



Elabscience®

流式抗体培训



目录

- 1.流式细胞术的概念与目的**
- 2.流式细胞术与其他免疫学实验技术的异同**
- 3.流式样本的制备**
- 4.流式细胞仪检测原理与数据含义**
- 5.流式抗体的选择**
- 6.流式实验常见问题**

流式细胞术的目标

不同种类细胞

形态

不一样

不同种类细胞表达的

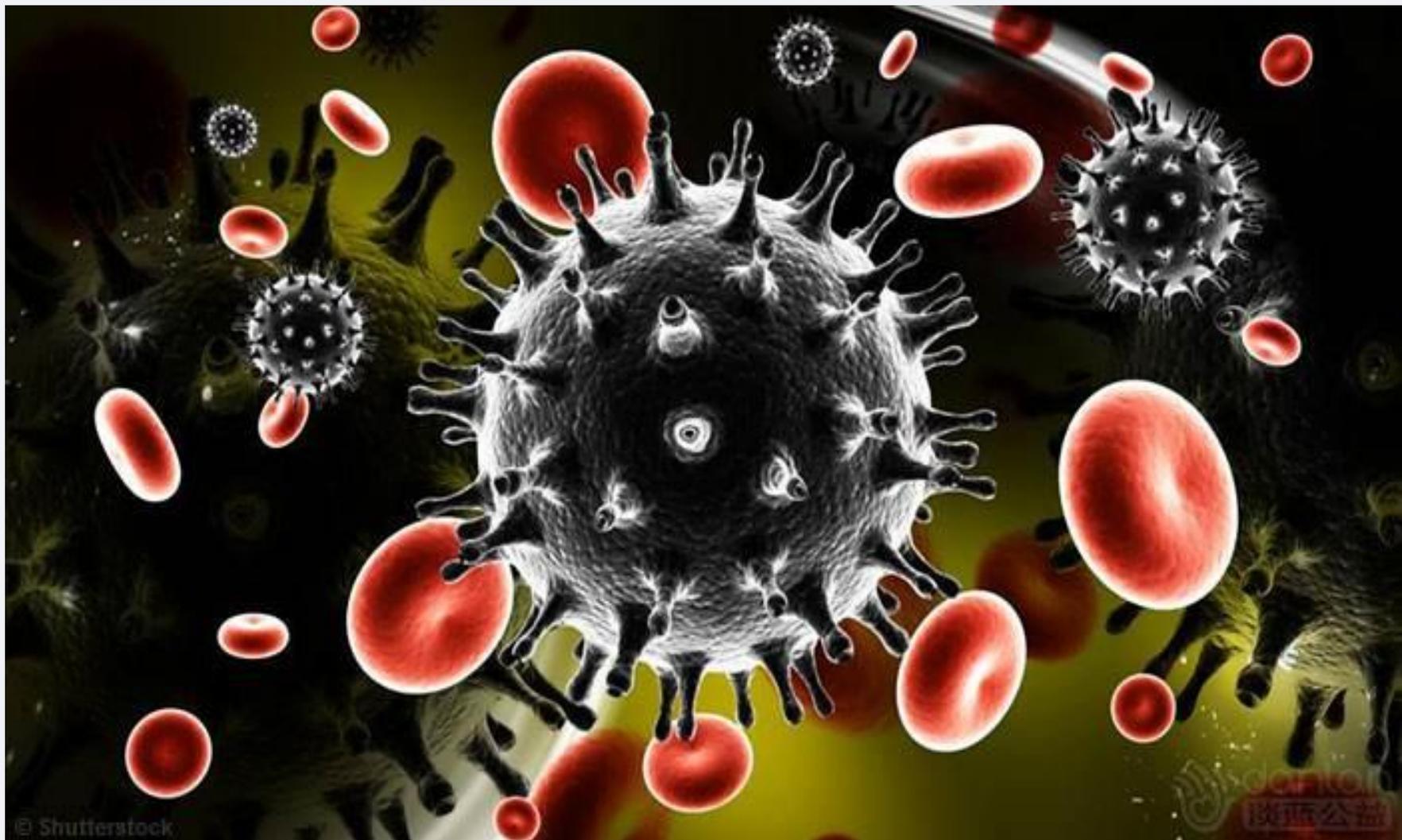
表面标志

不一样

不同种类细胞

内容物

不一样



流式细胞术的目标

流式细胞术

是根据不同**单个**细胞**形态、表面标志物、内容物**的差异，

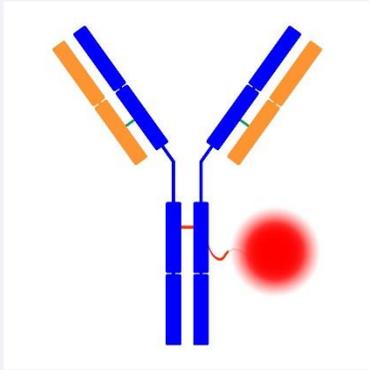
利用流式细胞仪检测细胞**固有**的或**特异性标记**的**信号**

从而实现**细胞分析**与**细胞分选**的目的的一种方法

荧光标记的方法及原理

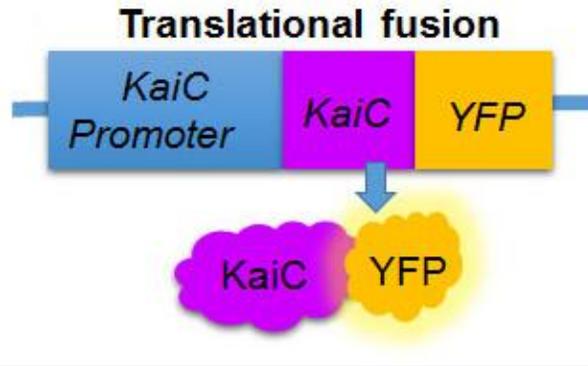
蛋白质

荧光团修饰的抗体



抗体可变区对抗原的高亲和力

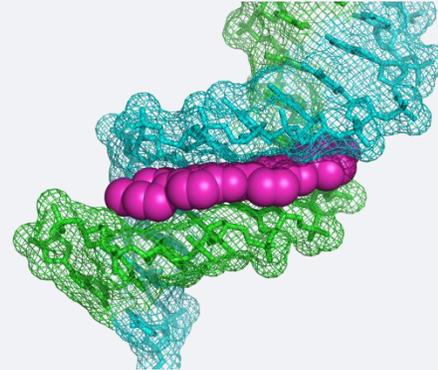
遗传表达荧光蛋白



融合表达或者同一启动子控制表达

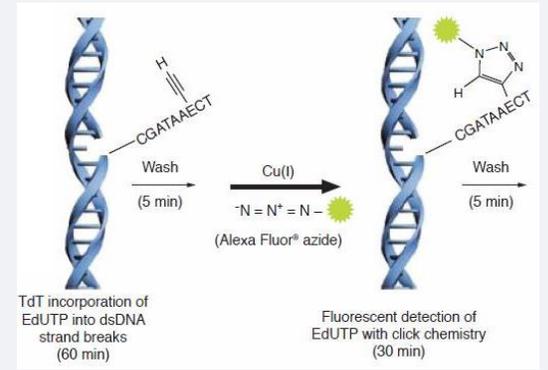
核酸

DAPI、PI、7-AAD等凋亡染料



多环染料与DNA小沟的亲和力

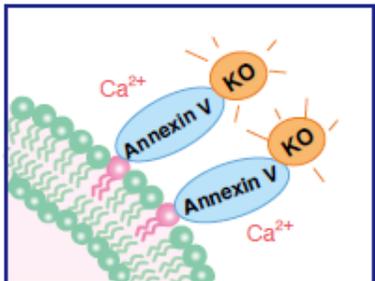
TUNEL中荧光团修饰的EdUTP



TdT针对DNA缺口的亲和力

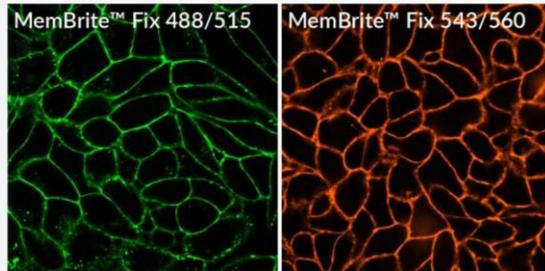
脂质

荧光素标记的Annexin V



Annexin V与磷脂酰丝氨酸之间的高亲和力

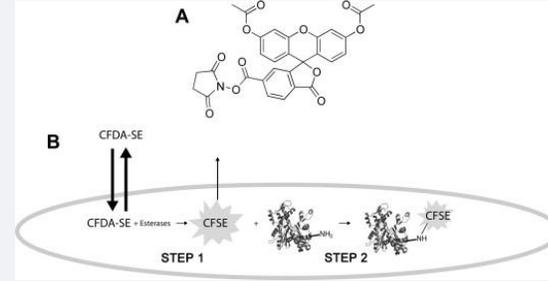
DiO, DiI, PKH等脂质染料



细胞的膜系统与脂质染料的高度疏水相互作用

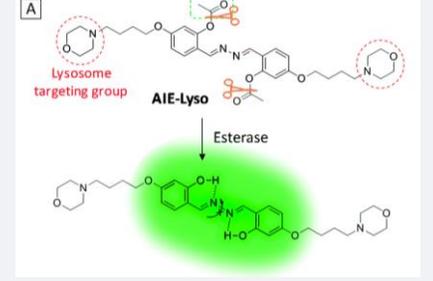
其它...

CFSE等一系列增殖细胞示踪染料



酯酶水解后与蛋白质结合而被困于胞内

LysoTrack溶酶体特异性染料

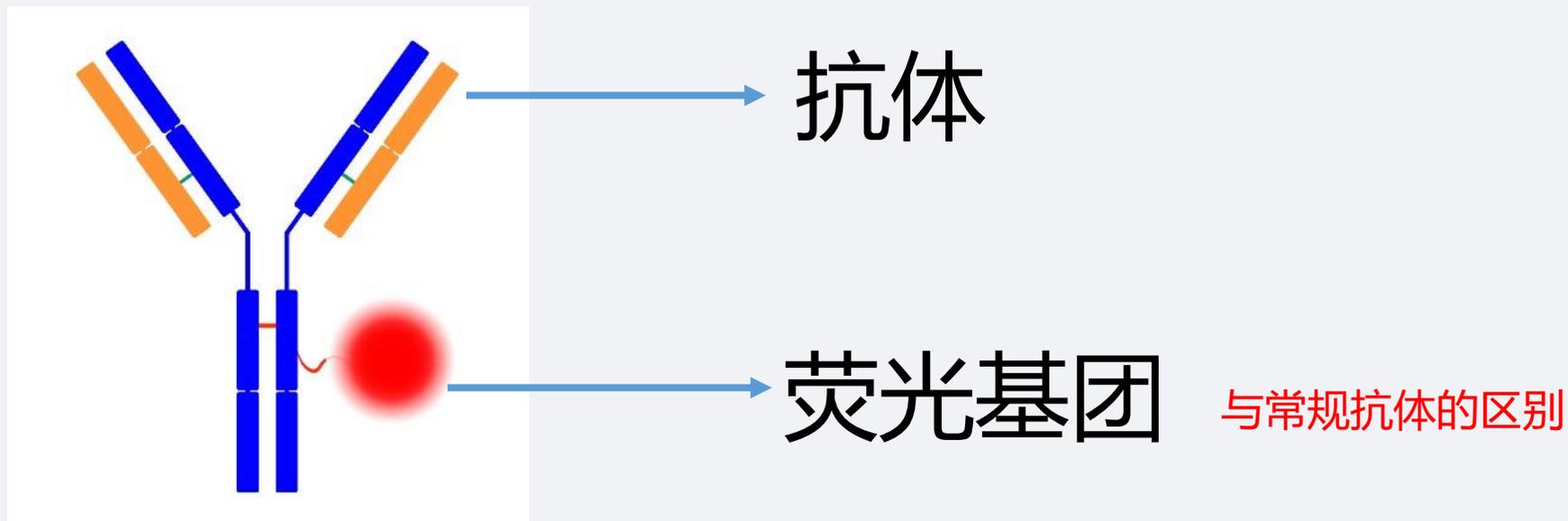


酯酶水解后发光吗啉基决定特异性

目录

- 1.流式细胞术的概念与目的
- 2.流式细胞术与其他免疫学实验技术的异同
- 3.流式样本的制备
- 4.流式细胞仪检测原理与数据含义
- 5.流式抗体的选择
- 6.流式实验常见问题

流式抗体



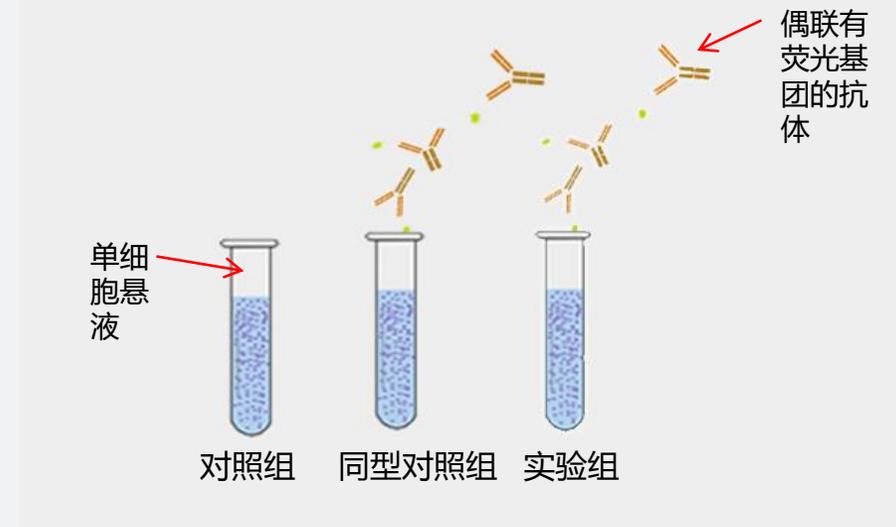
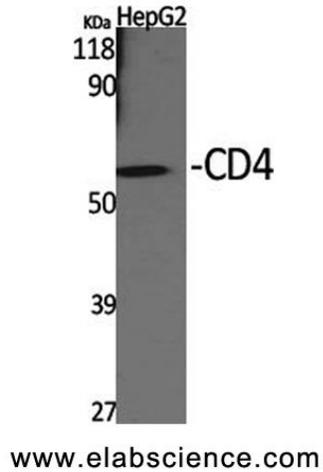
CD4 Monoclonal Antibody

Anti-Human CD4 Monoclonal Antibody (APC Conjugated)

Purified Anti-Human CD4 Monoclonal Antibody

LE/AF Purified Anti-Human CD4 Monoclonal Antibody

流式细胞术与WB、IHC实验的区别



细胞或组织匀浆

- 细胞或组织平均水平
- 无法反应组织内的异质性
- 定量方便

组织固定后切片

- 可反映单细胞水平信息
- 可反映细胞之间的空间位置信息
- 只反应单个切面信息
- 细胞固定后会有变化

单细胞悬液

- 活细胞水平
- 多参数 (已有28色报道)
- 高通量 (每秒数万细胞)
- 可半定量比较

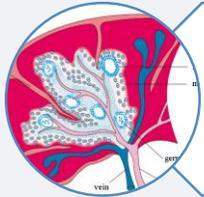
目录

- 1.流式细胞术的概念与目的**
- 2.流式细胞术与其他免疫学实验技术的异同**
- 3.流式样本的制备**
- 4.流式细胞仪检测原理与数据含义**
- 5.流式抗体的选择**
- 6.流式实验常见问题**

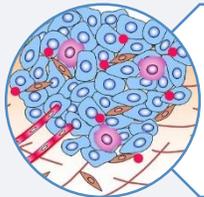
流式样品的制备：不同组织的处理



血液：自然状态下已经是单细胞，剔除红细胞即可



淋巴器官：(脾脏、淋巴、骨髓、胸腺) 含结缔组织较少，研磨即可 (脾脏和骨髓需要剔除红细胞)



非淋巴器官：(肿瘤组织、脑、肝脏等) 一般需要胶原酶处理得到单细胞悬液



培养的贴壁生物细胞：避免胰酶消化

筛网过滤，除去细胞团

缓冲液中加入DNA酶可减少细胞成团

尽量使用新鲜细胞，染色后固定，最好在4 h内检测

流式样品的制备：一般流程

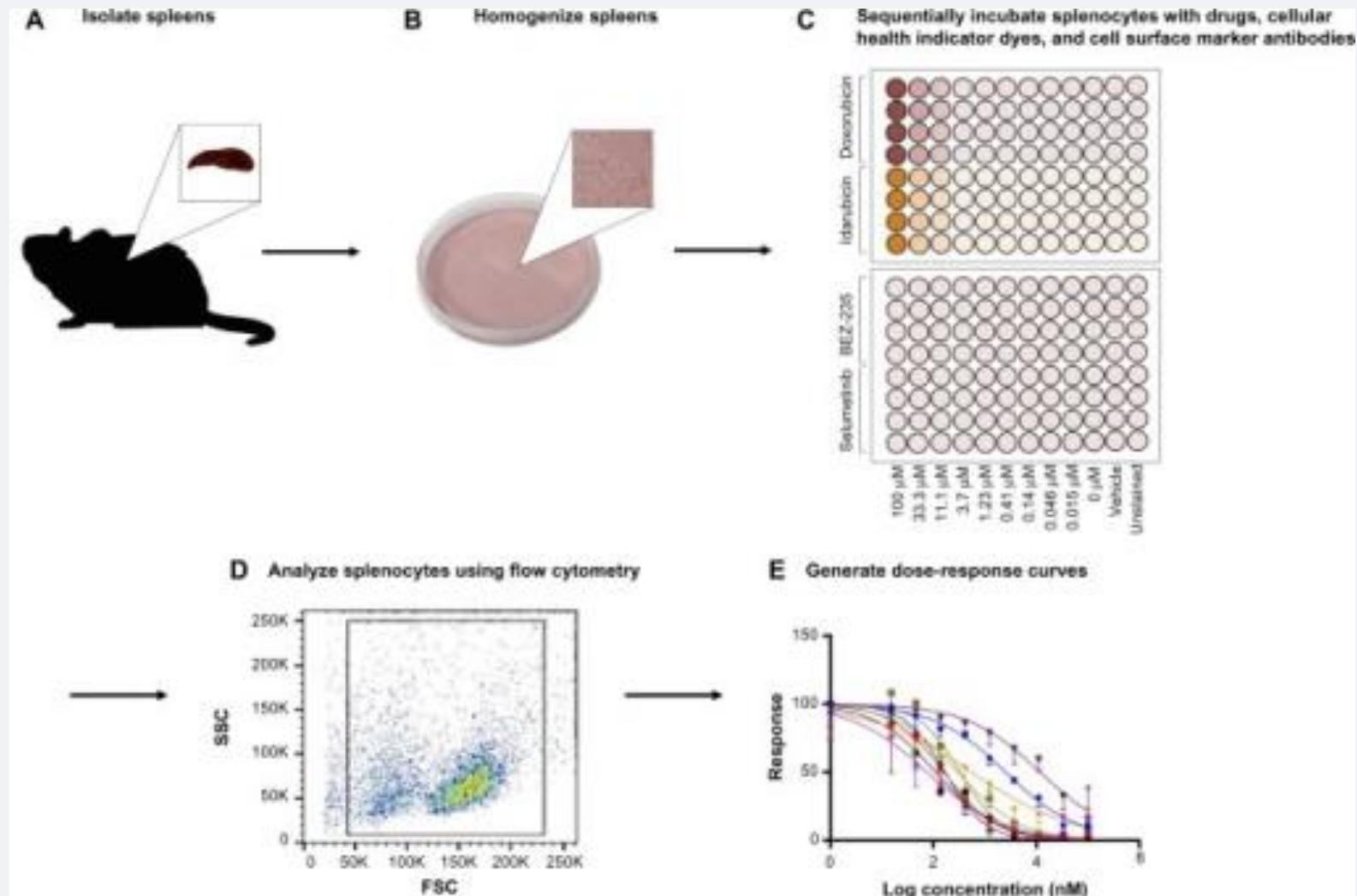
流式检测注意事项：

染色液中加入BSA，封闭容器和细胞表面

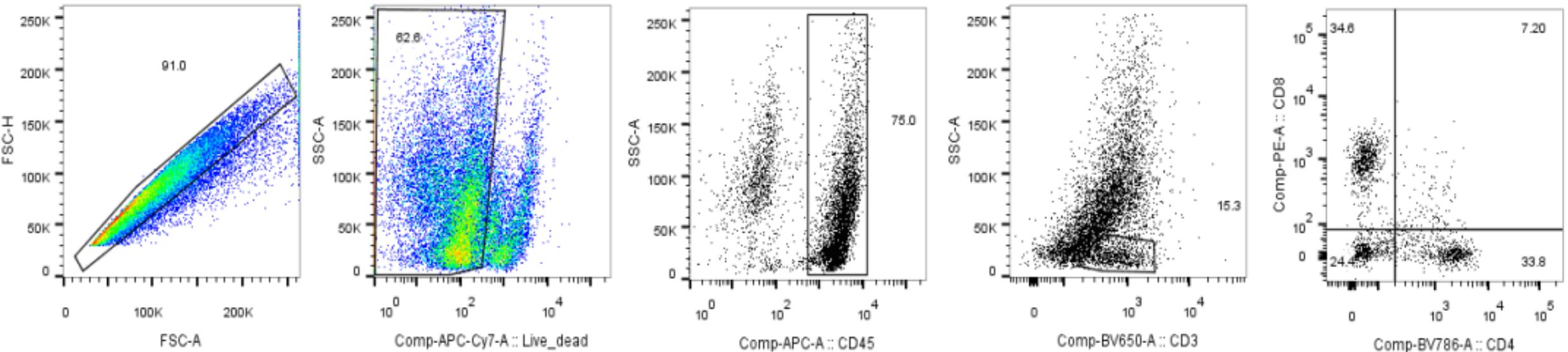
抗体的浓度比总量更重要

细胞量大的实验需要对抗体进行滴定

染色条件：室温 vs 4°C



流式样品的制备：肿瘤浸润免疫细胞的流式检测



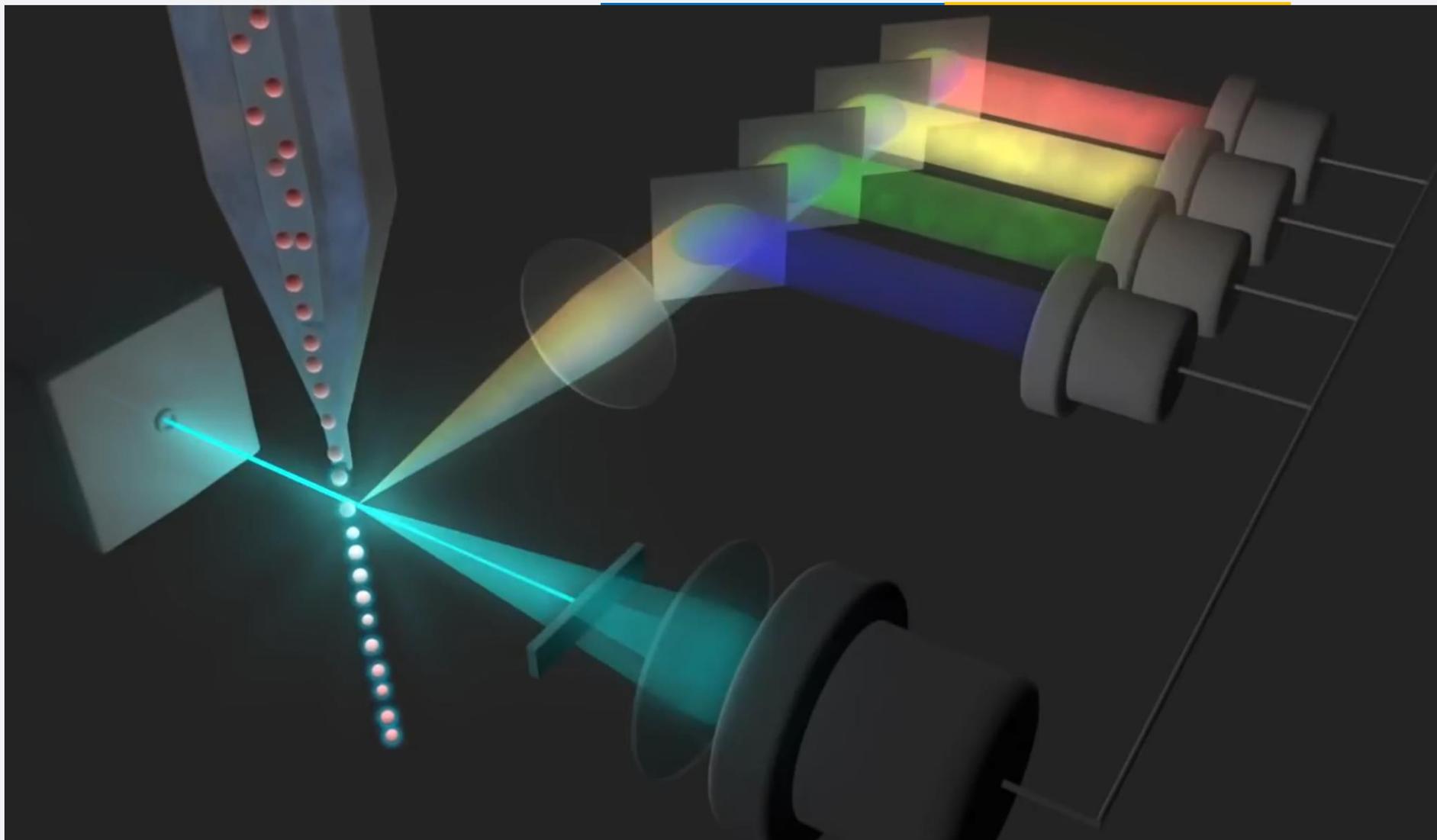
肿瘤组织分离 --> 剪成小块 --> **胶原酶+DNA酶** --> 洗涤+染色 --> 上机检测

- I型: 各种酶成份均衡, 推荐用于上皮组织, 肝, 肺, 脂肪和肾上腺组织样本, 可用于获取淋巴细胞
- II型: 较高的梭菌肽酶A含量, 通常用于分解心脏, 骨, 肌肉, 甲状腺和软骨瘤组织
- III型: 低蛋白水解酶活性, 普遍用于乳腺组织
- **IV型:** 多种蛋白酶成分, 能消化多种组织。低胰酶活性, 消化胰岛细胞以及对**细胞表面受体完整性有较高要求的实验样本。**

目录

- 1.流式细胞术的概念与目的**
- 2.流式细胞术与其他免疫学实验技术的异同**
- 3.流式样本的制备**
- 4.流式细胞仪检测原理与数据含义**
- 5.流式抗体的选择**
- 6.流式实验常见问题**

流式细胞仪的使用原理

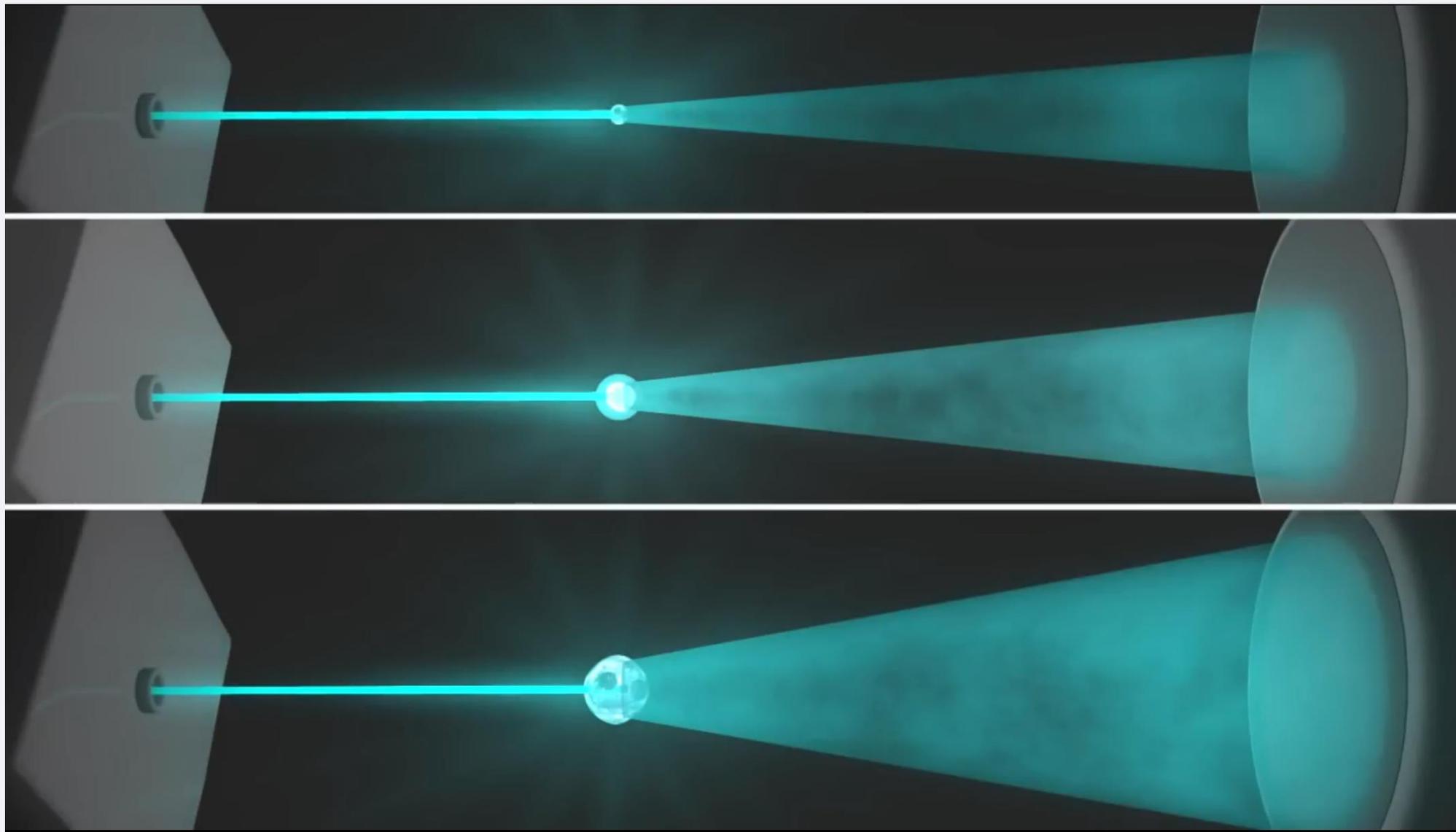


单列细胞

逐个经过检测点

探测记录信号强度

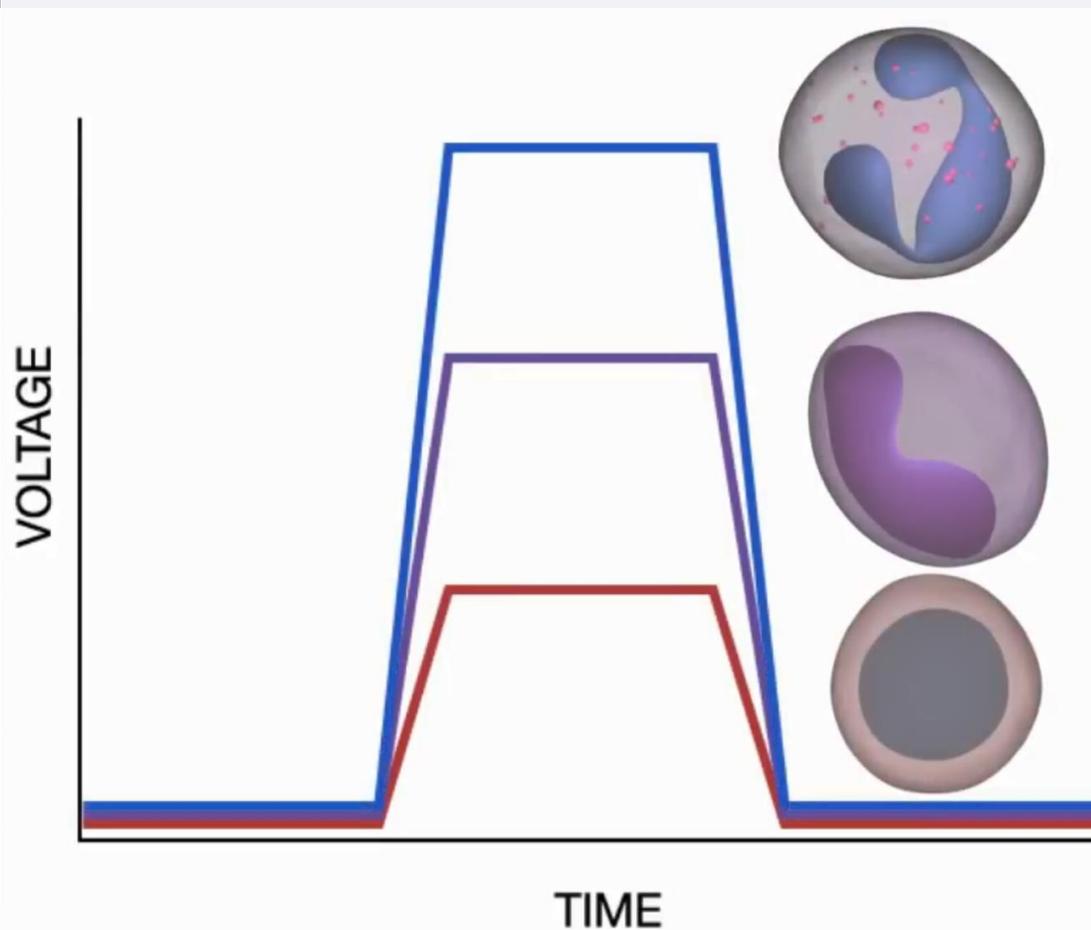
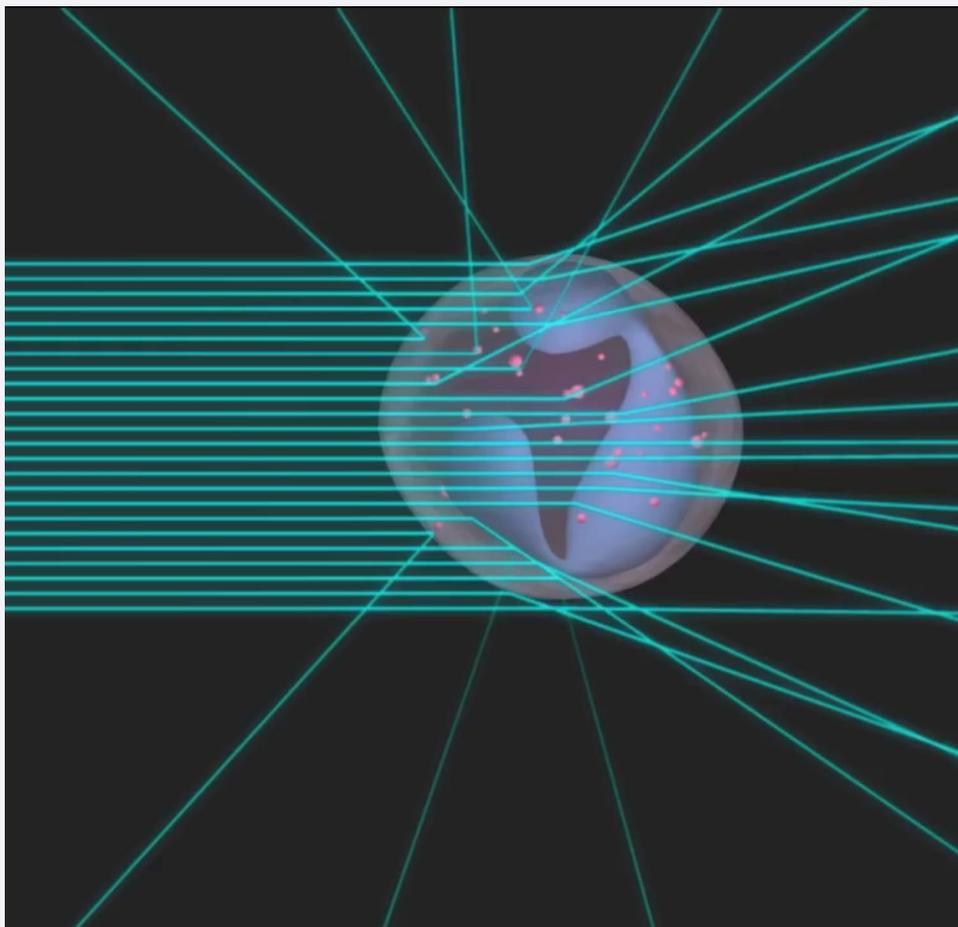
前向散射光检测的原理



前向散射光 (**FSC**)
是细胞通过激光检测区时正向收集的小角度散射光

表征细胞大小

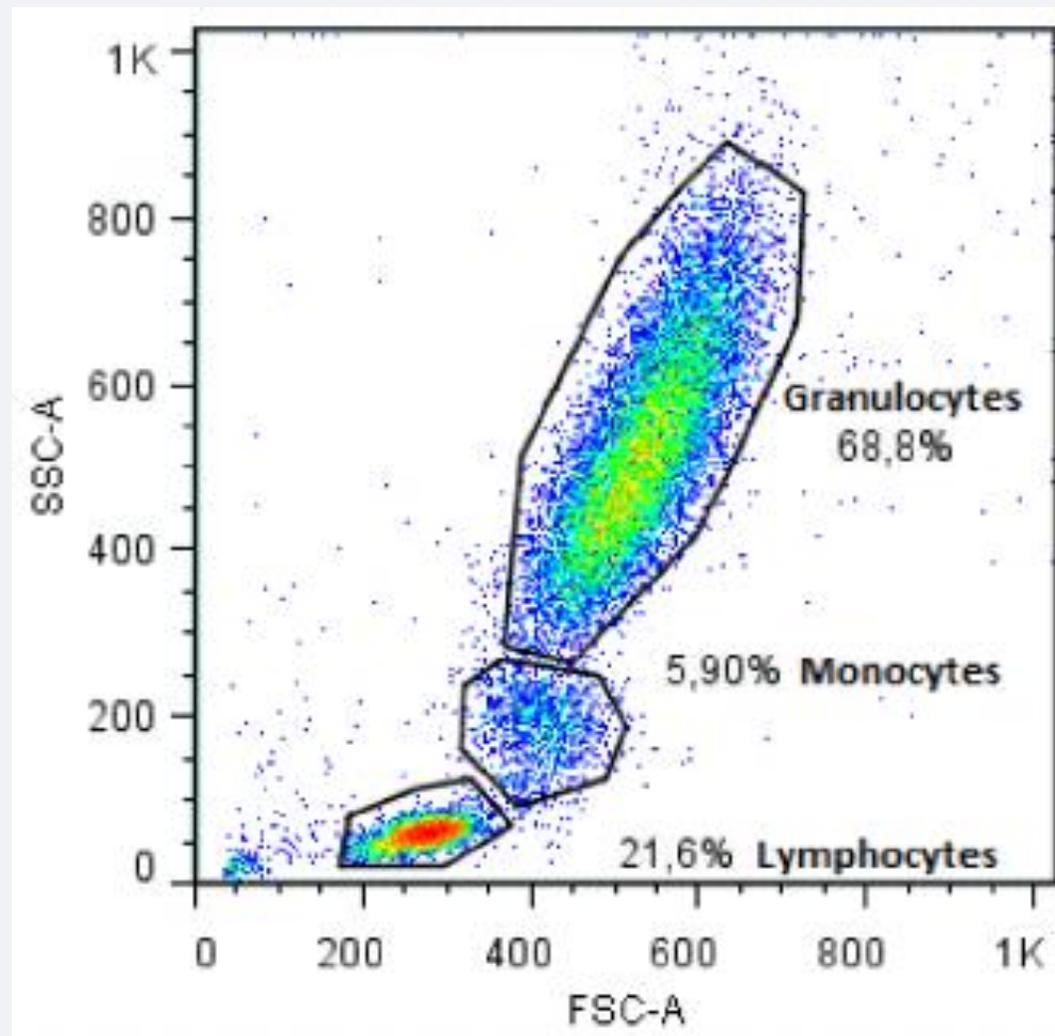
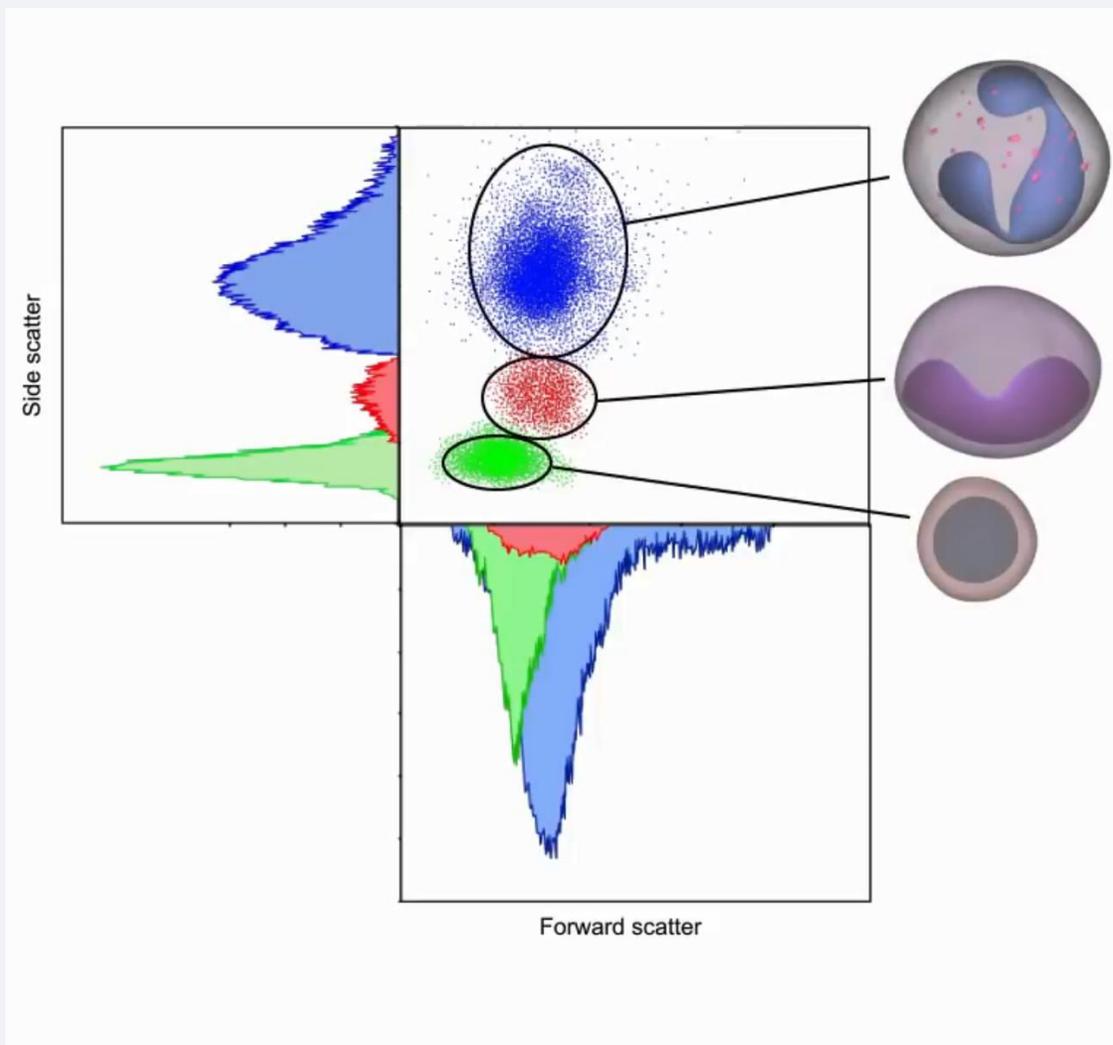
侧向散射光检测的原理



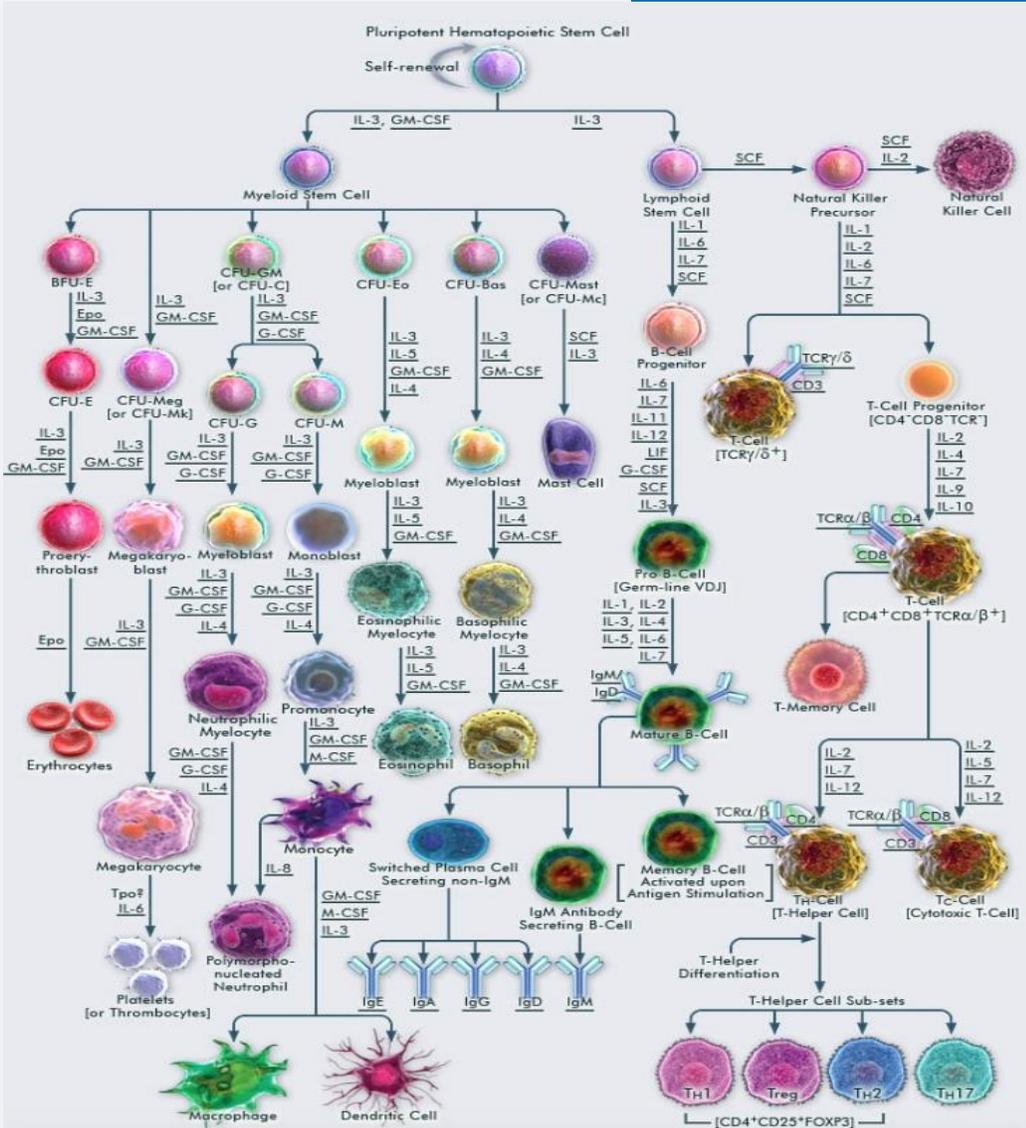
侧向散射光
(**SSC**) 是细胞
通过测量区时90
度方向的散射光

表征细胞内颗粒
的复杂度

流式细胞术的形态参数



细胞的特征参数——表面标志物



淋巴细胞

CD3、CD4、CD8、CD19

树突状细胞

CD11c、MHC II

单核细胞

CD11b、Ly6C、Gr-1

巨噬细胞

CD11b、F4/80、CD68

自然杀伤细胞

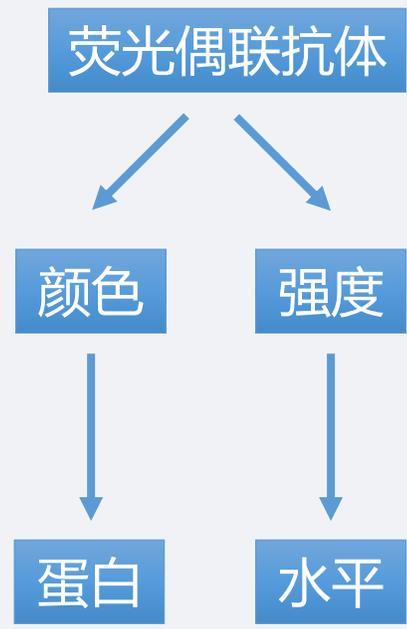
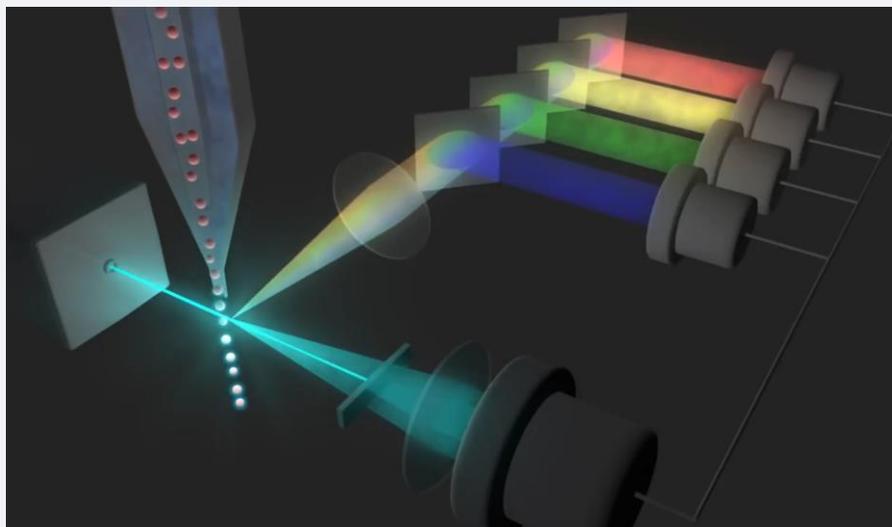
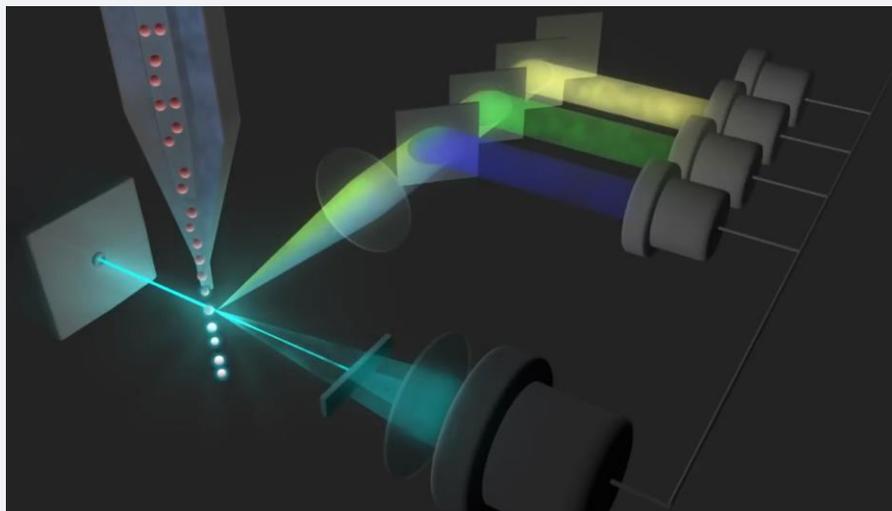
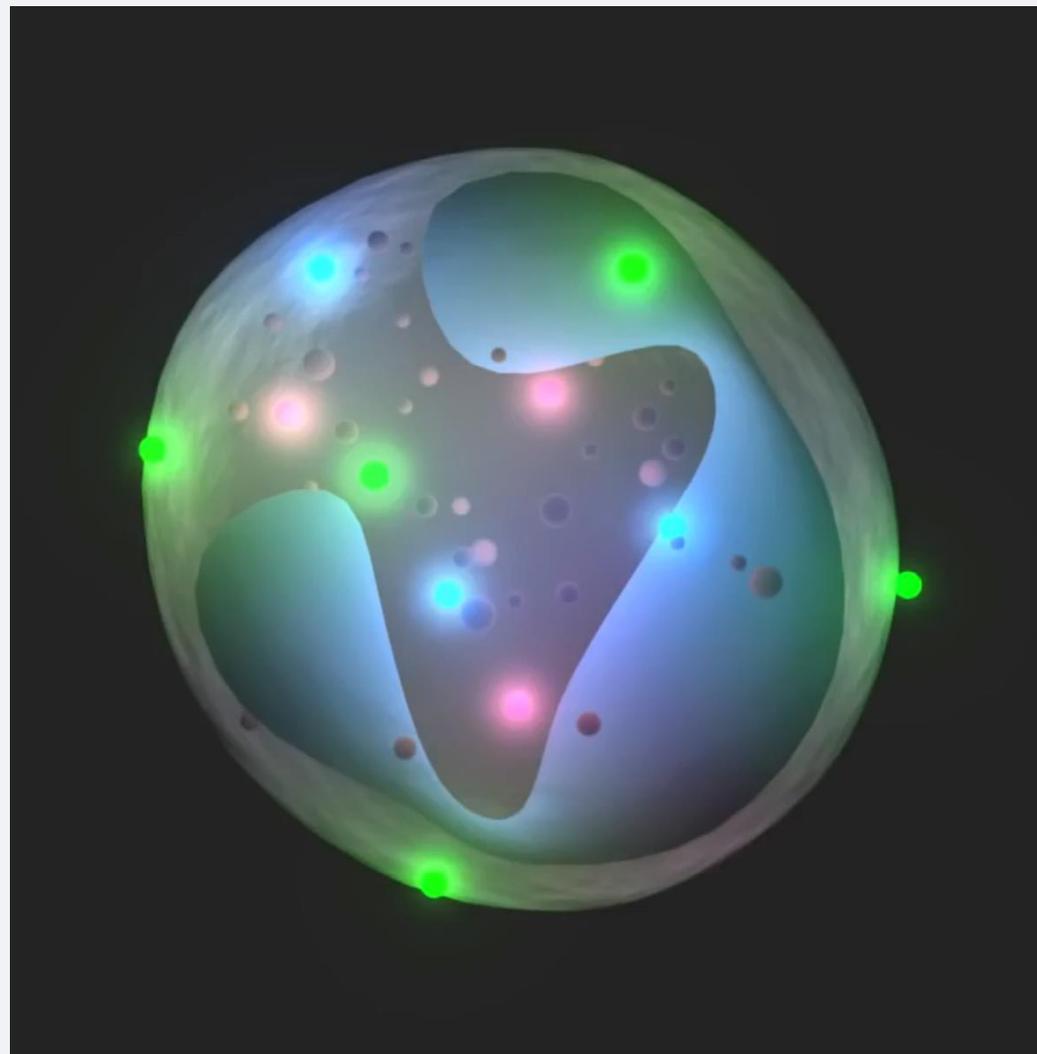
CD3、CD49b、NK1.1

中性粒细胞

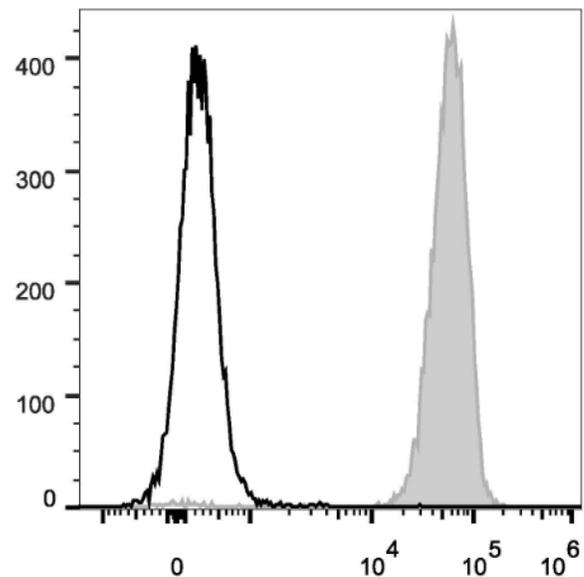
CD11b、Ly6G

... ..

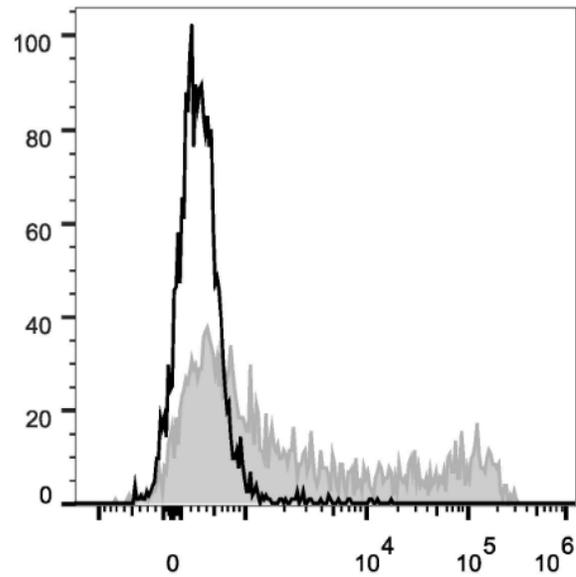
流式荧光抗体检测的原理



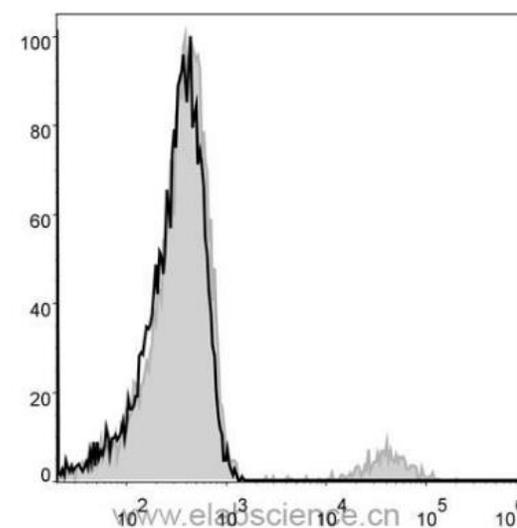
荧光数据的分析



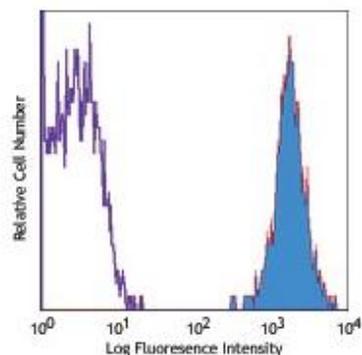
C57BL/6 murine splenocytes are stained with Anti-Mouse CD45 Monoclonal Antibody(PE Conjugated)(filled gray histogram). Unstained splenocytes (empty black histogram) are used as control.



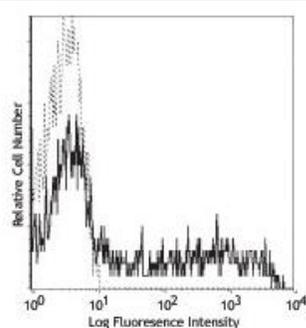
Human peripheral blood lymphocytes are stained with Anti-Human CD45RO Monoclonal Antibody(PE Conjugated)(filled gray histogram). Unstained lymphocytes (empty black histogram) are used as control.



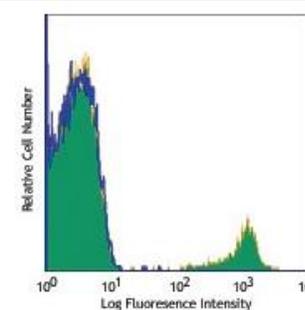
Human peripheral blood cells are stained with Anti-Human CD19 Monoclonal Antibody(PE Conjugated) (filled gray curve). Unstained peripheral blood cells (blank black curve) are used as control.



C57BL/6 mouse splenocytes stained with 30-F11 PE

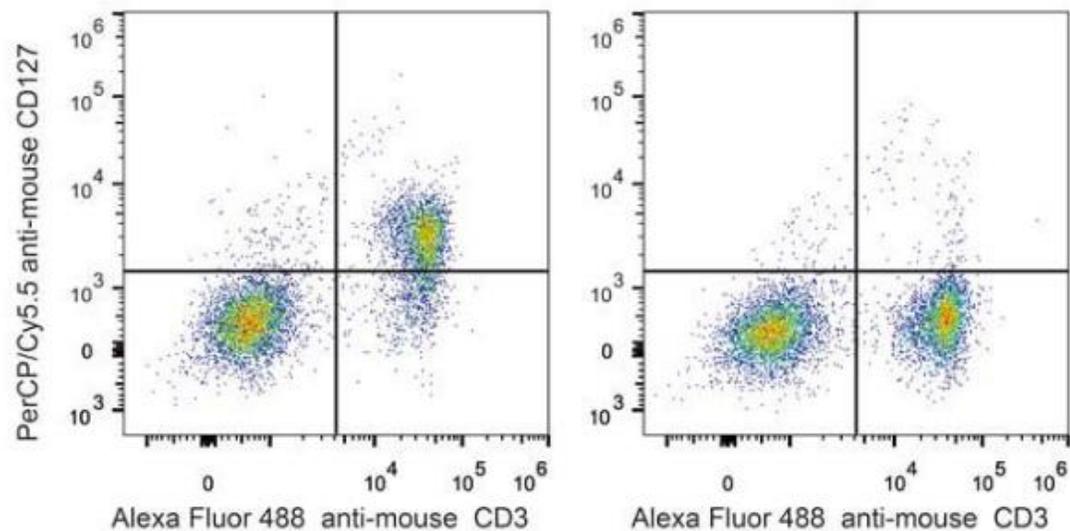


Human peripheral blood lymphocytes stained with UCHL1 PE



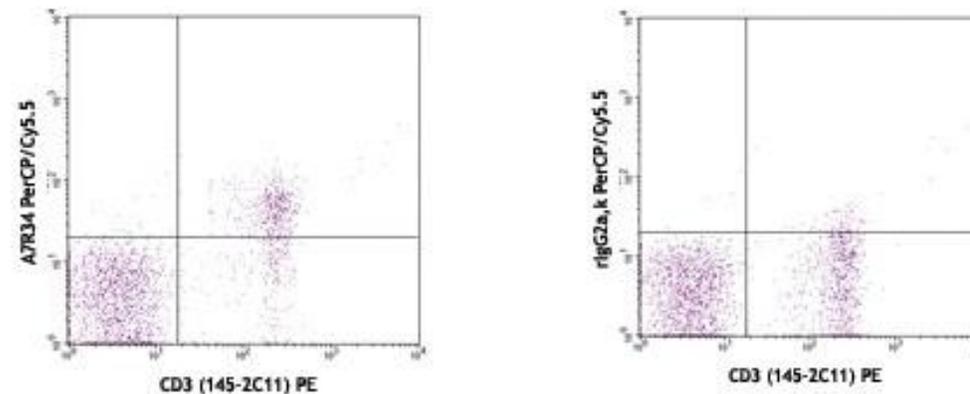
Human peripheral blood lymphocytes stained with HIB19 PE

荧光数据的分析

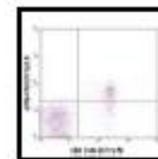


www.elabscience.cn

C57BL/6 murine splenocytes are stained with Anti-Mouse CD127 Monoclonal Antibody(PerCP-Cy5.5 Conjugated) and Anti-Mouse CD3 Monoclonal Antibody(Alexa Fluor 488 Conjugated)(left). Splenocytes stained with Anti-Mouse CD3 Monoclonal Antibody(Alexa Fluor 488 Conjugated)(right) are used as control.



C57BL/6 mouse splenocytes stained with CD3 (17A2) PE and A7R34 PerCP/Cy5.5 (top) or rIgG2a,k PerCP/Cy5.5 isotype control (bottom).



散点图

- 坐标轴：表示荧光强度分布
- 点：代表一个细胞

对照实验的设置

举例：比较加药处理前后，小鼠免疫细胞中某一种细胞数量的变化。实验组为加药小鼠的免疫细胞，所有需要标记的抗体全部加入。

• 生物学对照

生物学对照为安慰剂处理的小鼠免疫细胞，所有需要标记的抗体全部加入。

• 空白对照

普通小鼠免疫细胞，不加任何荧光修饰抗体

• 同型对照

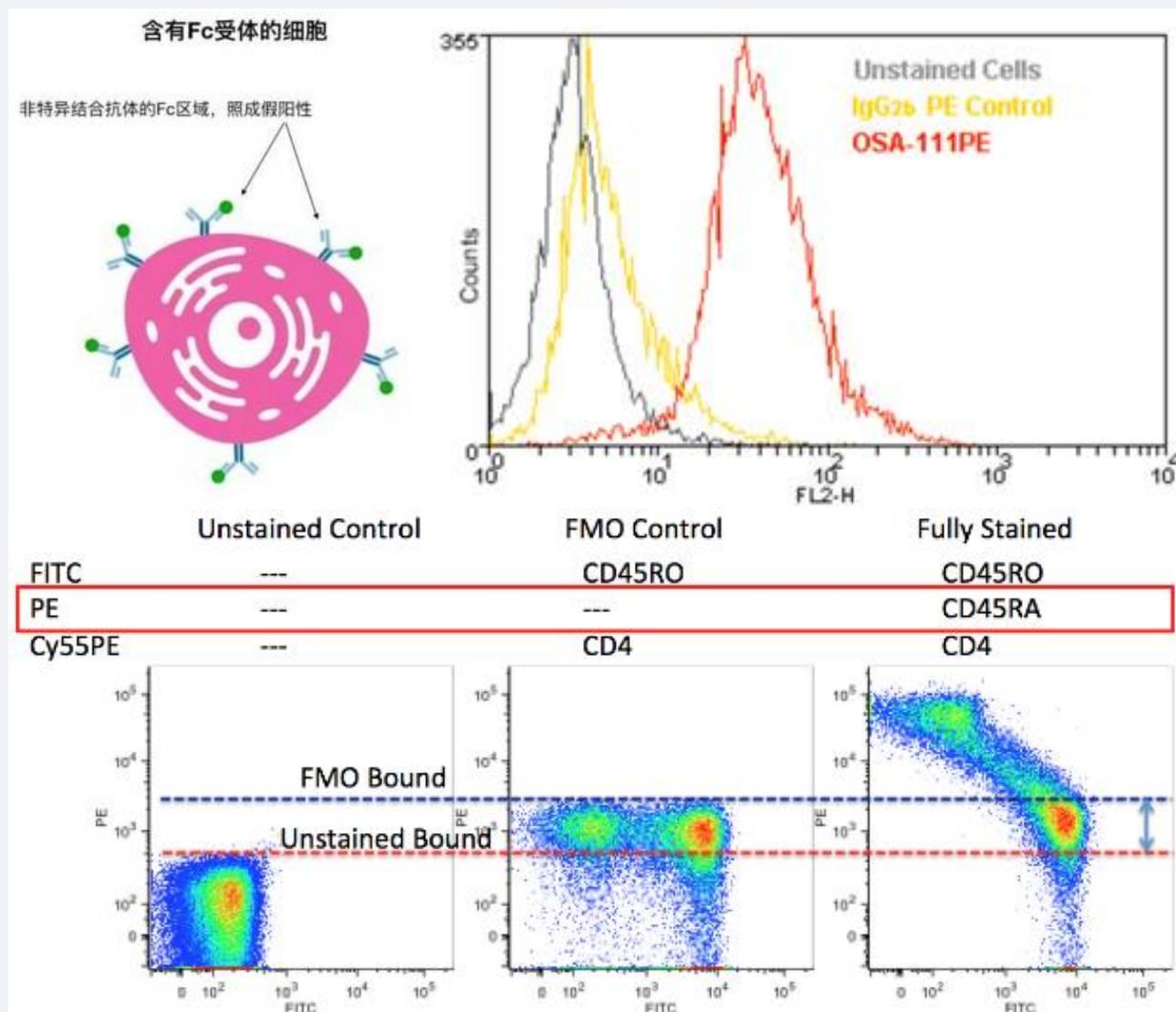
普通小鼠免疫细胞，每种颜色通道设置一个，对应同型对照抗体单标

• 补偿对照

普通小鼠免疫细胞，每种颜色通道设置一个，对应荧光修饰抗体单标

• FMO (荧光减一) 对照

普通小鼠免疫细胞，每种颜色通道设置一个，除对应荧光修饰抗体单标外，其余通道对应的荧光修饰抗体全部加入



目录

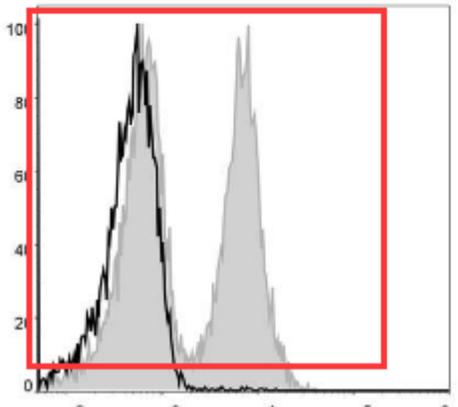
- 1.流式细胞术的概念与目的**
- 2.流式细胞术与其他免疫学实验技术的异同**
- 3.流式样本的制备**
- 4.流式细胞仪检测原理与数据含义**
- 5.流式抗体的选择**
- 6.流式实验常见问题**

流式抗体选择

流式抗体选择的基本条件:

- 种属: 按照待测样本种属选择抗体反应性, 流式抗体基本无种属间交叉反应;
- 靶蛋白特异性: 确定目的细胞的特异性标记, 即清楚要检测什么蛋白;
- 应用领域: 明确标注可用于流式实验;
- 仪器配置: 根据仪器配置的激光器和通道选择相应的荧光标记。

Anti-Mouse CD19 Monoclonal Antibody (FITC Conjugated)



产品货号: E-AB-F0986C
别称: B-lymphocyte antigen CD19, Cd19, Differ

规格: 50 Tests 数量:

货期: 现货+顺丰时间

流式抗体选择

多色荧光搭配的原则：

避免检测通道荧光冲突：每个检测通道只能选择1种荧光素，各通道之间的荧光素可以随意搭配（举例：FL1选择了FITC标记的抗体，就不能再选择Alexa Fluor488标记的抗体；而同组实验的其余指标可选择PE或者APC标记）。

检测器组 (激光器)	PMT位置	带通/长通透镜	适用染料
488nm蓝色激光	FL1	530/30	FITC
	FL2	585/42	PE, PI
	FL3	670 LP	PerCP, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7
635nm红色激光	FL4	661/16	APC

流式抗体选择

荧光标记的选择建议：

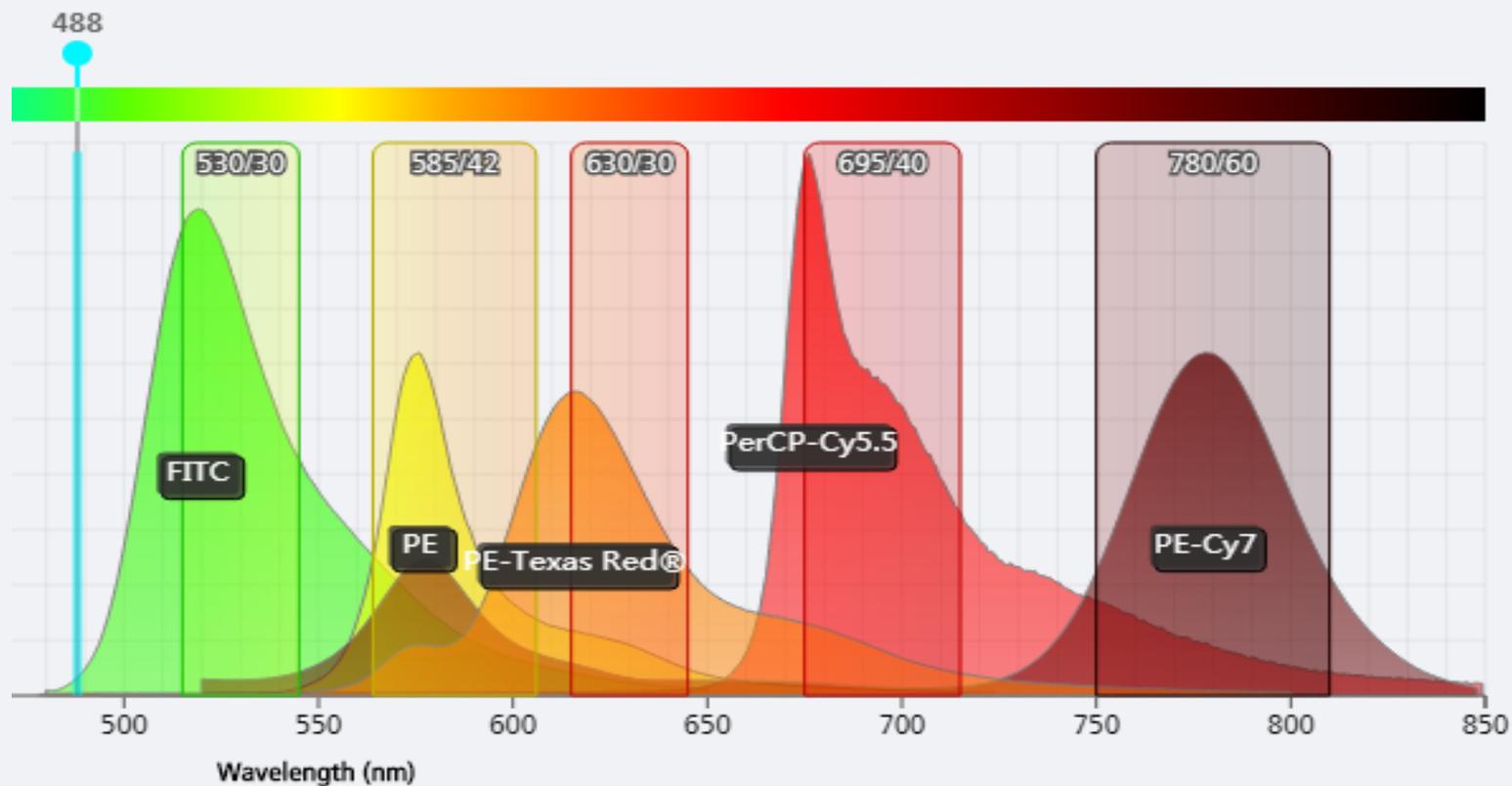
荧光强弱：荧光本身有强弱之分，可视抗原表达强弱及分群情况选择合适的荧光标记。

	Reagent	Clone	Filter	Stain Index
	PE	RPA-T4	575/26	305
	APC	RPA-T4	660/20	263
	PE-Cy5	RPA-T4	695/40	198
	Alexa Fluor® 647	RPA-T4	660/20	184
	PE-Cy7	RPA-T4	780/60	122
	PerCP-Cy5.5	RPA-T4	695/40	99
	Alexa Fluor® 488	RPA-T4	530/30	68
	Alexa Fluor® 700	RPA-T4	720/40	64
	Pacific Blue™	RPA-T4	450/50	63
	FITC	RPA-T4	530/30	43
	AmCyan	RPA-T4	525/50	37
	APC-Cy7	RPA-T4	780/60	36
	PerCP	RPA-T4	695/40	30

流式抗体选择

尽量选择光谱重叠小的荧光素，如FITC/PE-Cy7；

选择不同激光激发的荧光素，如FITC/APC， PE/APC；



流式抗体选择

抗体使用剂量：

1. 以test为计量单位的抗体，即每100 μ l样本有 10^6 个细胞加入1 test对应体积抗体即可；
2. 以 μ g为计量单位的抗体，根据说明书推荐计算出每次加入多少 μ g的抗体。

Recommended Use

Each lot of this antibody is quality control tested by immunofluorescent staining with flow cytometric analysis. The amount of the reagent is suggested to be used 2 μ L or 5 μ L of antibody per test (million cells in 100 μ l staining volume or per 100 μ l of whole blood). Please check your vial before the experiment. Since applications vary, the appropriate dilutions must be determined for individual use.

PE anti-mouse CD4 Antibody

Pricing & Availability

Product Details

Antigen Details

Application

Recommended Usage

FC - Quality tested

Each lot of this antibody is quality control tested by immunofluorescent staining with flow cytometric analysis. For flow cytometric staining, the suggested use of this reagent is $\leq 0.25 \mu$ g per million cells in 100 μ l volume. It is recommended that the reagent be titrated for optimal performance for each application.



Login/Register

My Cart

流式抗体选择

同型对照抗体的选择:

- 与染色的单克隆抗体:

- ①相同种属来源 ②相同免疫球蛋白及亚型

- ③相同荧光素标记 ④相同剂量和浓度

- ⑤但由未免疫动物血清纯化而来

- 以此消除由于抗体非特异性结合到细胞表面Fc受体而产生的背景染色

Anti-Mouse CD25 Monoclonal Antibody (FITC Conjugated)

Source : Rat

Size : 100 tests/20 tests

Isotype : IgG1

Rat IgG1 Isotype Antibody(FITC conjugated)

Source : Rat

Size : 100 tests/20 tests

Isotype : IgG1

产品优势

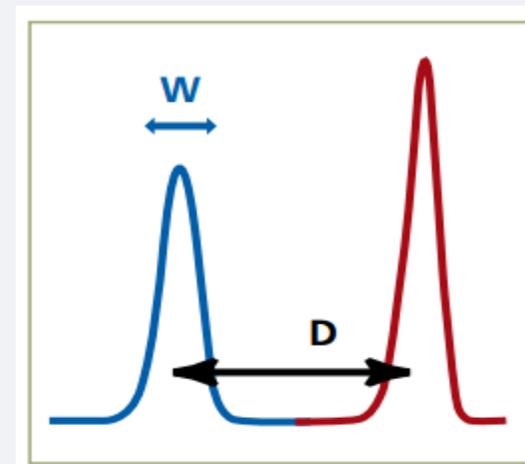
染料	Elabscience	Thermo
PE	219	158
APC	238	200
Alexa Fluor 488	66	92
FITC	61	56
PerCP	31	9

- 所用仪器配制有不同
- 所用抗体均为小鼠CD4抗体，但克隆号不同。

荧光素的强度：

染色指数 Stain Index:

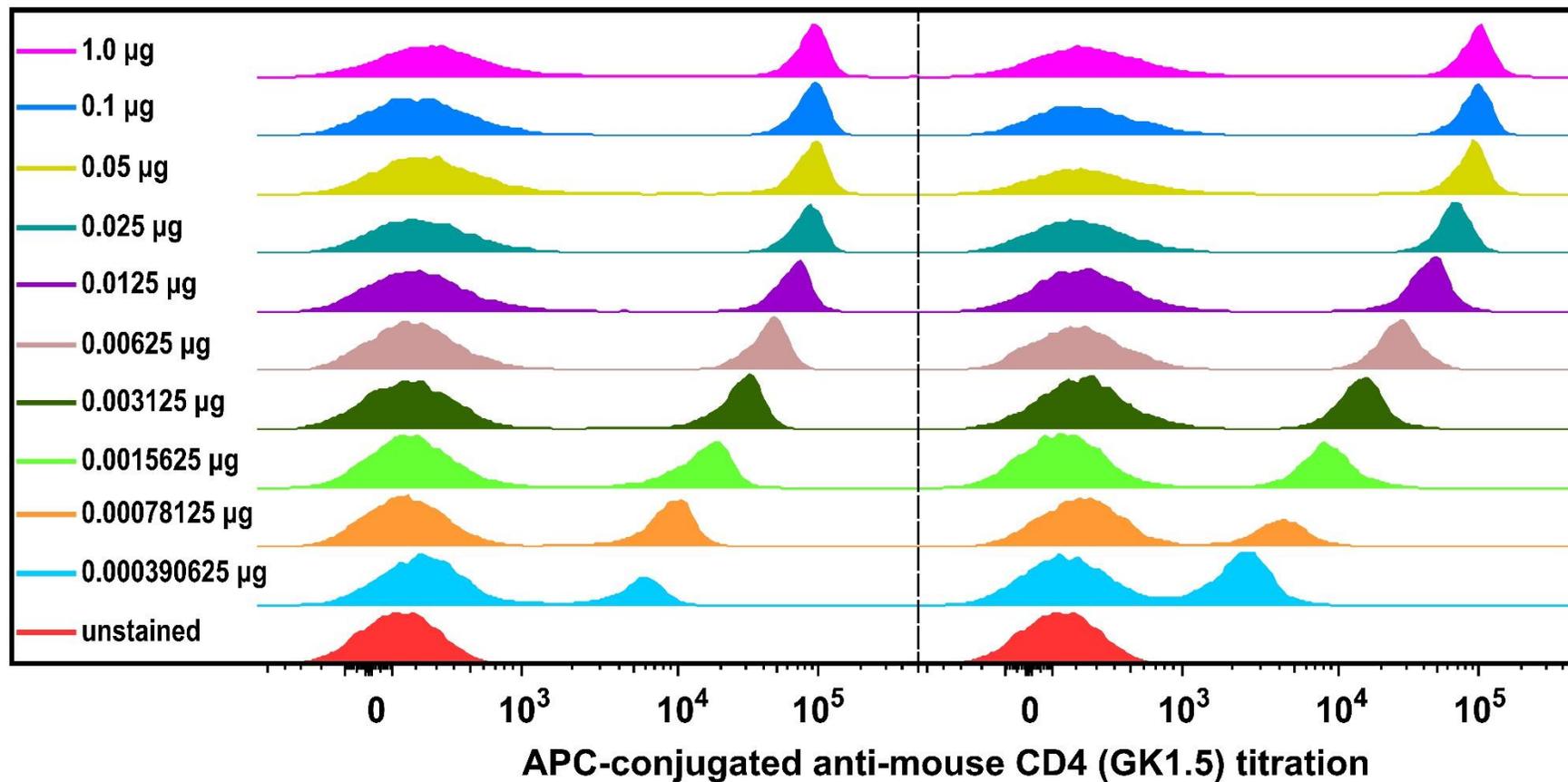
阳性群峰值与阴性群峰值
的差别与阴性群的比值



产品优势

Elabscience

B公司



多个浓度梯度下
均能实现良好的分离效果

相同的产品与Biolegend的分离效果比较

产品优势

- ✓ 专注于流式产品研发，部分产品性能优于国际大品牌；
- ✓ 使用文献中报道的克隆号对应的流式单抗；
- ✓ 价格实惠；
- ✓ 发货快，现货+顺丰时间；
- ✓ 售前、售后问题24小时内答复客户；
- ✓ 已上线约1500个指标和配套的同型对照，新品陆续上线中；
- ✓ 不同荧光标记满足客户多种需求，已有12色荧光标记，更多颜色的荧光抗体会持续上线；
- ✓ 标记的流式抗体采用Tests作为售卖规格，方便客户直接按照实验需求采购；
- ✓ 免费为客户提供特殊化的流式配色服务。

目录

- 1.流式细胞术的概念与目的**
- 2.流式细胞术与其他免疫学实验技术的异同**
- 3.流式样本的制备**
- 4.流式细胞仪检测原理与数据含义**
- 5.流式抗体的选择**
- 6.流式实验常见问题**

常见问题：FcR封闭

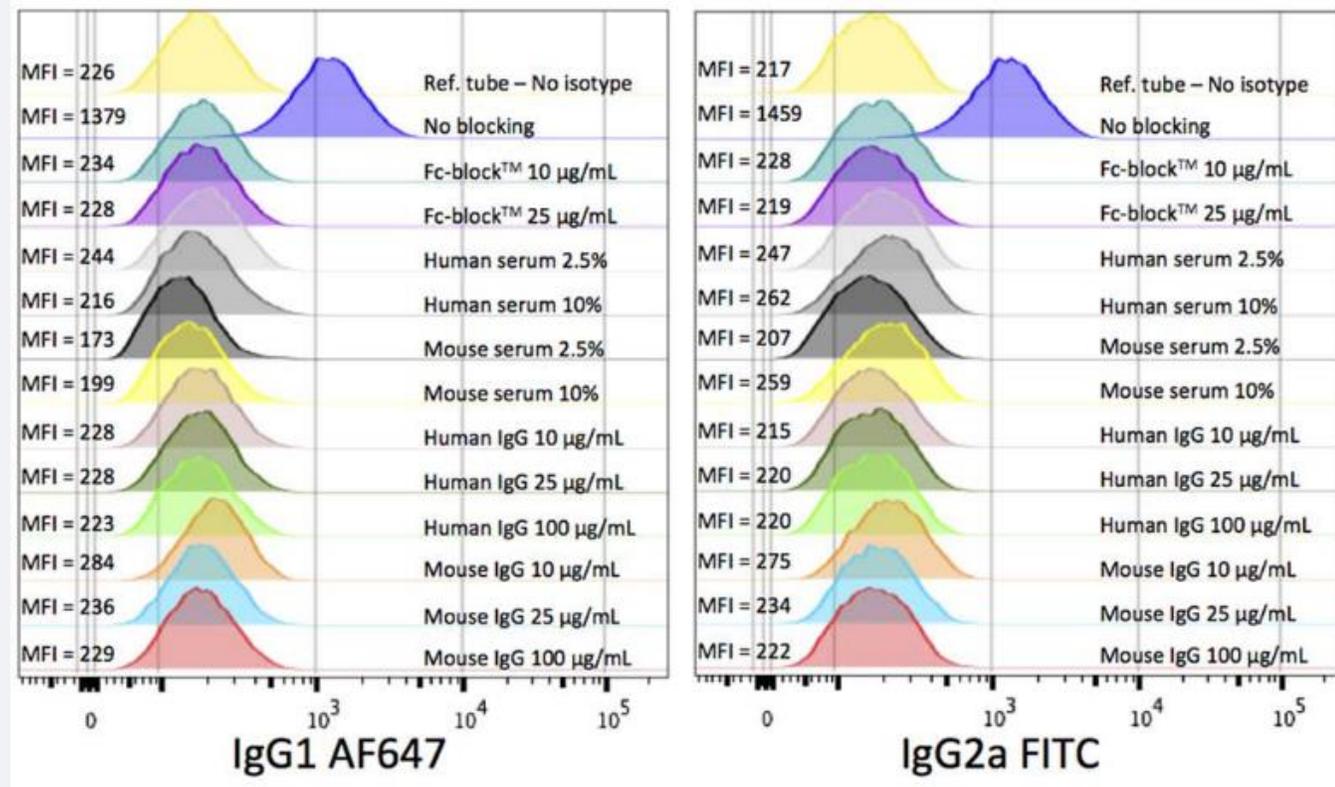
封闭Fc受体

封闭Fc受体能减少染色过程中的非特异性染色。

小鼠中，纯化的CD16/CD32单抗能和FcγRIII/II结合，封闭非特异性染色，使阴性细胞的背景荧光降至未标记细胞的水平。加入0.5-1μg纯的抗小鼠CD16/32单克隆抗体，室温孵育10分钟。

Purified Anti-Mouse CD16/32 Monoclonal Antibody E-AB-F0997A

对于人和大鼠，可直接使用过量的与荧光抗体相同来源和亚型的纯化Ig或者相同来源血清进行阻断，或者用商业化的Fc受体阻断剂。



Andersen, M. N. et al, (2016). *Cytometry Part A*, 89(11), 1001–1009

常见问题：多色搭配

常见荧光搭配：

4色内荧光抗体组合：**FITC**(AF488)、**PE**、**PerCP-Cy5.5**(PerCP、PE-Cy5.5)、**APC**(AF647)

6色内荧光抗体组合：**FITC**(AF488)、**PE**、**PerCP-Cy5.5**(PerCP、PE-Cy5.5)、**APC**(AF647)、**PE-Cy7**、**APC-Cy7**

- **核心原则**：抗原表达水平高与染料亮度的平衡
- 胞内蛋白尽量选用分子量小的染料修饰的抗体

Fluorophore	Ex (nm)	Em (nm)	Filter	Brightness
Brilliant Violet 421™	405	421	450/50	5
PE	496, 565	575	585/40	5
APC	650	660	660/20	5
PE/Cy5	496, 565	670	660/20	5
Brilliant Violet 605™	405	603	610/20	5
Alexa Fluor® 647	650	668	660/20	4
PE/Cy7	496, 565	774	780/60	4
Brilliant Violet 711™	405	711	710/50	4
Brilliant Violet 650™	405	645	660/20	4
Brilliant Violet 510™	405	510	510/50	4
PerCP/Cy5.5	482	690	695/40	3
Brilliant Violet 785™	405	785	780/60	3
Brilliant Violet 570™	405	570	585/42	3
Alexa Fluor® 488	495	519	530/30	3
FITC	493	519	530/30	3
PerCP	482	675	695/40	2
APC/Cy7	650	774	780/60	2
Alexa Fluor® 700	696	719	720/45	2
Pacific Blue™	410	455	450/50	1

常见问题：抗体用量

抗体用量过小：

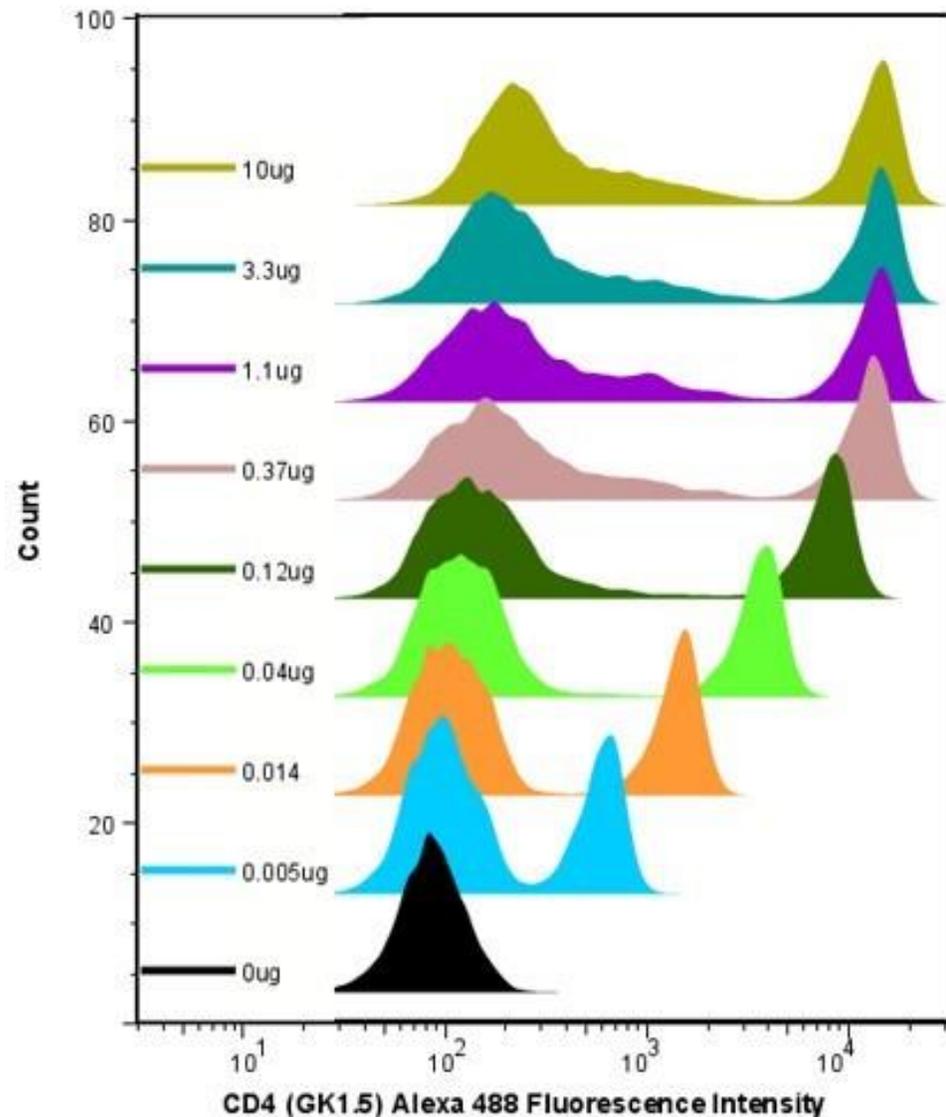
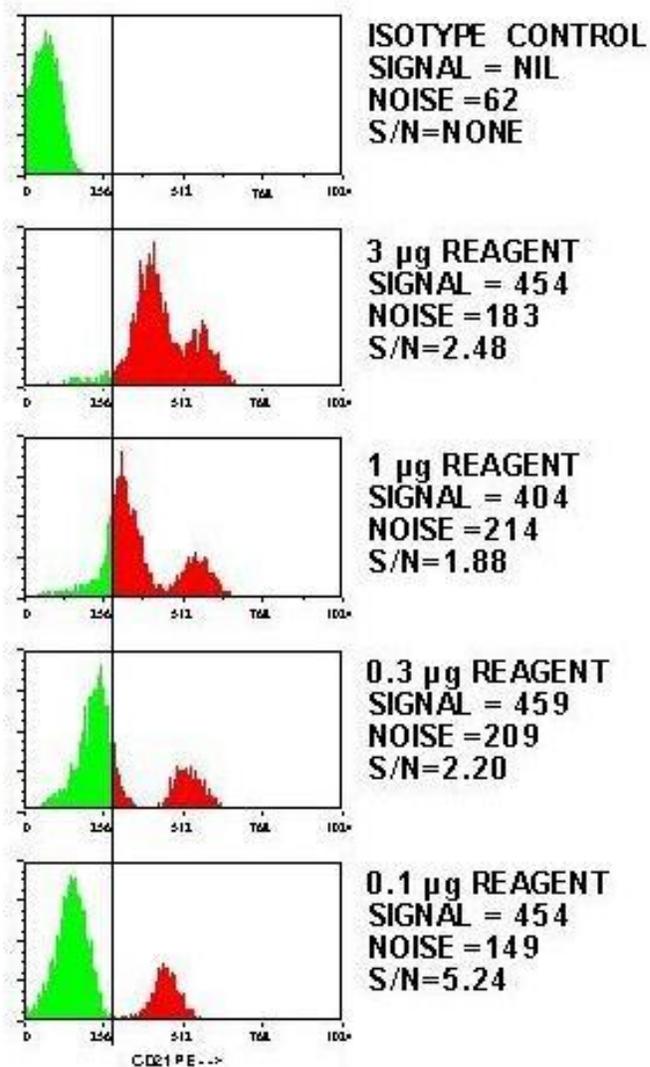
- 阳性细胞无法与阴性细胞分群

抗体用量过大：

- 可能会信号饱和
- 阴性群背景过高
- 浪费宝贵的抗体

抗体的滴定：

- 从推荐浓度的2倍开始
- 依次对半稀释得到8个梯度



常见问题：检测细胞总数

Desired CV (%) →		1	5	10	20	40
$r = \text{no. of events of interest} \rightarrow$		10000	400	100	25	6
When occurring at a frequency of (%)	1 : n	Total no. of events which must be collected ^(b)				
10	10	10^5	4×10^3	10^3	2.5×10^2	6.3×10^1
1	100	10^6	4×10^4	10^4	2.5×10^3	6.3×10^2
0.1	1000	10^7	4×10^5	10^5	2.5×10^4	6.3×10^3
0.01	10,000	10^8	4×10^6	10^6	2.5×10^5	6.3×10^4
0.001	100,000	10^9	4×10^7	10^7	2.5×10^6	6.3×10^5
0.00001 ^(c)	10,000,000	10^{11}	4×10^9	10^9	2.5×10^8	6.3×10^7

^(a)For cell-based assays such as flow cytometry, a simple calculation can be used to determine the size of the database/sample that will provide a given precision: $r = (100/CV)^2$; where r is the number of events meeting the required criterion, and CV is the coefficient of variation of a known positive control. Modified from <http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/rareeventanalysis/index.html>, Queen Mary, University of London.

^(b)With a WBC count in the low-normal range ($\sim 5 \times 10^9/L$), 10 mL of blood would contain $\sim 5 \times 10^7$ events.

^(c)Estimated frequency of CTCs in the peripheral blood of cancer patients.



Thanks for your attention!