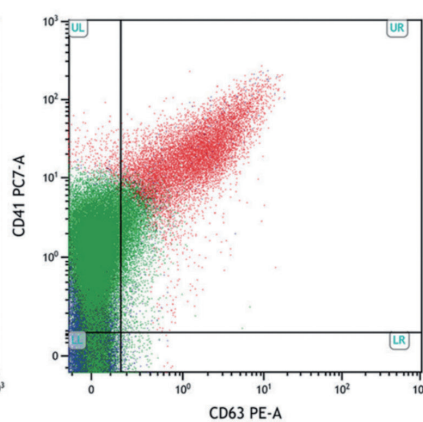


Figure F

图 A 中 MP Gate 显示囊泡微颗粒；图 B 和 C 为相应荧光通道中，微颗粒的自发荧光；

图 D 中显示两群 Annexin-V 阳性细胞群标记囊泡微颗粒。Annexin-V dim 在图中用绿色显示，该群微颗粒表达 CD41 不表达或低表达 CD63，且细胞较小；Annexin-V high 在图中用红色显示，该群微颗粒表达 CD41+CD63+，且细胞相对较大。

微颗粒检测

实验简介

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

材料与方法

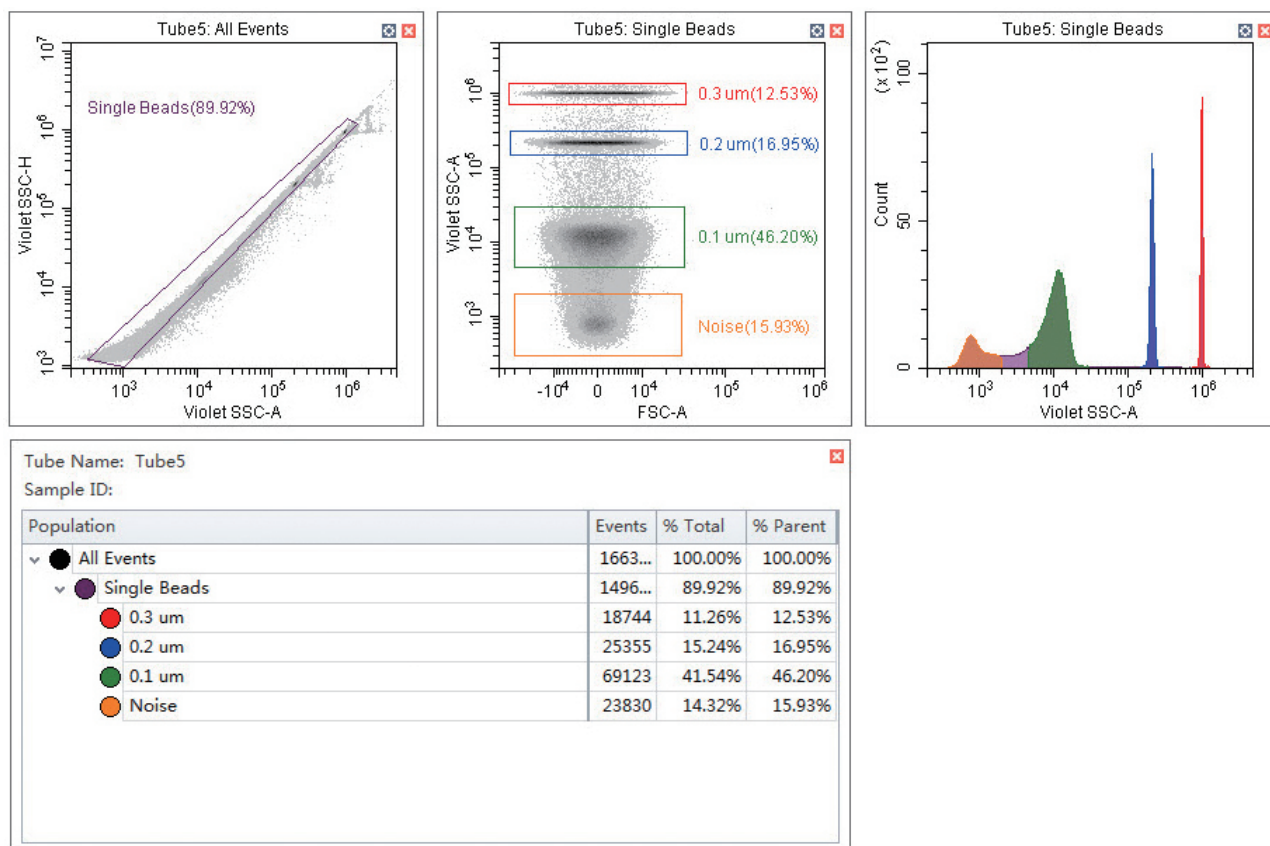
试剂

Laser	405 nm
Filter	VSSC

样品制备

Sample Type	Prep Method
PCS Control Mixed Kit	- 取 100 nm 微球一滴，200 nm 和 300 nm 的微球各 3 滴，以 0.22 μm 滤膜过滤的三蒸水稀释至 1 mL，混匀样本； - 上机检测。

结果



细胞凋亡

实验简介

细胞凋亡时会发生一系列形态学特征的变化，质膜的改变是凋亡早期的特征之一，例如质膜内侧的磷脂酰丝氨酸（phosphatidylserine, PS）重新分布，由胞膜内侧翻转到胞膜外侧，暴露于细胞外表面，Annexin-V 是一种分子量在 35-36KD 的钙离子依赖性磷脂结合蛋白，能够与细胞凋亡过程翻转到膜外的 PS 高亲和力特异性的结合，在 Annexin-V 上链接一种荧光染料（如 FITC），就可以通过流式监测到早期凋亡的发生；

PI（Propidium iodide）是一种核酸染料，它不能透过完整的细胞膜，而凋亡中晚期的细胞和死细胞细胞膜破损，PI 能够透过而使细胞核染色。将 Annexin-V 和 PI 联合使用，可以将凋亡早期的细胞和晚期的细胞以及死细胞分开。

材料与方法

试剂

Laser	405 nm					488 nm					638 nm		
Fluor	KrO	PB	V610	V660	V780	FITC	PE	PI	PC5	PC7	APC	APCA 700	APCA 750
Marker						Anne xin-V		PI					

样品制备

Sample Type	Species	Age of specimen	Prep Method
A549	人 类 肺 癌 细胞系	样本染色后 1h 之内 完成上机检测	1. 收集细胞，用 buffer 调整细胞浓度 1×10^6 /100 ul/test; 2. 加 5 ul Annexin V 和 10 ul PI，室温避光 20 min; 3. 加 400 ul buffer 上机检测

数据分析

Annexin V-FITC 和 PI 是细胞凋亡检测最常用的试剂，这两种荧光素都能被 488nm 激光器激发，信号接收通道分别为第一通道（FITC）和第三通道（ECD），因此凋亡检测方案第一张图为 FSC/SSC，将细胞群体全部圈中，第二张图为第一通道和第三通道的散点图，即可分析细胞群体中各凋亡时期所占的比例。

实验结果

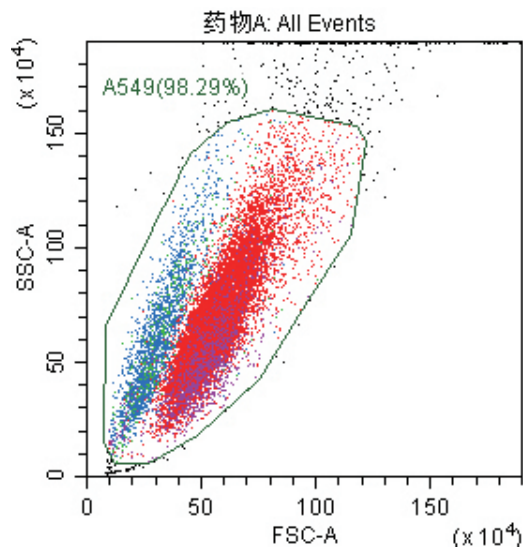


图 1

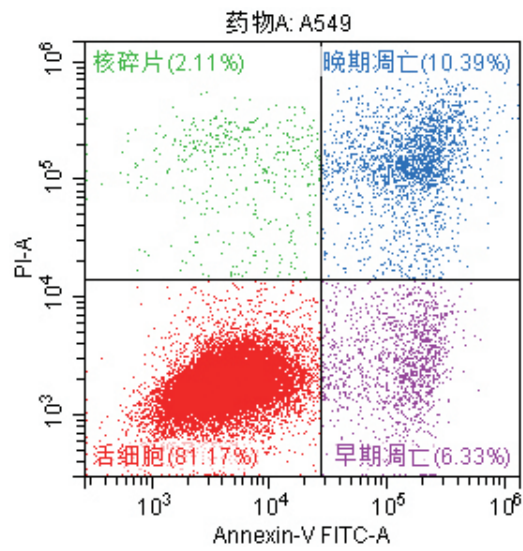


图 2

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

细胞因子检测

实验简介

细胞因子在淋巴细胞免疫功能调节方面发挥重要作用，它可以调节多种细胞的生长、分化和功能，调节正常与病理状态下的免疫应答。研究生理或病理免疫调节因素导致细胞因子合成的应答与改变是探寻疾病病因与免疫状态关系的重要工具。本实验采用优化的一管 8 色的多色检测方案对人外周血 T 细胞亚群的 IFN- γ 、IL-17、颗粒酶、穿孔素表达情况进行了研究。从实验结果图上可看出，本实验在 CytoFLEX 上检测时各细胞群体分群明显，检测结果确切可信，能够非常漂亮地完成此类实验。

材料与方法

试剂

Laser	405 nm					488 nm					638 nm		
Fluor	KrO	PB	V610	V660	V780	FITC	PE	ECD	PC5	PC7	APC	APCA 700	APCA 750
Marker	CD45	IFN- γ				IL-17	Gran zyme B			CD4	Perforin	CD8	CD3

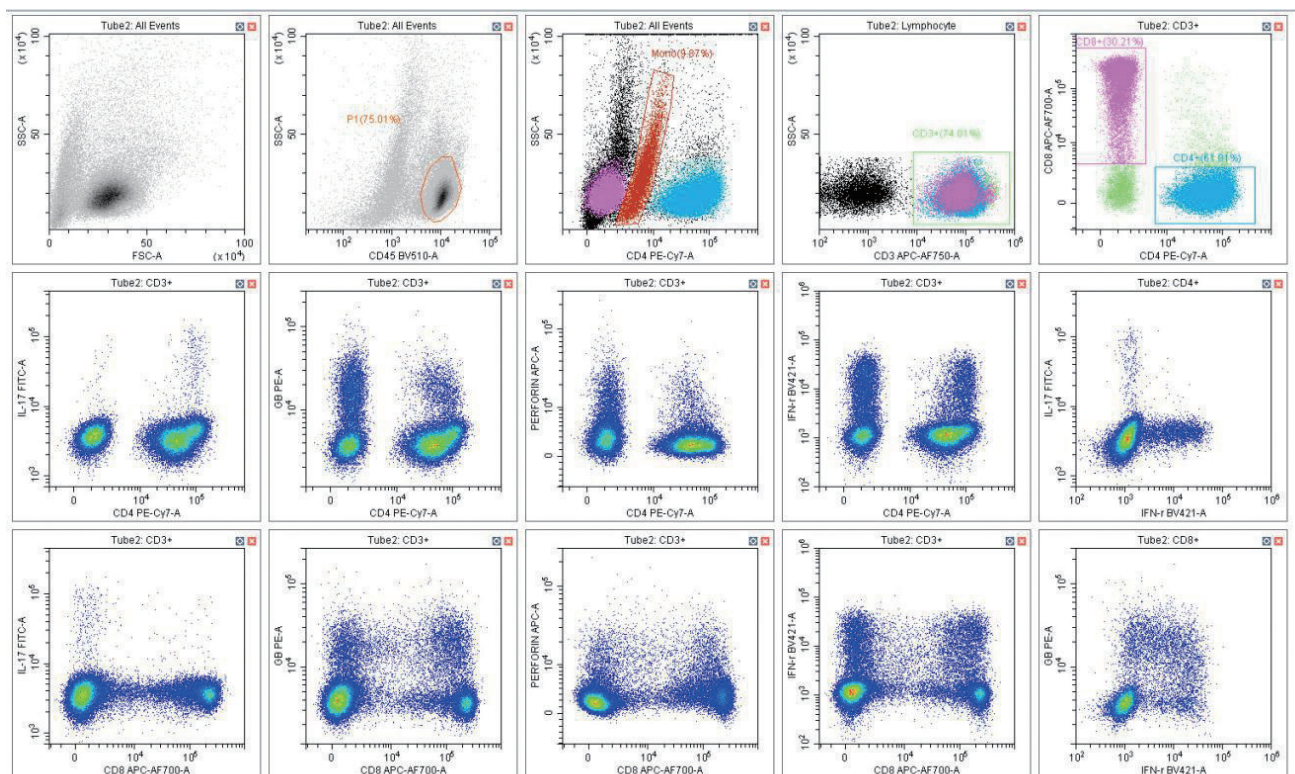
样品制备

Sample Type	外周血单个核细胞
Species	人
Age of specimen	样本染色后 1 h 之内完成上机检测
Prep Method	1. 取 200 ul 全血加 200 ul1640，并加入适量 PMA 等试剂，刺激 4 h； 2. 混匀后去 100 ul 刺激后的标本并加入相应膜抗，室温避光孵育 20 min； 3. 加固定液，孵育后离心去上清； 4. 加入适量生理盐水，1500 rpm 转速下离心 5 min 去除上清液； 5. 加破膜液混匀，并加入相应胞浆抗体适量，混匀后室温避光，孵育 20min； 6. 加入适量生理盐水，1500 rpm 转速下离心 5 min 去除上清液； 7. 重复 6； 8. 加入 300-500 ul 预冷的 PBS，混匀后上机检测。

数据分析

使用 CD45/SSC 设门，选取淋巴细胞群（设逻辑门排除掉混杂的单核细胞），然后再取 CD3+T 淋巴细胞；分别分析 Th 细胞与 TS 细胞的相关因子的表达情况。

实验结果



细胞周期 -PI

实验简介

以哺乳动物细胞为例，细胞周期分为不同的时相：G0 期是细胞静止期，不在细胞周期内（2C DNA）；G1 期既是一次分裂的结束又是另一个周期的开始（2C DNA）；细胞在 S 期合成新的 DNA（2C DNA ~ 4C DNA）；G2 期完成 DNA 复制，拥有两倍于正常细胞的 DNA 量（4C DNA）；M 期是有丝分裂期，同样含有 4C DNA 量，在这个时相经历染色质浓缩和组织，将遗传物质平均分配到两个子细胞中，每一个子细胞都是 2C DNA。

在不同的细胞周期时相中，DNA 含量存在差异，用核酸染料（如 PI 和 Hoechst 33342）对 DNA 进行染色，根据 DNA 荧光强度的变化，判断细胞所处的细胞周期时相（G1、S、G2、M），再根据各时相中的细胞数算出其所占细胞总数的百分比。

材料与方法

试剂

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

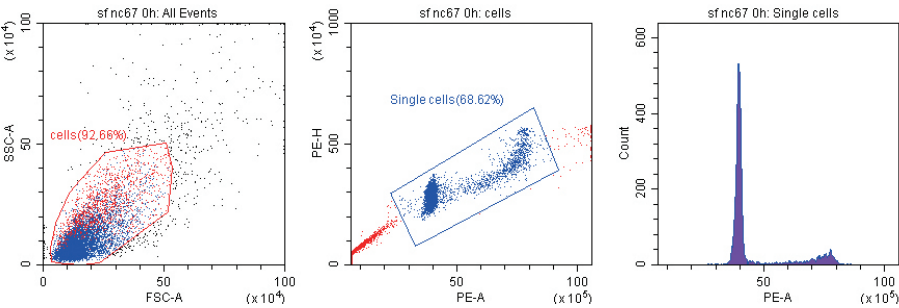
样品制备

Sample Type	皮肤成纤维细胞
Species	人
Age of specimen	样本染色后 1 h 之内完成上机检测
Prep Method	皮肤成纤维细胞经胶原酶消化、筛网过滤获得。胰酶消化制备单细胞悬液，使用 NP40/PI 染液（含有 sodium citrate、NaCl、Nonidet P-40、PI），加 RNase，37 °C 水浴 30 min，上机检测。

数据分析

PI 是细胞周期检测最常用的试剂，能被 488 激光器激发，信号接收通道为第二通道（PE）或第三通道（ECD）。在分析周期时需要注意去除粘连体，因为如果两个细胞粘连在一起形成团块，它的 DNA 含量正好加倍，看起来好像是一个四倍体细胞，会造成检测误差。因此周期检测方案第一张图为 FSC/SSC，将细胞群体圈中，第二张图为 PE（ECD）高度信号和面积信号的散点图，用以去除粘连体，面积信号和高度信号一致的细胞群体为单细胞群体；最后以 PE（ECD）直方图来分析单细胞群体的周期状态。

实验结果



➤ 细菌周期倍体分析

实验简介

流式细胞仪有快速、灵敏度高、多参数等优势，目前它已经被广泛运用于细菌的各项常规检测中。细菌的流式检测主要在细菌计数、细菌活性测定、细菌周期测定、细菌的药敏试验以及细菌酶活性的检测中。而这些也已经应用于临床检测、工业生产、环境检测能等各个领域。实验室中常规的菌体计数方法是采用平板法和显微镜法，但其耗时长、误差大。流式可以通过体积法和 bead 法对细菌进行快速的精确计数，有着很大的优势。在工业微生物发酵生产中往往会对细菌进行死活率的检测，以确保生产效率，通过不同时间点的计数来了解其生长动态。临床检测中流式可快速检测抗生素抗菌效应，将细菌和抗生素接触后，检测其体积和 DNA 含量是否增加。环境检测中可以通过细菌计数来了解饮用水、地表水的情况，并通过细菌酯酶活性来评估环境水污染情况。本实验主要是对改造过后的大肠杆菌进行了抗药性实验进行倍性分析和计数。

材料与方法

试剂

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

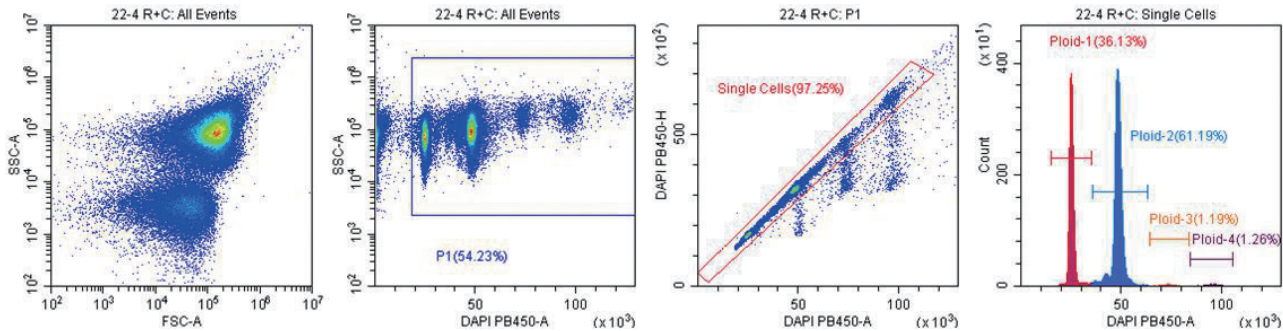
样品制备

Sample Type	E.coli
Species	
Age of specimen	样本染色后 1 h 之内完成上机检测
Prep Method	1. 富集 E.coli，70% 冰乙醇固定 4 h; 2. 离心后加入 5 ug/mL DAPI 染液（含 0.1%Triton-X100）染色 30 min; 3. 300 目滤网过滤后上机检测。

数据分析

在 FS-SS 上圈门 P1 门，排除杂质及小颗粒。再通过 FL8-A vs FL8-W、FL8-A vs FL8- 双参数散点图去除粘连体，最后通过 FL8-A 直接进行倍体分析，在统计中勾选“体积”、“events/ul (V)”“FL8 的 CV 值和 mean 值”即可对样本倍体比例，CV 值，各群体浓度等进行统计测算。通过与对照相比，改造后的大肠杆菌抗药性较强，药物处理后并没有发现对倍性有影响。

实验结果



Population	Events	% Total	% Parent	CV BV421-A	Mean BV421-A	Events/ μ l
● All Events	10305	100.0...	100.00%	79.82%	41519.4	264
● P1	10169	98.68%	98.68%	58.82%	41386.2	261
● P2	8139	78.98%	80.04%	35.01%	37868.8	208
● P3	8139	78.98%	100.00%	35.01%	37868.8	208
● P4	2623	25.45%	32.23%	11.56%	22447.6	67
● P5	4273	41.47%	52.50%	10.09%	40731.8	109
● P6	1222	11.86%	15.01%	8.08%	60918.7	31

小鼠脾细胞表型分析

实验简介

脾脏是机体最大的免疫器官，含有大量的淋巴细胞和巨噬细胞，是机体细胞免疫和体液免疫的中心，当机体免疫失衡时，免疫细胞的数量和比例都会发生变化，流式细胞仪能够直接检测出该变化的发生。该实验通过一个优化设计的 8 色方案，检测出了小鼠脾脏中 T、B 细胞亚群以及 FOXP3 的表达，从图中可以看出细胞分群好，结果的判读准确，操作简便，证明 CytoFLEX 卓越的性能和便捷的操作性。

材料与方法

试剂

Laser	405 nm					488 nm					638 nm		
Fluor	KrO	PB	V510	V660	V780	FITC	PE	ECD	PC5	PC7	APC	APCA 700	APCA 750
Marker		CD3	FVD			FoxP3	CD49b		CD4	CD19	TIGIT		CD8

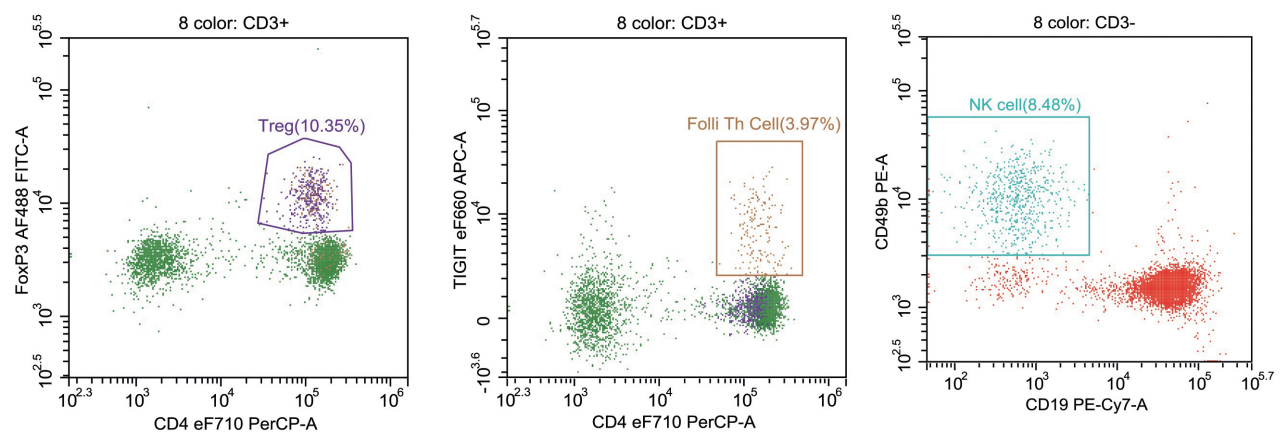
样品制备

Sample Type	c57bl/6 小鼠脾脏细胞
Species	小鼠
Age of specimen	6 周
Prep Method	1. 小鼠经颈椎脱臼，取出脾脏，放于 5mL 的 PBS+1%FBS+2mMEDTA 溶液中； 2. 研磨脾脏，经过过滤，得到脾脏细胞； 3. 裂解红细胞，计数细胞，调整到 1x10 ⁶ cells/mL； 4. 按照抗体说明书加抗体，染色，上机检测。

数据分析

- 1. 该实验比较简单，设门时圈中目的细胞，同时准确调节补偿，即可成功；
- 2. 对于裂红这个步骤，需要裂解完全，不然会对结果分析带来干扰。

实验结果



藻类分类计数

实验简介

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

材料与方法

试剂

Laser	405nm					488nm					638nm		
Fluor	KrO	PB	V510	V660	V780	FITC	PE	ECD	PC5	PC7	APC	APCA 700	APCA 750
Marker							藻胆素 phycobilin		叶绿素 chlorophyll				

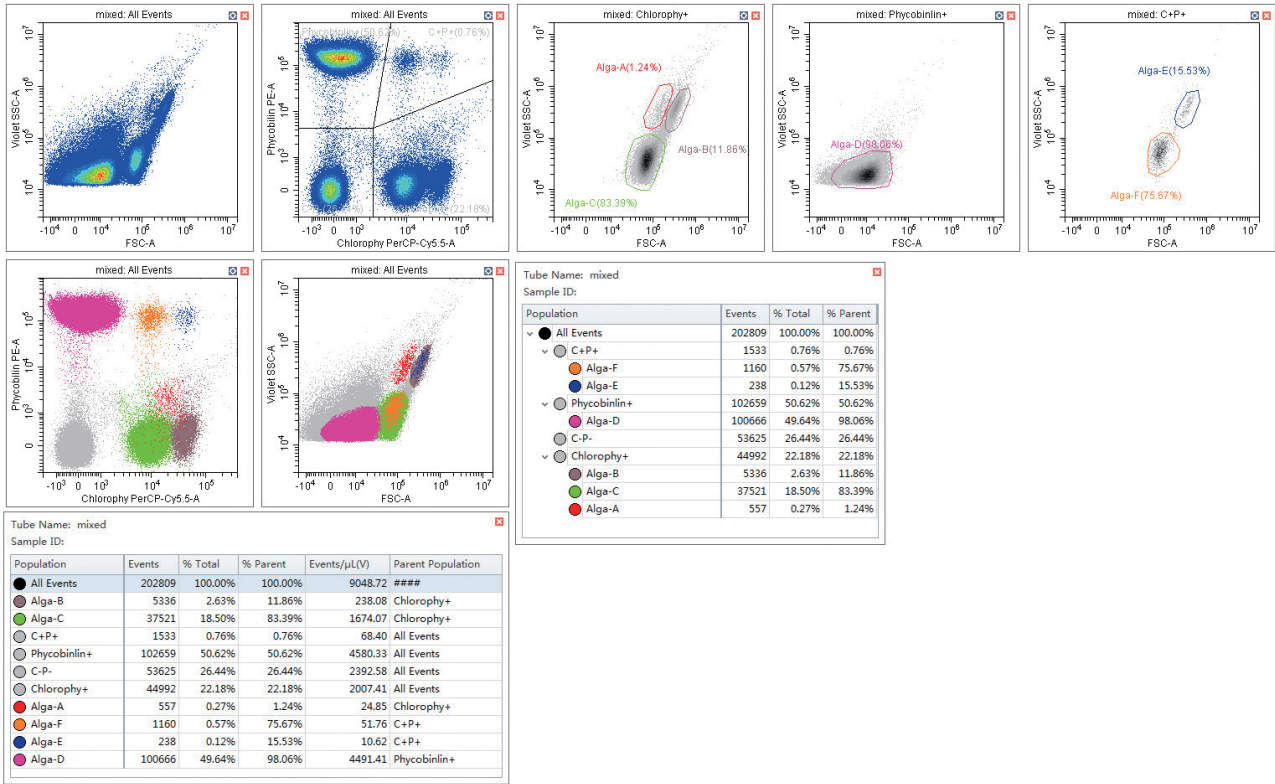
样品制备

Sample Type	A,B,C,D 四种藻类悬液 0.3 um，0.5 um，3 um，6 um，10 um 标准微球
Species	藻类
Age of specimen	实验室纯化培养藻种
Prep Method	样本浓度使用过滤的海水稀释至 10 的 4-7 次方之间，经 300 目滤网过滤后待测

数据分析

1. 采用默认条件建立 FS vs violet SS、FL3-A（叶绿素 chlorophyll）vs FL2-A（藻胆素 phycobilin）双参数散点图，复制两份 FS vs violet SS 双参数散点图；
2. 以 C+P-（chlorophyll 阳性 phycobilin 阴性）Gate 至 FS vs violet SS 双参数散点图后以细胞大小圈定藻 D；以 C-P+Gate 至 FS vs violet SS 双参数散点图后以细胞大小圈定藻 A，B，C；以 C+P+Gate 至 FS vs violet SS 双参数散点图后以细胞大小圈定藻 E，F。

实验结果



植物倍体

实验简介

植物的基因组大小机 DNA 倍性和植物的品系、性状及营养和药用价值有密切联系。检测植物的基因组大小和 DNA 倍性在植物的鉴定、杂交育种等领域有重要意义。流式细胞仪可在半小时内完成从样本制备染色、植物基因组大小和 DNA 倍性测定全过程，以其方便快捷得到广泛应用。CytoFLEX 流式细胞仪具有优异的荧光分辨能力，可轻易区分不同大小的基因组，多达 10 的 7 次方线性检测范围，可更好地检测自然界或育种过程中广泛存在的多倍体现象。

材料与方法

试剂

Laser	405nm					488nm					638nm		
Fluor	KrO	PB	V510	V660	V780	FITC	PE	ECD	PC5	PC7	APC	APCA 700	APCA 750
Marker							PI						

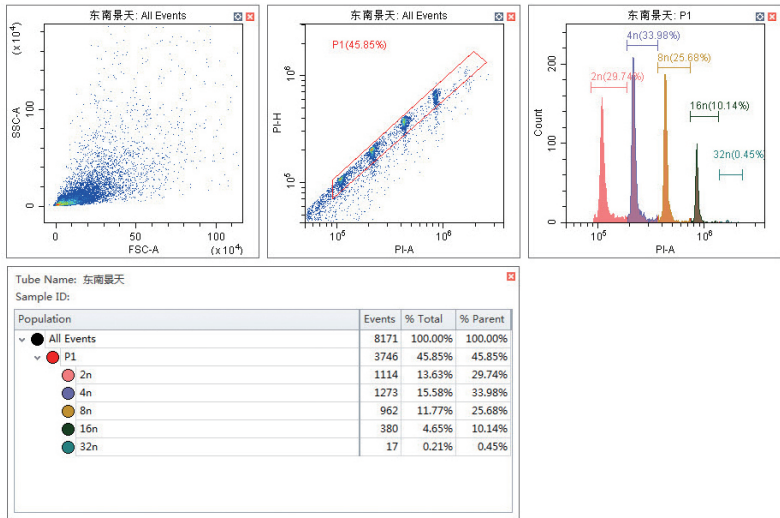
样品制备

Sample Type	
Species	多年生植物东南景天的嫩叶
Age of specimen	新鲜
Prep Method	1. 配置溶液 溶液 I：0.1 mol/L 柠檬酸 4.2 g, 0.5% 吐温 20，定容至 200 mL，4℃ 下保存备用 溶液 II：0.4 mol/L 磷酸氢二钠 28.65 g, PI 20 mg, 定容至 200 mL, 室温下保存备用 2. 取 20 mg 洗净去除中脉的新叶置于塑料培养皿中，移取), 用双面刀片将叶片切碎； 3. 用 1 mL 移液枪吸取切好的样品经 350 目尼龙筛网过滤到 1.5 mL Eppendorf 管中； 4. 对所得滤液在 13000 r/min 的条件下离心 30 s； 5. 用 1 mL 移液枪移去上清至 0.1 mL 处，加入新鲜的 I 溶液 200 μL 悬浮沉淀；在准备用流式细胞仪检测样品时，再向样品中加入 600 μL 溶液 II

数据分析

通过 PI-A/PI-H 双参数散点图排除黏连细胞，根据 2 倍体的位置判断其他倍体的位置

实验结果



► DAPI 检测倍体及 DNA 含量

实验简介

动物外周血核 DNA 含量和倍性水平是动物学研究中重要的基础研究指标。流式细胞仪作为检测这些指标的高效工具，在动物学研究的多个领域都发挥了重要作用。

采用流式细胞计数法，分别以二倍体泥鳅和鸡的红细胞为内参，对待测泥鳅红细胞核 DNA 含量进行了测定。

贝克曼库尔特试剂 NIM-DAPI（货号：731085），是用于一步法检测细胞周期的常用染料。其中，NIM 试剂使细胞和核膜具有通透性，DAPI 进入核内和 DNA 结合。

材料与方法

试剂

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

样品制备

Sample Type	鸡全血（2n）； 泥鳅全血（一种为已知 2n，另一种待测）。
Species	鸡、鱼
Age of specimen	新鲜样本
Prep Method	1. 用注射器取鸡翅膀下静脉全血及泥鳅尾静脉全血，加入用 PBS 稀释的终浓度为 1.5%EDTA 中（1:10000 稀释）； 2. 取 5 ul 稀释过的全血用 PBS 稀释到 50 ul, 加入 50 ul NIM-DAPI 染色 1 min 后上机检测。

仪器配置

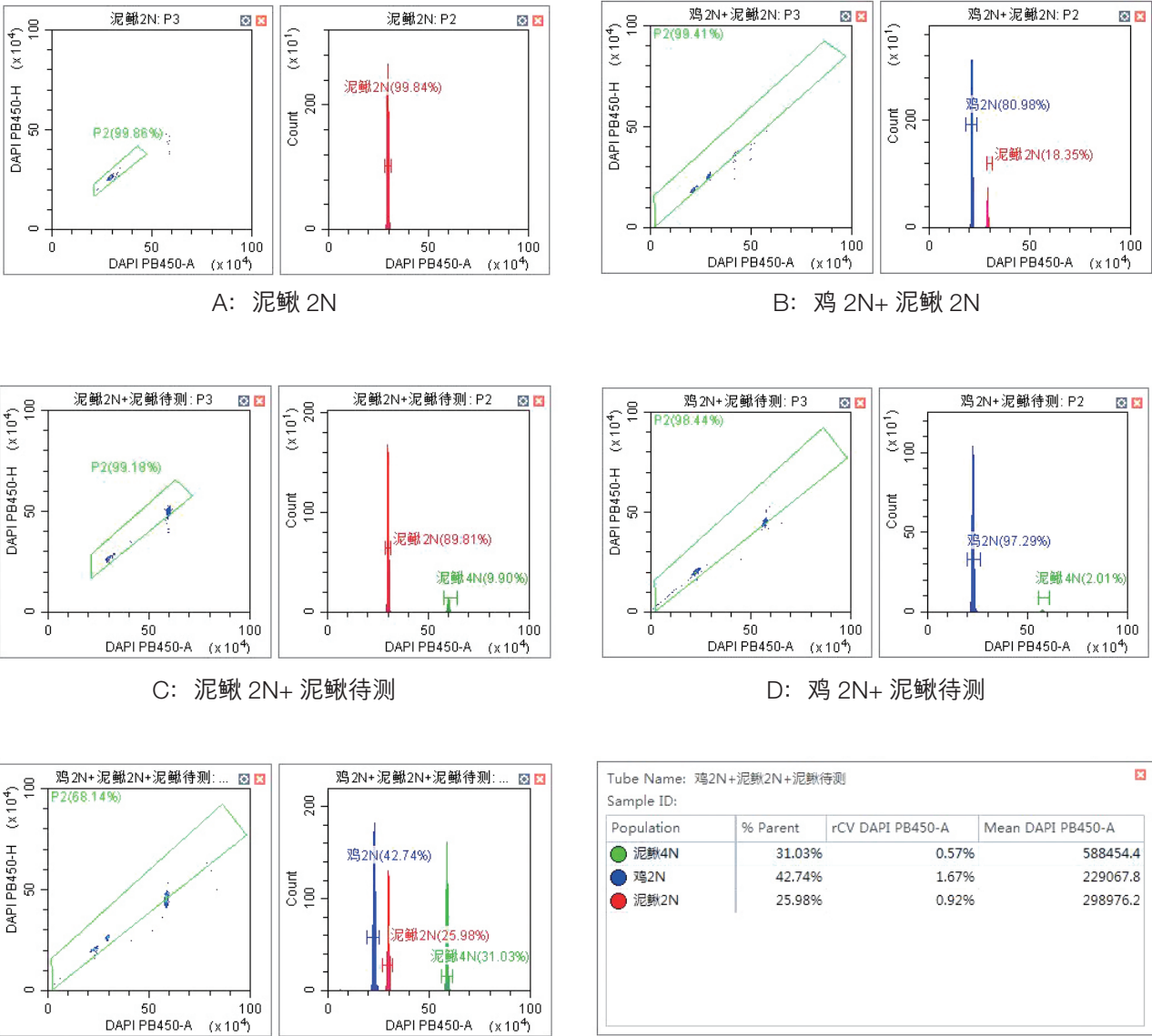
Instrument Configuration	VSSC (Yes/No)	Plate or Tube Format
B5-R3-V5	No	Tube

数据分析

1. 建立 FSC/SSC 双参数散点图，DAPI-A/DAPI-H（Lin）散点图去粘连，DAPI-A 直方图（Lin）检测倍性；
2. 分别检测以下样本：

A: 泥鳅 2N, B: 鸡 2N+ 泥鳅 2N, C: 泥鳅 2N+ 泥鳅待测, D: 鸡 2N+ 泥鳅待测, E: 鸡 2N+ 泥鳅 2N+ 泥鳅待测。

实验结果



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

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

2. 2N 泥鳅 DNA 含量 = 3.26pg/N

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

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

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

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

➤ 活性氧检测

实验简介

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

材料与方法

试剂

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

样品制备

Sample Type	人脐静脉内皮细胞 HUVEC
Species	人
Age of specimen	传代细胞
Prep Method	1. 细胞接种培养于 6 孔板，分空白、对照、A 药物处理组； 2. 空白组不加试剂，对照组及 A 药物处理组加入 DCFH-DA 染液，避光室温孵育 1 h； 3. 0.05% 胰蛋白酶消化收集细胞，4℃ 预冷 PBS 离心洗涤 2 次，PBS 重悬上机检测。

仪器配置

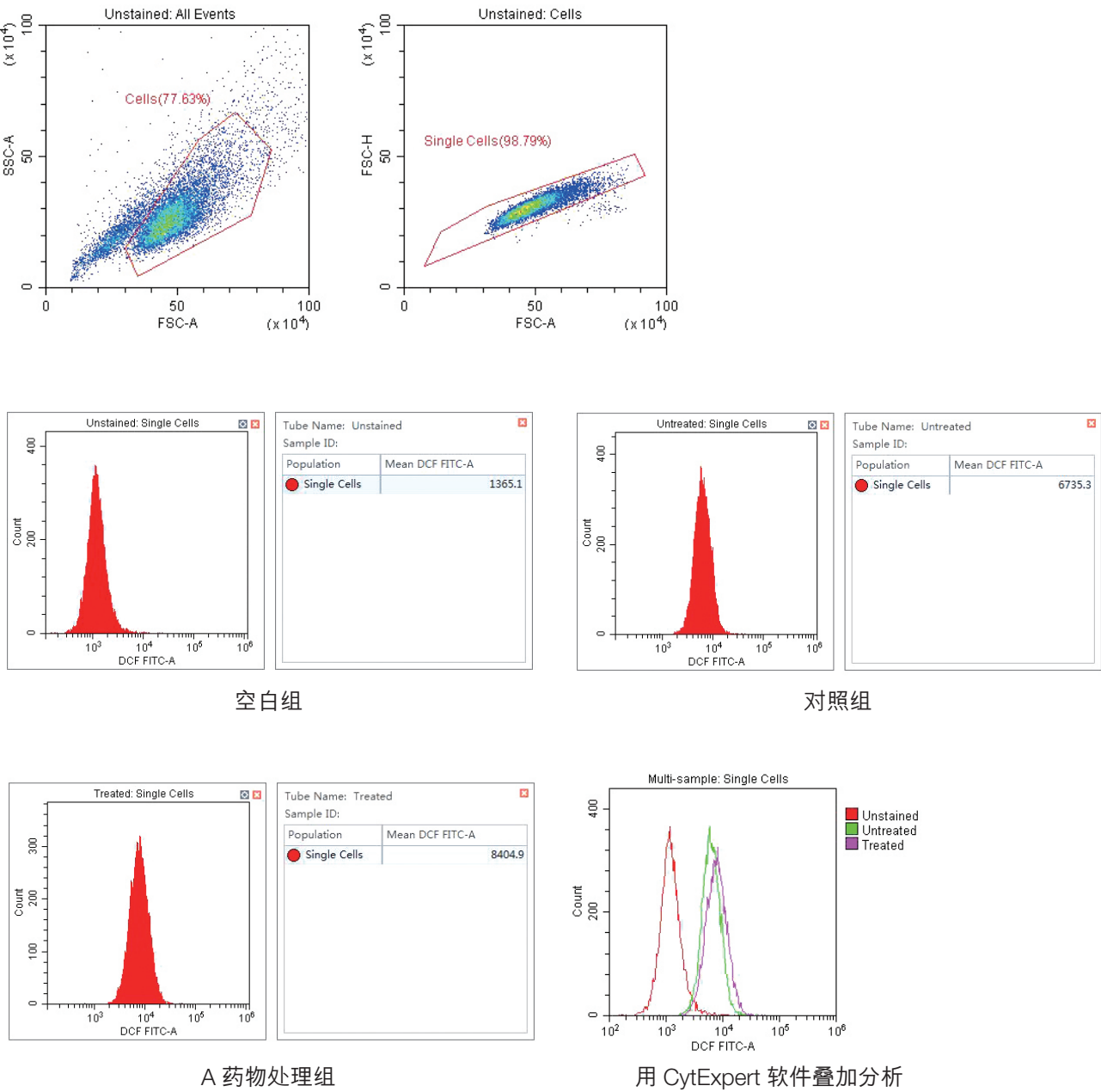
Instrument Configuration	VSSC (Yes/No)	Plate or Tube Format
B5-R3-V5	No	Tube

数据分析

1. 建立 FSC/SSC 双参数散点图选取细胞，FSC-A/FSC-H 双参数散点图排除粘连细胞，FITC 单参数直方图检测荧光信号；
2. 根据细胞大小及阴性峰的位置调节 FSC、SSC、FITC 通道的 Gain 值；
3. 检测样本管。

实验结果

设门策略



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

小鼠造血前体细胞检测

实验简介

目前较为公认的分群标记，将小鼠造血前体细胞（Hematopoietic stem and progenitor cells, HSPC）根据其多能性和分化程度，以 Sca-1 的表达高低作为分界，划分为两大群。其中，LSK（Lineage-IL7R-c-kit+Sca-1⁺）群代表具有多向分化潜能和一定干性的造血干细胞群，而 LK（Lineage-IL7R-c-kit+Sca-1⁻）群代表具有髓系分化能力但不具有干性的前体细胞。

经过 CD117（c-kit）磁珠分选可以富集 LSK 和 LK 细胞群，然后用荧光抗体标记、流式细胞仪检测可以鉴定两群细胞，得出细胞比例和数量。

材料与方法

试剂

Laser	405 nm					488 nm					638 nm		
Fluor	KrO	BV421	BV570	V660	V780	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	APCA 700	APCA 750
Marker		CD117 (c-kit)	CD45						Lineage (含 IL-7R α)			Sca-1	

样品制备

Sample Type	Species	Age of specimen	Prep Method
脾脏	小鼠 (荷瘤)	8-10 周	1. 小鼠脾脏置于 HBSS，400 目滤网研磨过滤； 2. 收集悬液，380g 4℃ 离心 7 min； 3. CD117 磁珠 4℃ 孵育 30 min，过柱，收集阳选细胞； 4. 抗体染色，上机检测。
骨髓	小鼠 (荷瘤)	8-10 周	1. 取小鼠后肢股骨和胫骨，用注射器取 HBSS 冲洗 2 次； 2. 400 目滤网过滤； 3. 收集悬液，380g 4℃ 离心 7 min； 4. CD117 磁珠 4℃ 孵育 30 min，过柱，收集阳选细胞； 5. 抗体染色，上机检测。

仪器配置

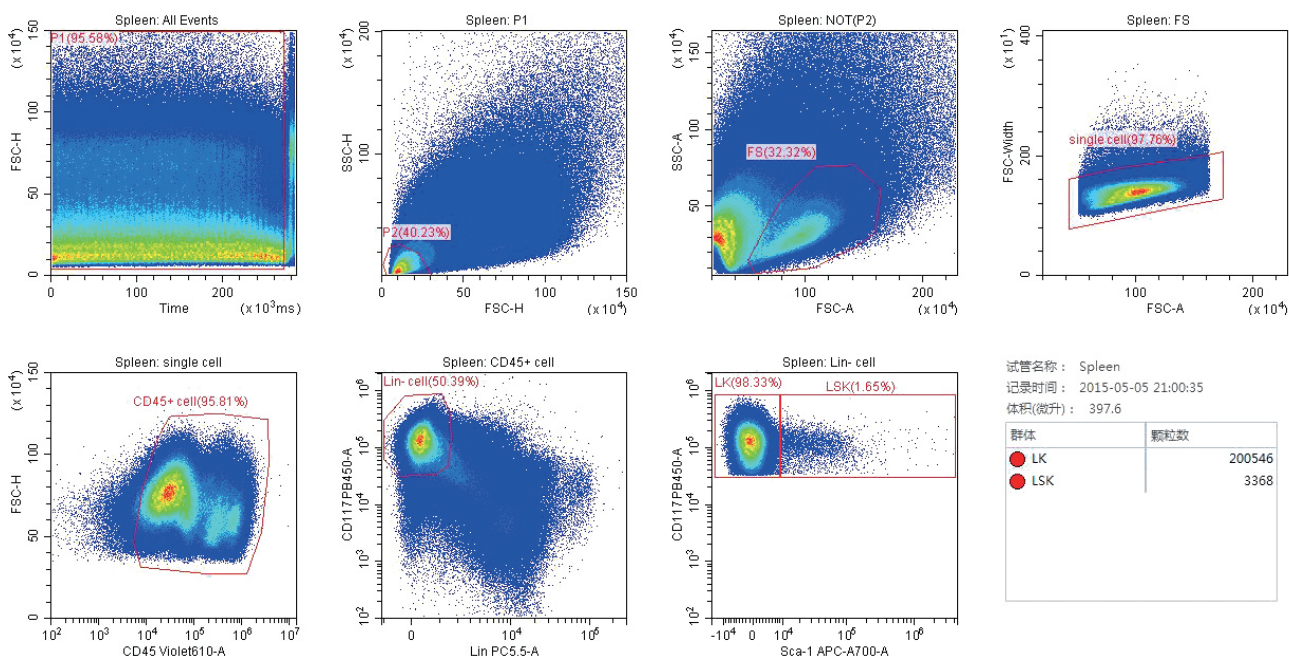
Instrument Configuration	VSSC (Yes/No)	Plate or Tube Format
B5-R3-V5	No	Tube

数据分析

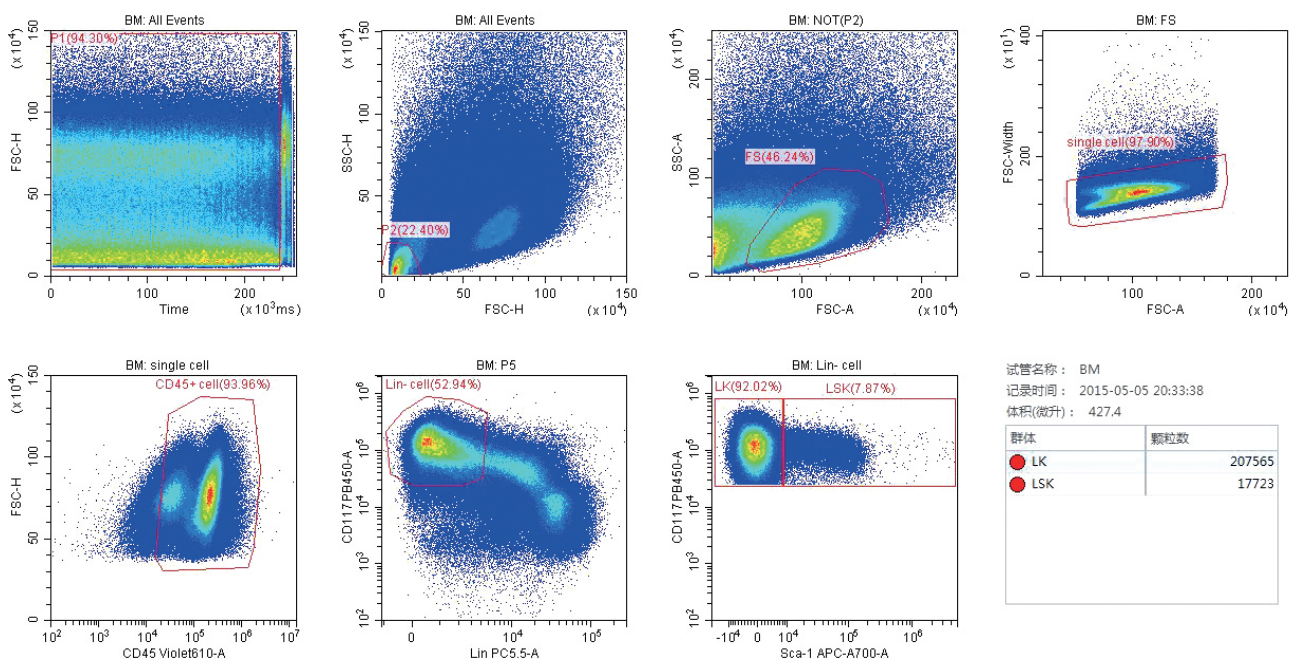
1. 建立 Time/FSC 双参数散点图，设门圈定稳定采集的数据；
2. 建立 FSC/SSC 双参数散点图，设门排除细小碎片数据的干扰，然后圈定白细胞群；
3. 建立 FSC-A/FSC-W 双参数散点图，设门排除粘附细胞；
4. 建立 CD45/FSC 双参数散点图，设门圈定 CD45^{+/hi} 群体；
5. 建立 Lineage /CD117 双参数散点图，设门圈定 Lin⁻CD117⁺ 群体；
6. 建立 Sca-1 /CD117 双参数散点图，Lin⁻CD117⁺Sca-1⁻ 群体为 LK 细胞，Lin⁻CD117⁺Sca-1⁺ 群体为 LSK 细胞。
7. 统计得出采集样本的每单位体积中 LK、LSK 细胞颗粒数，通过计算得知每只老鼠脾脏或骨髓（总体积）的 LK 及 LSK 细胞的总数。

实验结果

小鼠脾脏 LSK、LK 检测:



小鼠骨髓 LSK、LK 检测:



实验结果说明:

- 取一只小鼠的完整脾脏，分离获得的所有细胞用于磁珠分选、流式检测，样本总体积 450 ul，采集样本体积 397.6 ul，测得 LSK 细胞颗粒数 3,368，LK 细胞颗粒数 200,546。通过计算， $3,368/397.6 \times 450 \approx 3,811$ ， $200,546/397.6 \times 450 \approx 226,976$ ，即 LSK: 3811 cells/spleen，LK: 226976 cells/spleen；
- 取一只小鼠的一条后肢股骨和胫骨，分离获得的所有细胞用于磁珠分选、流式检测，样本总体积 450 ul，采集样本体积 427.4 ul，测得 LSK 细胞颗粒数 17,723，LK 细胞颗粒数 207,565，通过计算， $17,723/427.4 \times 450 \approx 18,660$ ， $207,565/427.4 \times 450 \approx 218,540$ ，即 LSK: 18,660 cells/(tibia+femur)，LK: 218,540 cells/(tibia+femur)。

➤ 病毒细菌藻类绝对计数

实验简介

噬藻体是水体中常见的浮游病毒，具有控制有害藻华、调节水生态结构、以纳米尺度驱动全球生物地球化学循环、特别是碳循环的一类不可忽视的战略生物资源；异弯藻是水体中的常见藻类，在适宜的温度下会大量生长，曾在大连湾、胶州湾等曾多次形成赤潮，对异弯藻计数是水质检测中常见的检测项目。异弯藻富含叶绿素，叶绿素在蓝光激发下有红色自发荧光；检测水体中大肠杆菌的含量，常作为水体污染指数的衡量标准。

本实验用核酸染料 SYBR green I 染色，借助 CytoFLEX 流式细胞仪对噬藻体、大肠杆菌、异弯藻进行区分，并绝对计数。与传统的显微镜计数及平板菌落计数法等相比，具有速度快，操作简便，结果准确的优点。

材料与方法

试剂

Laser	405 nm					488 nm					638 nm		
Fluor	KrO	PB	V610	V660	V780	FITC	PE	ECD	PC5	PC7	APC	APCA 700	APCA 750
Marker						SYBR green I			叶绿素			Sca-1	

样品制备

Sample Type	噬藻体；大肠杆菌；异弯藻
Species	病毒；细菌；藻类
Age of specimen	新鲜样本
Prep Method	1. 准备以下四管样本：噬藻体、大肠杆菌、异弯藻、三者混合（用 TE-buffer 稀释）； 2. SYBR green I（Invitrogen，母液为 10000×，DMSO 稀释，-20℃ 冰箱保存）。使用时需要将母液稀释 200 倍使用（超纯水稀释），SYBR Green I 80° 避光染色 10 min； 3. 上机检测。

仪器配置

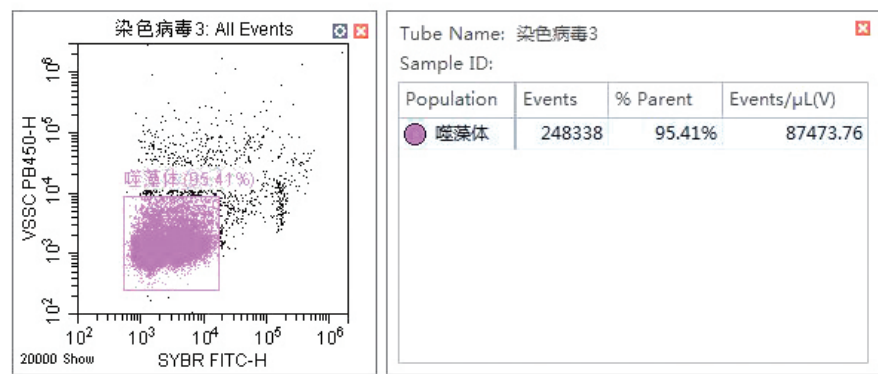
Instrument Configuration	VSSC (Yes/No)	Plate or Tube Format
B5-R3-V5	Yes	Tube

数据分析

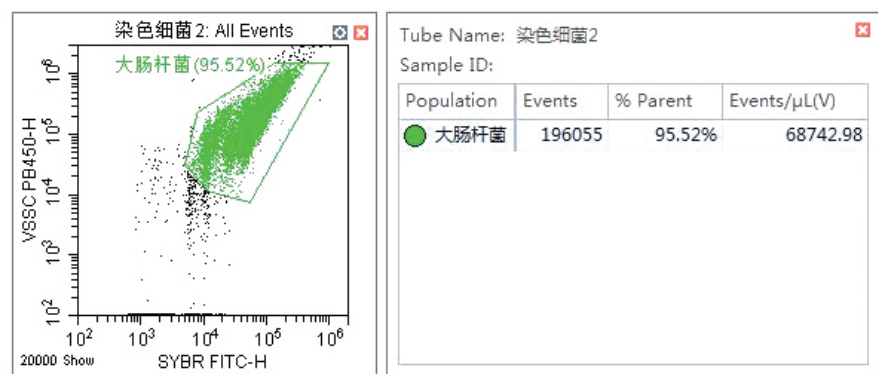
1. 建立 FSC/VSSC-Log 双参数散点图，SYBR /VSSC-Log 散点图用于区分病毒与细菌，PC5.5/VSSC-Log 散点图用于区分藻类；
2. 将阈值设定在 SYBR 通道，以 SYBR green I 染色的 TE-buffer 作为对照，界定阈值将杂信号去掉；
3. 分别检测以下样本：A：SYBR green I 染色噬藻体、B：SYBR green I 染色大肠杆菌、C：SYBR green I 染色的噬藻体、大肠杆菌、异弯藻三者混合样本。

实验结果

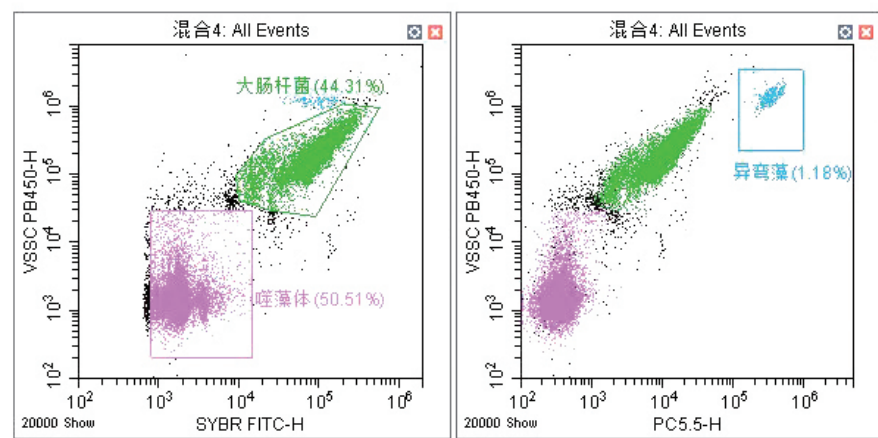
A: SYBR green I 染色噬藻体



B: SYBR green I 染色大肠杆菌



C: SYBR green I 染色的三者混合样本



CytoFLEX 是第一台借助 VSSC 可检测 100 nm 微颗粒的流式细胞仪，在本次实验中 CytoFLEX 流式细胞仪可通过荧光信号和 VSSC 对噬藻体病毒进行区分，并以其强大的灵敏性区分 DNA 含量不同的噬藻体与大肠杆菌。除此之外，CytoFLEX 有自动计数功能，与用户传统方式的计数方式做比较，结果一致。

自然水体中病毒细菌区分

实验简介

自然水体中病毒、细菌的含量通常可作为水质的评判指标。近年来，借助流式细胞仪对自然水样进行病毒、细菌的鉴别与计数已经成为很多科研工作者研究的热点。

本实验用核酸染料 SYBR green I 对自然水样进行染色，借助 CytoFLEX 流式细胞仪检测，区分水体中所含的病毒与细菌，与传统的显微镜计数及平板菌落计数法等相比，具有速度快，操作简便，结果准确的优点。

材料与方法

试剂

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

样品制备

Sample Type	自然水体
Species	
Age of specimen	新鲜样本
Prep Method	1. 配置 Tris-EDTA buffer（TE, pH =7.5）； 2. 以 SYBR green I 染色的 TE 溶液 为对照设定阈值； 3. 以 SYBR green I 染色的噬藻体界定病毒的大体位置，以 SYBR green I 染色的大肠杆菌界定细菌的大体位置； 4. 检测 SYBR green I 染色的湖水样本中病毒与细菌的含量。

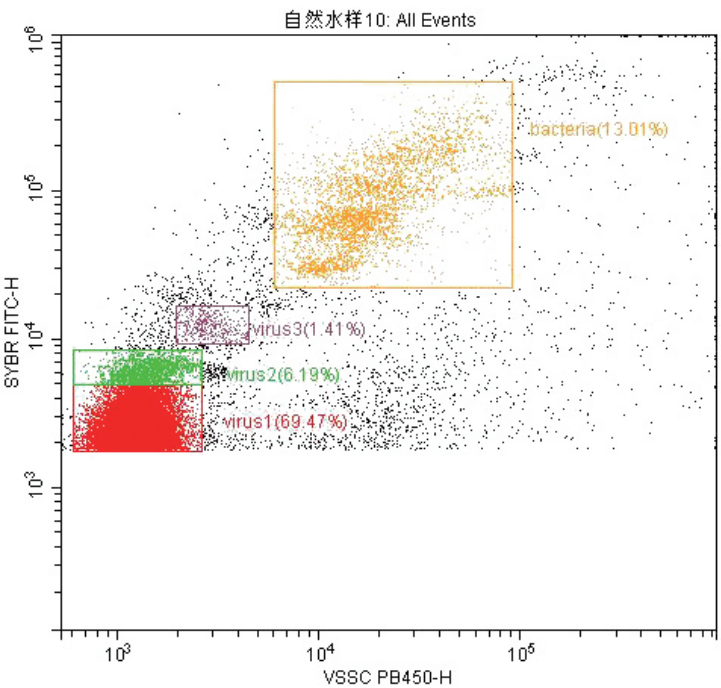
仪器配置

Instrument Configuration	VSSC (Yes/No)	Plate or Tube Format
B5-R3-V5	Yes	Tube

数据分析

- 1. 建立 FSC/VSSC-Log 双参数散点图，SYBR /VSSC-Log 散点图用于区分病毒与细菌；
- 2. 将阈值设定在 SYBR 通道，以 SYBR green I 染色的 TE-buffer 作为对照，界定阈值将杂信号去掉；
- 3. 以 SYBR green I 染色的噬藻体界定病毒的大体位置，以 SYBR green I 染色的大肠杆菌界定细菌的大体位置；
- 4. 检测自然水样中病毒和细菌的含量。

实验结果



Tube Name: 自然水样10

Sample ID:

Population	% Parent	Events/ μ L(V)
virus1	69.47%	3553.45
bacteria	13.01%	665.22
virus3	1.41%	72.29
virus2	6.19%	316.57

CytoFLEX 是第一台借助 VSSC 可检测 100nm 微颗粒的流式细胞仪，在本次实验中 CytoFLEX 流式细胞仪可通过荧光信号和 VSSC 对自然样本中的不同病毒和细菌进行区分，并对各种类型的病毒和细菌进行自动计数，操作简单，计数准确，减少了人力，降低了检测成本。

➤ 精子染色质结构分析（SCSA）

实验简介

精子染色质结构分析（SCSA）是检测精子 DNA 完整性的一种方法，其原理是正常精子 DNA 呈双链结构，而受损的精子染色质结构松散，DNA 在酸的作用下变性成单链。利用吖啶橙（AO）与双链 DNA 结合发绿色荧光，而与单链 DNA 结合发红色荧光的特性，AO 染色后的精子悬液利用流式细胞仪分析有可能作为不明原因流产和不孕的辅助诊断方法。

实验方法

1. 试剂：吖啶橙（AO）染液

2. 样本：精液

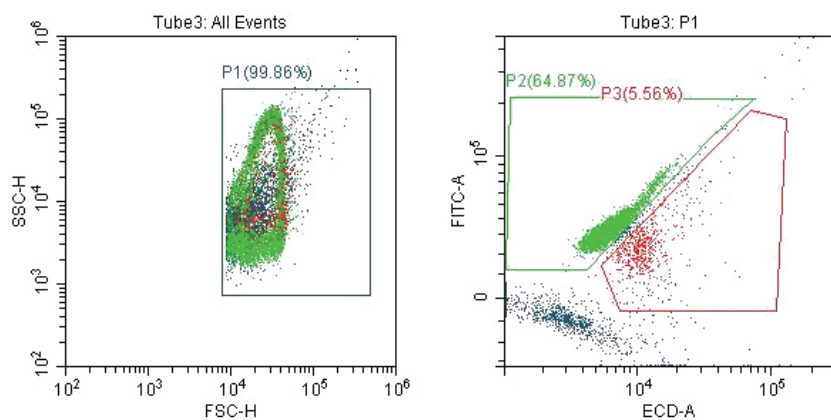
3. 实验步骤：

1. 采集精液，将精液样本用 TNE 缓冲液稀释至 2×10^6 个/ml 立即用于实验检测；或者用 4 倍体积的 TNE 缓冲液稀释后分装至于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存；
2. 取 $200\text{ }\mu\text{l}$ 精子稀释液至于试管中，加入 $400\text{ }\mu\text{l}$ 酸洗液处理 30 s，然后再加入 $1200\text{ }\mu\text{L}$ AO 染液染色 3 min；
3. 上机检测。

数据分析

在 FSC/SSC 图上圈出精子细胞，设门至 FL1(FITC)/FL3(ECD) 散点图上进行分析。DNA 完整性好的精子主要发绿色荧光 (P2 门)；DNA 完整性差的精子主要发红色荧光 (P3 门)。通过公式计算 DNA 断裂指数 αt 来评价精子 DNA 质量， $\alpha\text{t} = \text{red}/(\text{red} + \text{green})$ 。

实验结果



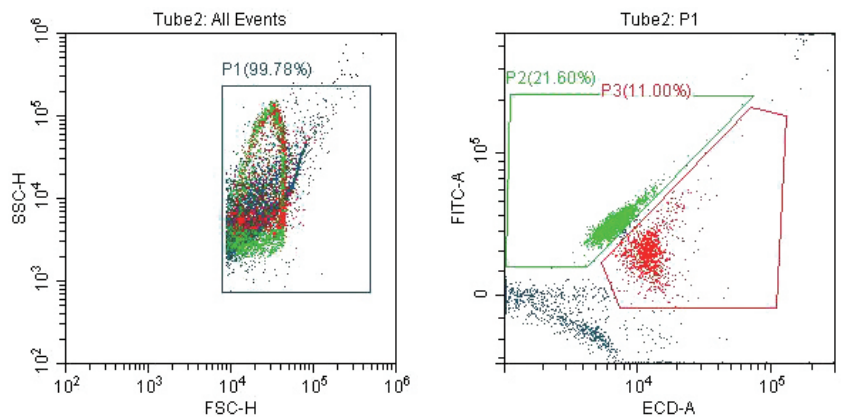
试管名称：Tube3

样本ID：

Alpha：0.08

群体	颗粒数	%总数	%父群
● All Events	10024	100.00%	100.00%
● P1	10010	99.86%	99.86%
● P2	6493	64.77%	64.87%
● P3	557	5.56%	5.56%

该精子样本主要发绿色荧光， αt 指数为 0.08 说明精子完整性较好。



试管名称： Tube2

样本ID：

Alpha： 0.34

群体	颗粒数	%总数	%父群
● All Events	10022	100.00%	100.00%
● P1	10000	99.78%	99.78%
● P2	2160	21.55%	21.60%
● P3	1100	10.98%	11.00%

该样本大部分精子发红色荧光，at指数为0.34说明精子完整性较差。

参考文献:

Apedaile AE, Garrett C, Liu DY,et. Flow cytometry and microscopic acridine orange test: relationship with standard semen analysis. Reprod Biomed Online. 2004 Apr;8(4):398-407.

附录:

TNE 缓冲液配置 -- 0.15 mol/l NaCl, 0.1 mol/l Tris, 1 mmol/l EDTA, pH 7.4

酸吸液配置 -- 0.1% Triton X-100, 0.15 mol/l NaCl, 0.08 N HCl, pH 1.2

AO 染色配置 -- 6 μg AO/ml, 37 mmol/l citric acid, 126 mmol/l Na₂HPO₄, 1 mmol/l EDTA, 0.15 mol/l NaCl, pH 7.4



www.beckmancoulter.cn
apls@beckman.com



官方微信



手机官网

贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司

全国产品咨询热线：400 821 8899

全国售后服务热线：400 885 5355 / 800 820 5355

上海	北京	广州	杭州	福州	成都	昆明
021-3865 1000	010-6521 3000	020-8518 7188	0571-8767 8208	0591-8850 5800	028-8621 0135	0871-6361 7528
南京	武汉	西安	济南	郑州	沈阳	哈尔滨
025-6667 6033	027-8823 2300	029-8833 7440	0531-8096 5011	0371-5563 7430	024-3195 8690	0451-5555 0637

© 2015 Beckman Coulter Commercial Enterprise (China) Co., Ltd

PRINTED IN CHINA