

流式细胞分选仪中通用标准操作步骤的设计

李金辉, 汤亚楠, 丁熙来

(西湖大学生物医学实验技术中心, 浙江省杭州市 310030)

摘要: 各类不同品牌的流式细胞分选仪给学习和使用带来了一定的困难和挑战。为了解决这些问题, 本文设计了适用于各类不同仪器的通用标准操作步骤。根据流式细胞分选仪的基本原理, 设计了仪器启动时所需要的流体系统, 光学系统, 及电子系统的操作步骤; 根据细胞分选的功能需求, 设计了数据获取和细胞分选的通用步骤。该通用操作步骤, 消除了不同仪器的步骤差异, 统一了数据获取的操作步骤, 极大简化了学习和使用的难度, 同时提高了仪器操作的一致性和数据质量的可靠性。

关键词: 流式细胞分选仪; 通用; 标准; 操作步骤

中图分类号: Q-337 实验设备及装置

文献标识码: A

流式细胞仪是在液流中利用荧光信号来检测单细胞多参数的仪器设备^[1], 按照功能通常分为流式细胞分析仪和分选仪^[2]。其中分析仪仅用于待测细胞样本中的荧光信号比例分析, 而分选仪可在分析数据基础上, 进一步分离纯化靶细胞, 用于下游单克隆筛选、单细胞建库测序等实验^[3]。

现代流式细胞分选仪通常含有四个子系统, 分别是液流、光学、电子学、及分选系统^[4,5,6]。液流系统在流动室内通过流式动力学聚焦把细胞样本以单颗粒的方式输送到激光检测点, 受激产生的荧光信号在 90 度方向通过光学系统中的滤光片输送到光电检测器, 光电转化之后在电子系统中进一步经模数转换及信号放大处理, 最终呈现在软件中的流式点图, 根据点图中圈门的靶细胞, 可进一步在分选系统中得到大量且纯度极高的靶细胞。自 70 年代流式细胞分选仪问世以来, 在结构和功能上经历了巨大的变化。检测信号由单激光多色、到多激光多色、再到光谱流式^[7,8,9]; 激发原理由空气激发到石英杯激发、再到芯片激发^(10,11); 液流由被动流体动力学聚焦到主动颗粒聚焦^[6,11]; 分选侧液流由 2 路到 4 路、再到 6 路、甚至虚拟多路分选。目前市面上的流式细胞分选仪品牌众多且各有特点, 同时搭载不同的软件系统, 使得流式细胞仪分选仪使用难度增加, 在不同品牌仪器之间切换更是困难。本文按照流式基本原理, 从功能需求上设计了通用的标准操作步骤, 降低了学习和使用流式细胞分选仪的难度, 且消除了不用品牌仪器之间的壁垒。

1 开机准备

1.1 鞘液及废液确认

鞘液通常是磷酸盐缓冲液、生理盐水等具有一定渗透压及盐离子强度、含有防腐剂且经过 0.01-0.02 μm 滤器过滤的溶液。在流式细胞仪中，压缩空气驱动鞘液从鞘液桶进入流动室，鞘液负载细胞样本在激光检测点实现信号的激发与检测，之后细胞样本进入废液桶。因此在开机准备阶段，首先确认鞘液桶是满的，废液桶是空的（添加 10%终体积的次氯酸钠原液）。

1.2 硬件电源连通

流式细胞仪的硬件主要是流式细胞仪主机，及外围设备空气压缩机、温度控制水浴、气溶胶控制系统，及搭载数据获取软件的电脑。硬件电源连通顺序依次是外为设备、流式细胞仪主机、及电脑。

1.3 软件登录

软件既是操作硬件运行的界面，也是协调各个硬件工作的集成控制器。在开机准备阶段，登录软件，保证软件和硬件建立通讯连接。

2 系统启动

2.1 液流启动

液流是负载细胞样本进入流动室检测信号的介质，因此正确的液流启动是流式细胞仪工作的基础。液流启动包含鞘液加压、鞘液管路密闭性检测、鞘液滤器排气泡、反冲清洗进样针等步骤。液流启动稳定后，从鞘液桶到流动室的鞘液服从伯努利流体动力学方程，流速越快的地方压力越小，整体上表现为流体动力学聚焦。样本管路中的细胞进入流动室后，将被聚集到液路中心，形成典型的鞘液包裹的细胞流。

2.2 激光校准

在流动室内，激光激发鞘液包裹的细胞产生荧光信号。为了保证最好的信噪比，要求激光与鞘液流正交。对石英杯激发类型的流式细胞仪，一般激光和鞘液的位置是相对固定的，无需每天校准。对空气或芯片激发类型的流式细胞仪，需通过荧光微球校准，已该激发信号的标准差系数最小为佳。通常对空间独立排布的多激光仪器来讲，需要兼顾各个检测通道的标准差系数，或者优先保证实验所需要的检测通道的标准差系数最小。

2.3 质量控制

在液流启动和激光校准后，理论上仪器可正常获取数据了。为了验证是否真实可行，通常使用带有固定荧光强度的荧光微球做质量控制。在生成的质量控制报告中，通常含有激光

功率、激光延迟校准、得到理论荧光强度的检测器电压或增益值及标准差系数。通过控制该标准差系数在一定范围内，保证仪器每天的检测状态是一致的。

2.4 液滴校准

对细胞分选来讲，液滴校准也是非常关键的。液滴校准包含频率和断点设置，液滴延迟校准，侧液流校准三部分。频率和断点的正确设置保证了含细胞的液滴的稳定性，液滴延迟校准保证了含有靶细胞的液滴在合适的位置加电荷，侧液流校准保证带电荷的液滴偏离正确的位移以到达分选管。

3 数据获取和细胞分选

3.1 实验创建

实验文件是保存实验数据的载体，因此首先创建实验文件。通常在该实验文件中设置文件名、检测通道及细胞标记等信息。一般保存实验文件存在两种格式，一种是跟软件没有关联、直接保存到指定保存地址；另外一种是与软件有关联、自动保存到软件设定的默认地址。前一种通常不会影响软件的运行速度，而后一种随着数据的增多会降低软件运行速度。

3.2 仪器设置

仪器设置是对当前实验的具体优化，一般包含阈值设置和电压或增益设置。阈值设置是指扣除背景噪音信号。通常在对数显示模式中，上样一管纯水或缓冲液，让噪音信号完全暴露出来，然后设置该噪音信号极大值为阈值，使得检测样本信号不受噪音信号的干扰。电压或增益设置是指样本的阳性和阴性信号都在合适位置。通常用多色细胞样本，调节电压或增益，使得阴性信号在左侧一个对数范围内，而阳性信号在右侧，且没有压线或在显示范围之外。

3.3 补偿设置

荧光染料在激光激发后的发射光谱通常覆盖一个或多个检测通道，其中信号最强的通道为该荧光染料的主要检测通道，其他皆为辅助检测通道。通常把辅助检测通道信号，称之为主要检测通道信号的溢出。消除这些辅助检测通道信号的过程，称之为补偿。在多色流式检测中，补偿有手动补偿和自动补偿两种方式。其基本原理都是利用了辅助检测通道信号占据主要检测通道信号的百分比保持不变，通过手动逐一消除或通过软件自动消除。手动补偿中，逐一上样单染细胞样本，然后在流式点图矩阵中消除所有辅助检测通道信号。自动补偿中，上样所有单染细胞样本，然后通过软件自动计算补偿矩阵。

3.4 数据获取和细胞分选

一般在流式实验中设置阴性实验样本，及阳性实验样本，以检测待测样本中靶细胞的比例。同型对照抗体染色，可直接排除该染色通道上的非特异性信号。另外在流式多色实验中，还可以设置“全染减一”对照样本，以排除其他荧光信号在该“减一”通道中的非特异性信号。在确认了特异性信号及靶细胞比例后，细胞样本上样可按照下列步骤：1) 选中当前文件, 2) 创建合适点图, 3) 上样细胞, 4) 调节细胞样本流速, 5) 画门圈定靶细胞, 6) 分选参数（靶细胞门、模式、数量、分选管位置）设置, 7) 分选细胞, 8) 结束上样, 及自动反冲, 9) 收集细胞。

3.5 管路清洗

流式细胞仪的样本管路会直接接触细胞样本及其携带的荧光染料，因此在使用完毕后要及时清洗，以免污染后续实验。样本管路清洗通常包含两步，一是高速上样 10%次氯酸钠溶液 5-15 分钟，二是高速上样纯水 5-15 分钟。

3.6 文件导出

实验完毕后可导出的文件有仪器设置文件、补偿设置文件、实验模板文件、流式细胞文件（flow cytometry standard, fcs）。其中前面三种文件可在下次实验中直接导入使用，而流式细胞文件可导入到第三方数据分析软件 FlowJo 等用于数据分析。

4 系统退出

4.1 液流关闭

鞘液分布在整个管路中，可能会在流动室及接口处因蒸发而产生盐结晶，因此在关机时要将管路中的鞘液排净，然后再充满 75%酒精，这样既防止了盐结晶引起的管路堵塞，又可以保证管路为无菌状态。液流关闭步骤中，首先把鞘液桶替换为 75%酒精桶，然后执行关机程序即可。

4.2 软件退出

安全退出实验及软件，以保证实验文件的完整性。

4.3 硬件电源断开

软件退出后，切断电源，以延长激光寿命。

本文设计的操作步骤是标准的，分为开机准备，系统启动，数据获取和细胞分选，及系统退出。从准备到收尾，从启动到关闭，从上样到清洗，每一个步骤都是标准操作步骤，实现了仪器操作的标准化。前一步骤是后一步骤的基础，后一步骤是前一步骤的延申，层层递进，环环相扣，首尾衔接，可循环执行，保证了操作步骤的标准化。本文设计的操作步骤是

通用的，消除了不同品牌仪器的操作步骤差异。利用流式细胞分选仪的系统构成，从液流、光学、电子及分选四个系统层面校准仪器，避开了不同品牌的表面差异，从根本上，保证了通用性，可以在不同仪器上运行。本文设计的通用标准操作步骤，为学习和使用流式细胞分选仪提供了方便，为学习和使用不同的流式细胞分选仪消除了障碍，为仪器操作的一致性和数据获取的可靠性提供了保证。

参考文献:

- [1]Robinson JP, Ostafe R, Iyengar SR, et al. Flow Cytometry: The Next Revolution. *Cells*. 2023 Jul; 12(14): 1875
- [2]Fulwyler MJ. Electronic separation of biological cells by volume. *Science* 150, 910–911 (1965).
- [3]Andreyev DS, Zybailov BZ. Integration of Flow Cytometry and Single Cell Sequencing. 2020 Feb;38(2):133-136.
- [4]Moldavan A. Photo-electric technique for the counting of microscopical cells. *Science* 80, 188–189 (1934).
- [5]Gucker FT Jr, O'Konski CT. Electronic methods of counting aerosol particles. *Chem. Rev.* 44, 373 (1949).
- [6]Crosland-Taylor PJ. A device for counting small particles suspended in fluid through a tube. *Nature* 171(4340), 37–38 (1953).
- [7]Hulett HR, Bonner WA, Barrett J, et al. Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science* 166(3906), 747–749 (1969).
- [8]Loken MR, Parks DR, Herzenberg LA. Two-color immunofluorescence using a fluorescence-activated cell sorter. *J. Histochem. Cytochem.* 25, 899–907 (1977).
- [9]Robinson JP, Rajwa B, Grégori G, Jones J, Patsekin V. Collection hardware for high speed multispectral single particle analysis. *Cytometry* 59A, 12 (2004).
- [10]Telford WG, Babin SA, Khorev SV, et al. Green fiber lasers: An alternative to traditional DPSS green lasers for flow cytometry. *Cytometry A*. 2009 Dec; 75(12): 1031–1039.
- [11]Zhang YX, Zhao Y, Cole T, et al. Microfluidic flow cytometry for blood-based biomarker analysis. *The Analyst*, 2022 Jun 27;147(13):2895-2917.