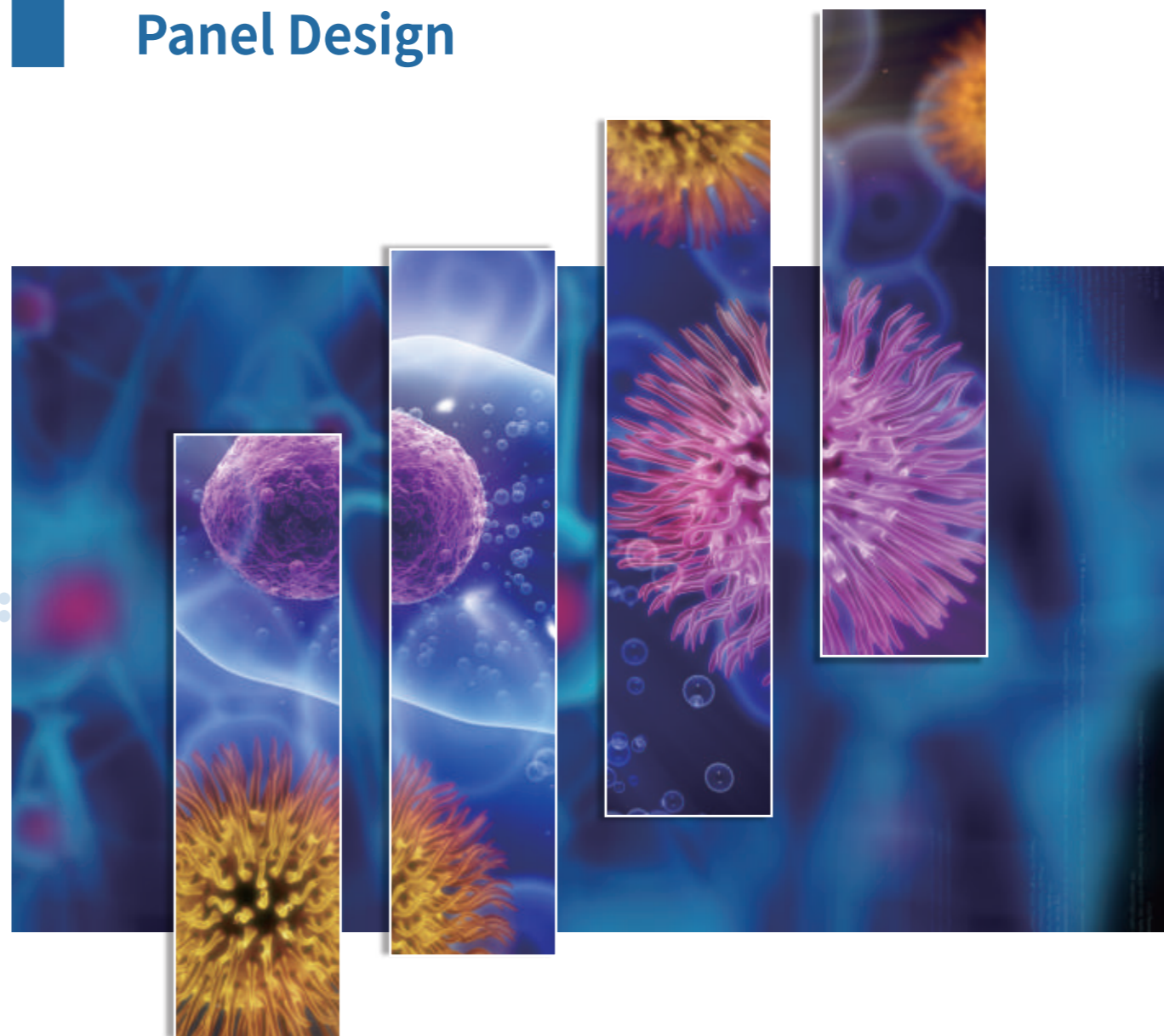


# 流式配色

## Panel Design

Elabscience®



武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司

网址: [www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)

销售部电话: 027-87879180

技术部电话: 027-65521719

邮箱: [marketing@elabscience.cn](mailto:marketing@elabscience.cn)

地址: 武汉市东湖新技术开发区高新大道858号生物医药园二期B18栋



关注微信公众号

# 目录

## Contents

### 01 基本配色原则

- 强弱搭配 ----- 01
- 选择干扰少的荧光组合 ----- 01
- 使分析的复杂程度降到最低 ----- 01
- 谨慎使用串联染料 ----- 01
- 注意环境因素对荧光素的影响 ----- 01

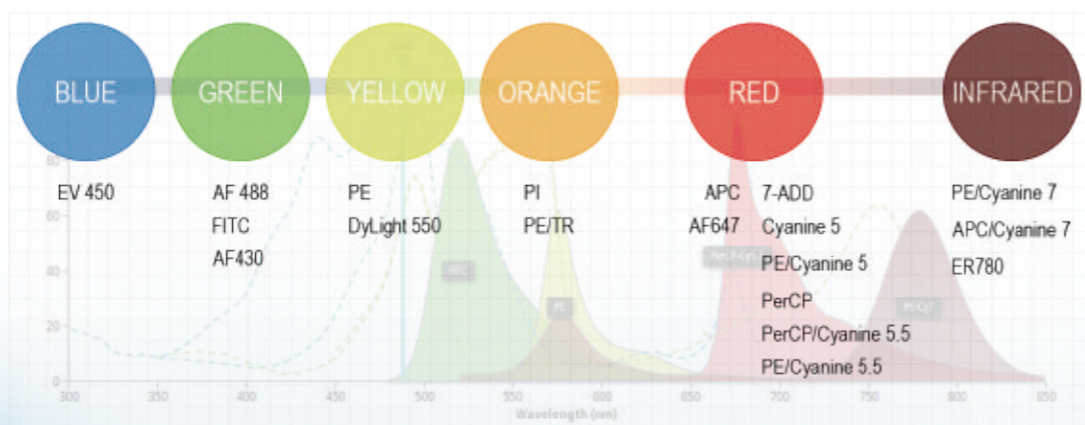
### 02 多色流式实验配色步骤

- STEP 01 根据实验目的选择Marker ----- 03
- STEP 02 了解流式细胞仪的信息 ----- 08
- STEP 03 荧光素的选择 ----- 09
- STEP 04 抗原和染料合理搭配 ----- 13

### 03 多色流式实验案例

- 小鼠脾脏T细胞(3色)检测 ----- 15
- 小鼠脾脏Treg(3色)检测 ----- 16
- 人外周血T细胞(4色)检测 ----- 17
- 人外周血Treg(6色)检测 ----- 18
- 人外周血Th1(3色)检测 ----- 19

## 01 基本配色原则



### 强弱搭配

高水平表达的抗原 + 弱荧光基团；  
低水平表达的抗原 + 强荧光基团。

### 选择干扰少的荧光组合

弱表达抗原放在无干扰通道；  
强表达抗原放在不干扰其它通道的通道。

### 使分析的复杂程度降到最低

互相排斥的抗原允许溢漏；  
共表达但高表达的抗原允许溢漏；  
允许子代对亲代的溢漏，反之不行。

### 谨慎使用串联染料

串联染料在复杂多色实验中非常必要；  
光照和固定都容易导致其降解；  
注意标准化操作以避免降解引起的实验问题。

### 注意环境因素对荧光素的影响

酸性缓冲液和固定步骤对部分染料具有破坏性，例如：FITC对低pH环境敏感；  
固定或者长时间的孵育对串联染料影响明显。

## 02 流式多色配色解决方案

### STEP 01

根据实验目的选择Marker

4C2HII

### STEP 02

了解流式细胞仪的信息

### STEP 03

荧光素的选择

### STEP 04

抗原和染料合理搭配



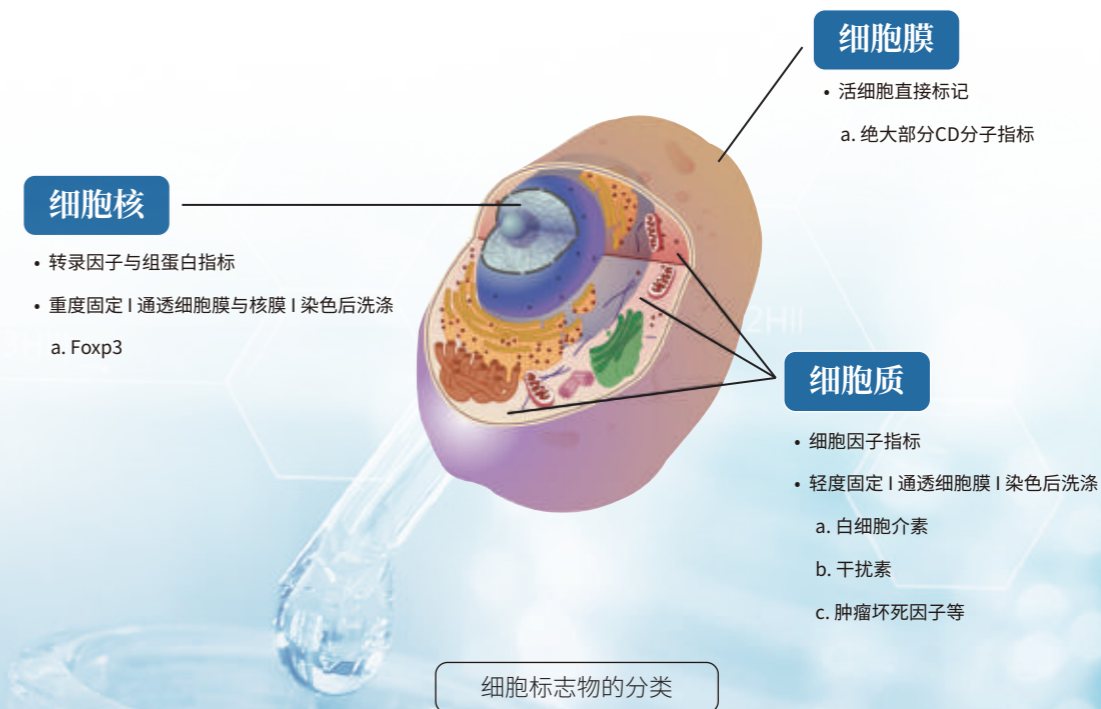
## STEP 01 根据实验目的选择Marker

### 参考相关文献选择需要检测的Marker

Human	Marker
B Cells	CD19
T Cells	CD3, CD4, CD8
Treg Cells	CD4, CD25, CD127
Th1/Th2/Th17 Cells	CD4, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17
Dendritic Cells	CD1c, CD83, CD141, CD209, MHC II
Natural Killer Cells	CD3-, CD16, CD56
Macrophage	CD11b, CD68, CD163
Monocyte	CD14, CD16, CD64
Plasma Cells	CD138
Red Blood Cells	CD235a

Mouse	Marker
B Cells	CD19
T Cells	CD3, CD4, CD8
Treg Cells	CD4, CD25, Foxp3
Th1/Th2/Th17 Cells	CD4, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17
Dendritic Cells	CD11c, MHC II
Natural Killer Cells	CD3-, CD49b (clone DX5) or NK1.1
Macrophage	F4/80, CD11b, CD80, CD86, CD206
Monocyte	CD11b, CD115, Gr-1, Ly-6C
Plasma Cells	CD138
Red Blood Cells	TER-119

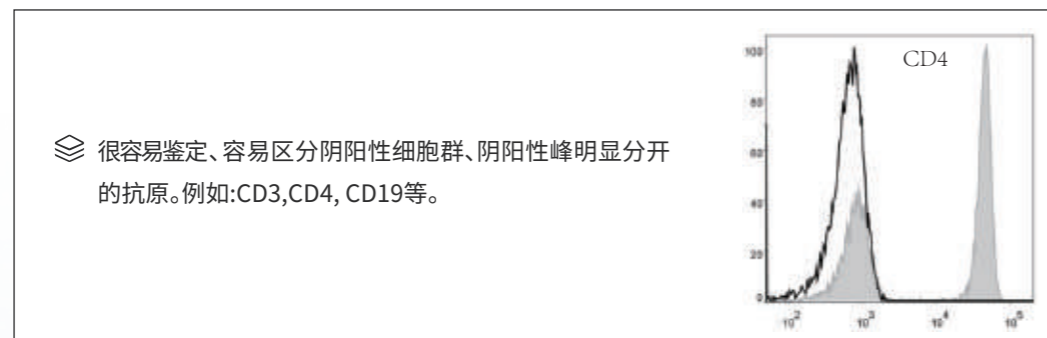
### 了解Marker的表达位置



- 一般来说, 绝大部分CD分子指标, 都是细胞表面指标; 细胞因子类指标, 如白细胞介素、干扰素 (IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 和IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ ) 等, 属于胞内指标; 而最常见的核内染色指标是Foxp3。
- 对于细胞质或者细胞核的Marker, 需要对细胞进行固定破膜/破核膜。在做胞质或胞核Marker染色实验操作时, 如果按常规方法先染细胞表面Marker, 再对细胞进行固定破膜, 最后对胞内或核内Marker染色, 此时细胞表面的Marker尽量避免使用串联染料, 因为“固定”容易对串联荧光素造成破坏。

## 了解Marker的表达量

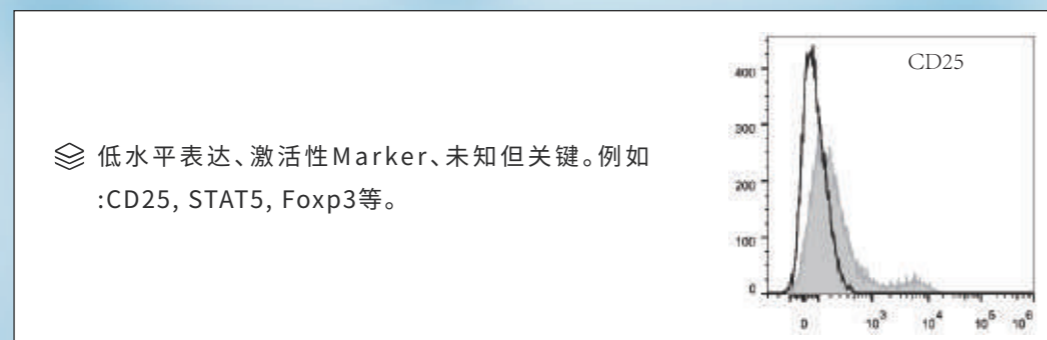
根据在待测细胞类型中相应抗原的表达量，可以初略的将需检测的抗原分子分为三类：



阴阳性分群明显



较高水平表达、连续表达



低表达

## ++常见细胞的表面抗原密度++

亚群	抗原分子	抗原密度	亚群	抗原分子	抗原密度
淋巴细胞	CD3	++	B细胞	CD19	++
	CD4	++		CD20	+++
	CD8	++		CD21	++++
	CD19	+		CD22	++
T细胞	TCR	+++		HLA-DR	+++
	CD2	++		CD11a	++
	CD3	+++	CD40	+	
	CD5	++	CD86	++	
	CD7	++	CD80	+	
	CD45	++++	树突细胞	CD11a	++
CD4+T细胞	CD4	+++		CD40	++
	CD28	++		CD80	+++
	CCR5	++	CD86	++++	
CD8+T细胞	CD8	++	NK细胞	CD56	++
	CD28	++	红细胞	Glycophorin A	+++++
单核细胞	CD14	+++	中性粒细胞	CD14	+
	CD32	++		CD16	++++
	CD64	++	碱性粒细胞	CD23	++



代表抗原密度 <10,000



代表10,000<抗原密度<100,000



代表100,000<抗原密度<200,000

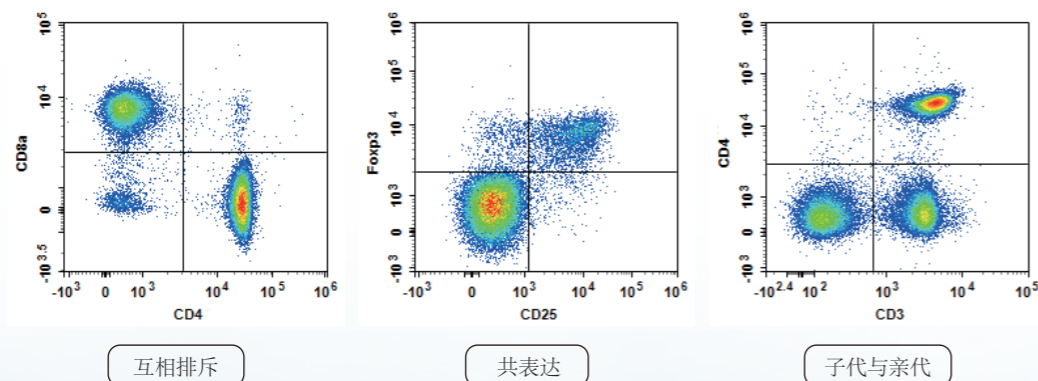


代表200,000<抗原密度<300,000



代表抗原密度 >300,000

## 了解Marker间的相互关系



### Marker间的相互关系包括互相排斥、共表达、子代与亲代:

- ☞ 互相排斥是指两种抗原不会同时表达在一种细胞上,即表达A不表达B,表达B不表达A,互相排斥的抗原允许荧光溢漏。例如,T细胞分CD4+T和CD8+T两种,表达CD4的T细胞不表达CD8,表达CD8的T细胞不表达CD4。
- ☞ 共表达的抗原就是指两种抗原表达在同一种细胞上,例如,小鼠Treg细胞上同时表达CD25和Foxp3。共表达但高表达的抗原允许溢漏。
- ☞ 子代与亲代即抗原之间是上下级的关系,下级抗原是在上级抗原的基础上分析的。例如,所有T细胞都表达CD3,T细胞又分为CD4+T和CD8+T两种,那么CD3是亲代,CD4和CD8是子代。一般来说,允许子代对亲代的溢漏,反之不行。

## STEP 02

## 了解流式细胞仪的信息

仪器	激发光	荧光通道	常用荧光标记
仪器通道及 可选荧光基团	488nm	530/30	FITC、 AF488
		575/26	PE
		610/20	PE/TR、 PE/AF594
		695/40	PerCP/Cyanine5.5、 PE/ Cyanine5、 PerCP
		780/60	PE/Cyanine7
	633nm	660/20	APC、 AF647
		730/45	AF700
		780/60	APC/Cyanine7、 ER780

不同厂家、不同型号的流式细胞仪配置不同,即使相同型号的流式细胞仪配置也不尽相同。设计流式实验时一定要了解流式细胞仪的配置,才能够选择合适的荧光染料进行配色,建议可以从以下两个方面来了解:

- ① 仪器有几个激光器,常见的流式细胞仪激光器有405nm、488nm、561nm、633nm等;
- ② 每个激光器对应有哪些检测通道。



## STEP 03

## 荧光素的选择

- ☞ 了解荧光素激发波长和发射波长，根据流式细胞仪的激光器和滤光片配置，确认可以在仪器上使用何种荧光素。
- ☞ 了解所选荧光素的相对荧光亮度。
- ☞ 判断选中的荧光素相互之间的荧光溢漏情况。
- ☞ 了解不同荧光基团的特性，根据实验目的和要求，选择合适的荧光素。

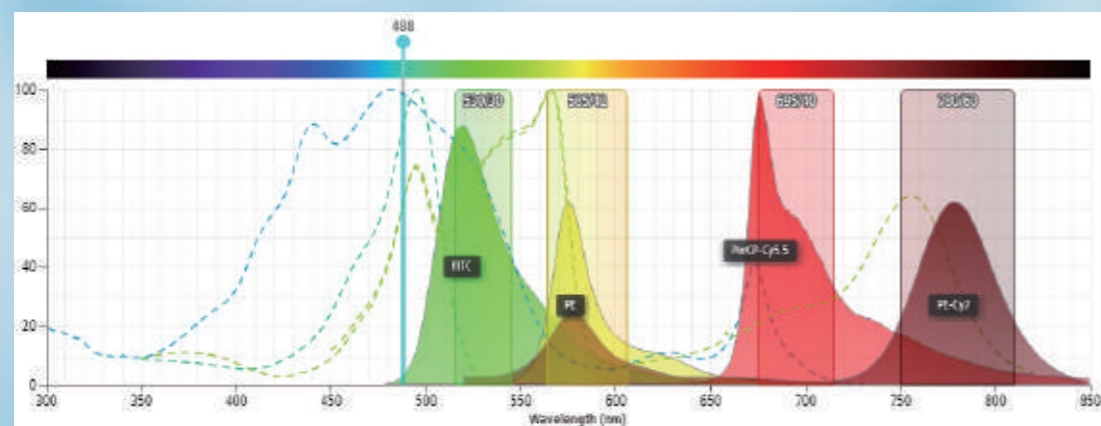
## 荧光基团波长信息

Fluorochrome	Fluorescence Emission Color	Excitation Laser Lines (nm)	Excitation Max(nm)	Emission Max(nm)
EV450	Blue	405	410	450
AF488	Green	488	495	520
FITC	Green	488	490	530
PE	Yellow	488, 532, 561	495, 565	575
PI	Orange	488, 532, 561	536	617
PE/TR	Orange	488, 532, 561	495,565	620
PE/AF594	Orange	488, 532, 561	495,565	615
7-AAD	Red	488, 532, 561	546	650
Cyanine 5	Red	633, 635, 640	650	670
APC	Red	633, 635, 640	650	660
AF647	Red	633, 635, 640	650	670
PE/Cyanine5	Red	488, 532, 561	495, 565, 655	670
PerCP	Red	488	440, 480, 675	675
PerCP/Cyanine5.5	Red	488	440, 480, 675	675
PE/Cyanine5.5	Far Red	488, 532, 561	495, 565, 675	690
PE/Cyanine7	Infrared	488, 532, 561	495, 565, 755	775
ER780	Infrared	633, 635, 640	625	765
APC/Cyanine7	Infrared	633, 635, 640	650, 760	780

常用荧光素相对荧光亮度

	Very Bright	Bright	Moderate	Dim
Blue (488 nm)	PE PE/ Cyanine7 PE/TR PE/AF594	PE/ Cyanine5 PE/ Cyanine5.5	FITC AF488 PerCP/Cyanine5.5	PerCP
Red (633 nm)		APC AF647		ER780 APC/ Cyanine7
Violet (405 nm)				EV450

荧光基团光谱重叠信息



荧光基团特性

荧光基团	染料特性
FITC	荧光亮度易受 pH 值影响, pH 值降低时其荧光亮度也随之减弱
AF488	耐光漂白, 在较宽的 pH 值范围 (pH4-10) 内保持稳定
PE	亮度高, 相对稳定
APC	亮度高, 不如 PE 稳定
PerCP/Cyanine5.5	相对稳定 (强光和固定) 的串联染料
PE/Cyanine 5	亮度高, 荧光易淬灭, 不耐固定, 不宜与 APC 搭配
ER780	荧光亮度优于 APC/Cyanine 7, 完全可替代 APC/Cyanine 7, 耐固定, 对APC通道的荧光溢漏较小
APC/Cyanine 7	荧光较弱, 适用于弱表达抗原分子的分析, 易淬灭, 不耐固定
PE/Cyanine7	亮度高, 易淬灭, 不耐固定, 与 FITC 无光谱重叠, 也 APC 搭配荧光干扰小, 补偿较小

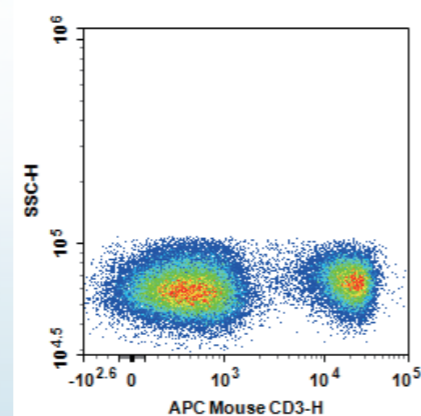
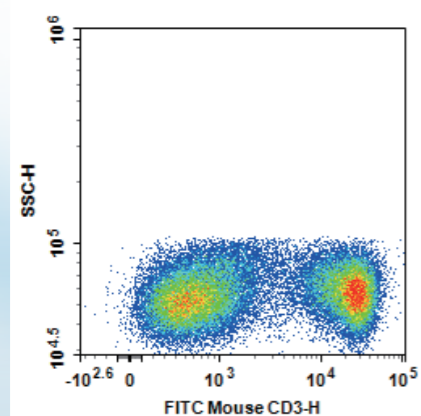


## STEP 04

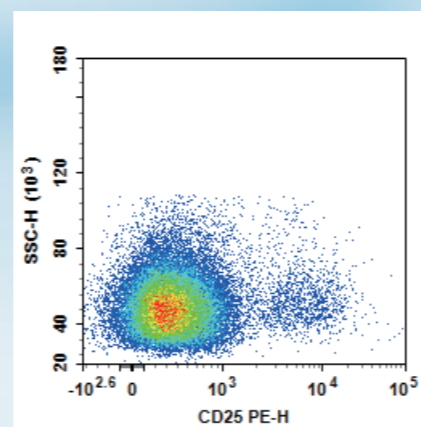
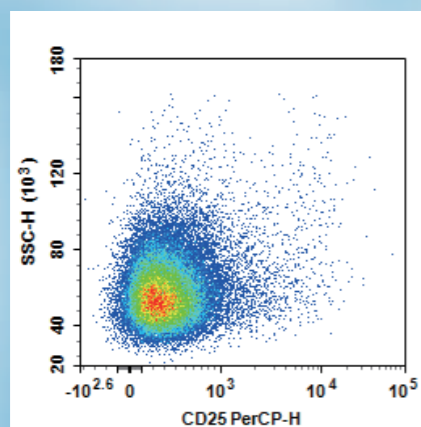
## 抗原和染料合理搭配

## 强弱搭配

强表达抗原，可以选择弱荧光素，也可以选择强荧光素，如图所示，强表达抗原CD3选择弱荧光素FITC和强荧光素APC，对实验结果影响不大。



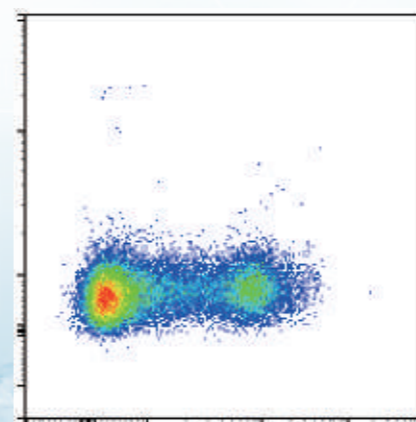
弱表达抗原，一定要选择强荧光素，如图所示，弱表达的抗原CD25选择弱荧光素PerCP，会导致阴阳性细胞群分不开，如果选择强荧光素PE，可以看到明显的阳性细胞群。



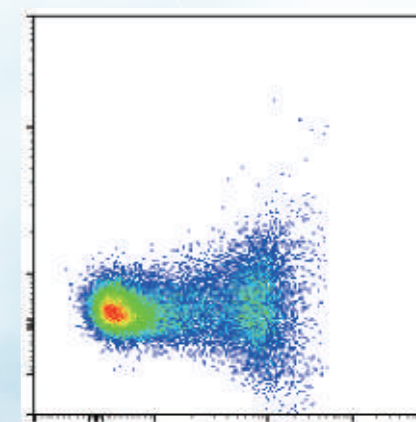
## 尽量选择干扰少的荧光组合

不同的荧光染料会存在光谱重叠，在配色时尽量使用光谱重叠少的荧光组合，可以减少数据分析的复杂程度。

荧光染料之间的荧光重叠，通过荧光补偿仅能消除荧光背景，被干扰通道的灵敏度降低，无法消除。



无干扰

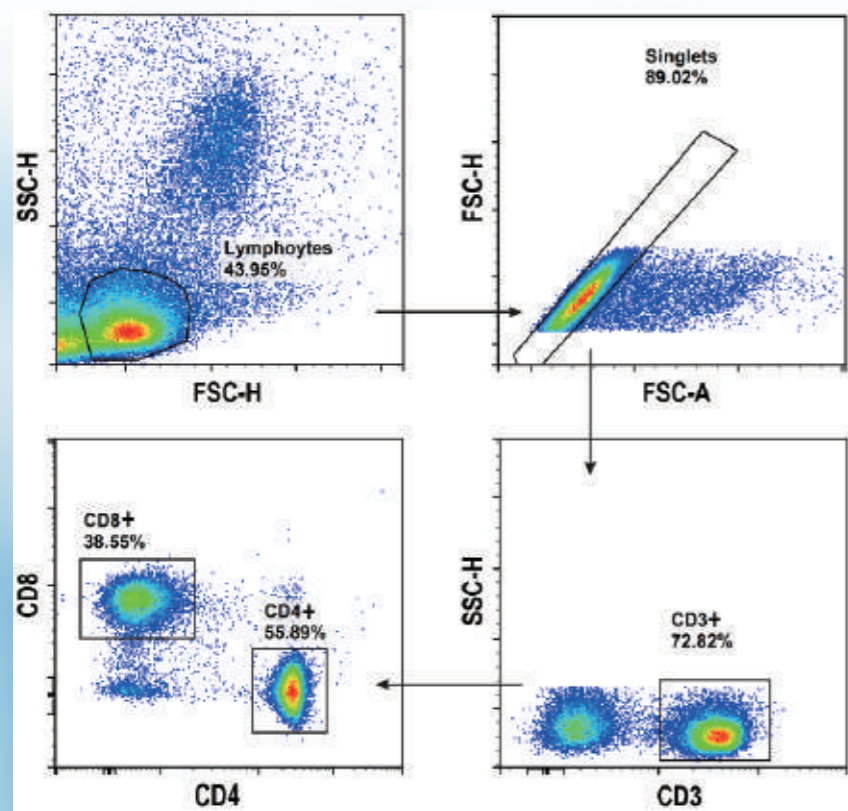


干扰严重

### 03 多色流式实验案例

#### 案例1:小鼠脾脏T细胞(3色)检测

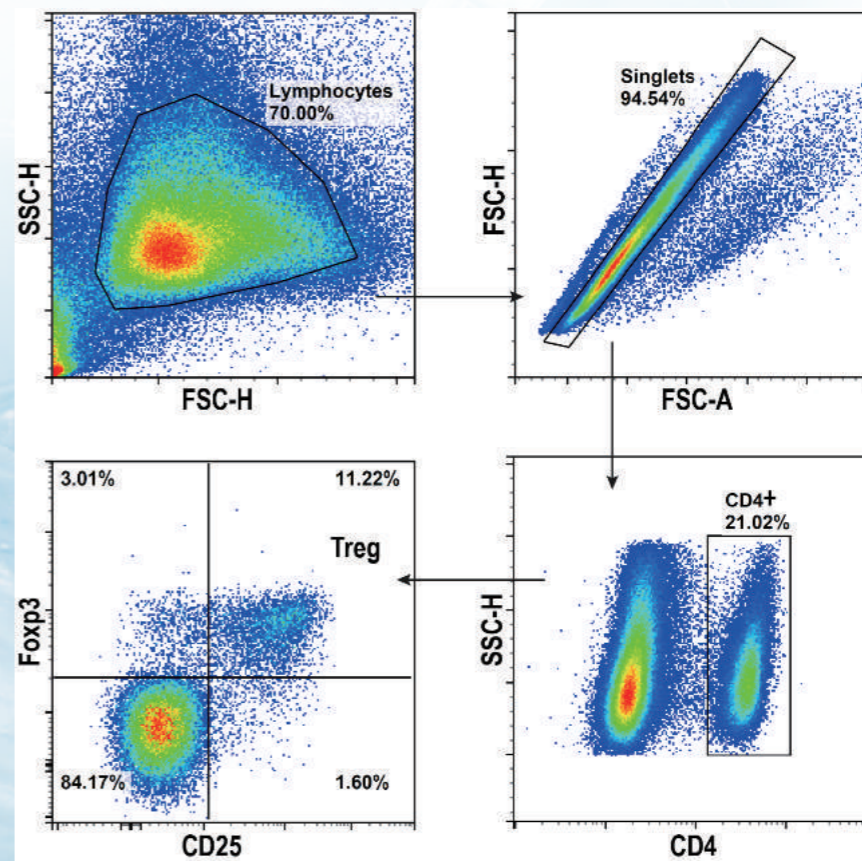
指标	荧光素	克隆号	货号
CD3	EV450	17A2	E-AB-F1013Q
CD4	APC	GK1.5	E-AB-F1097E
CD8	ER780	53-6.7	E-AB-F1104S



- TIPS:**
- 1.以上配色方案细胞分群很明显,不需要做单染管调节补偿。
  - 2.CD3/4/8细胞分群明显,一般来说可以不用做同型对照。
  - 3.该实验的关键因素为红细胞裂解,红细胞裂解过度或者裂解不足,均会导致淋巴细胞群分群不明显。

#### 案例2:小鼠脾脏Treg(3色)检测

指标	荧光素	克隆号	货号
CD4	FITC	GK1.5	E-AB-F1097C
CD25	APC	PC-61.5.3	E-AB-F1102E
Foxp3	PE	3G3	E-AB-F1238D

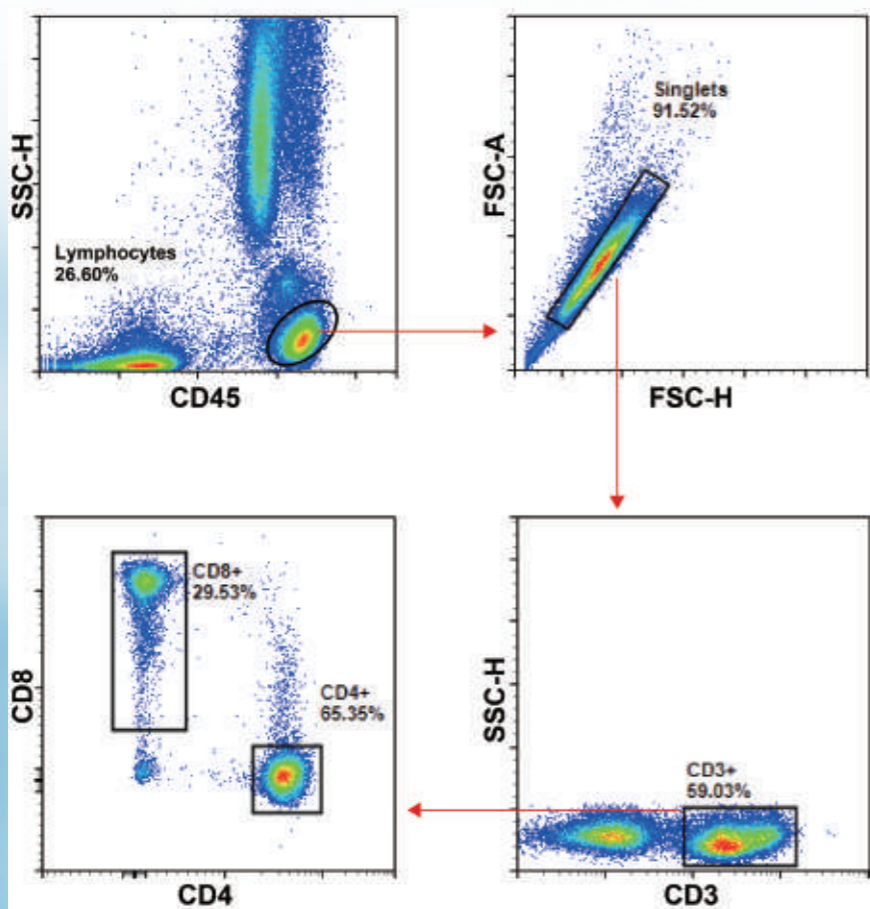


- TIPS:**
- 1.小鼠Treg的标记是CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>。
  - 2.CD4分群明显,无需同型对照,CD25和Foxp3分群不明显,需同型对照。
  - 3.荧光素有溢漏,故需要设置单阳管用于调节补偿。
  - 4.破膜剂使用不当会造成很高的背景以及细胞分群不明显。



### 案例3:人外周血T细胞(4色)检测

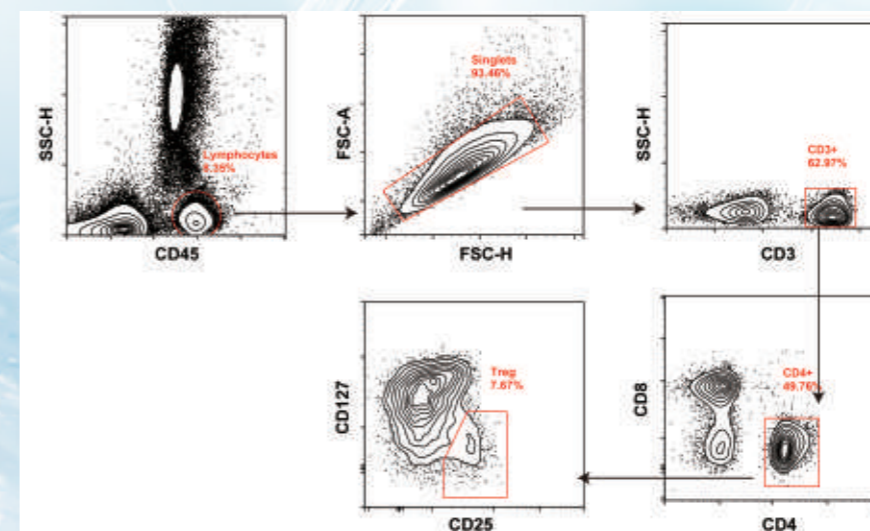
指标	荧光素	克隆号	货号
CD45	EV450	HI30	E-AB-F1137Q
CD3	APC	OKT3	E-AB-F1001E
CD4	FITC	RPA-T4	E-AB-F1109C
CD8a	PE	OKT-8	E-AB-F1110D



- TIPS:**
1. 做人外周血T细胞的检测, 建议染色时加入CD45, 可以较容易圈出淋巴细胞群。
  2. 以上配色方案细胞分群很明显, 不需要做单染管调节补偿。

### 案例4:人外周血Treg(6色)检测

指标	荧光素	克隆号	货号
CD45	EV450	HI30	E-AB-F1137Q
CD3	ER780	OKT3	E-AB-F1001S
CD4	FITC	RPA-T4	E-AB-F1109C
CD8a	PerCP/Cyanine5.5	OKT-8	E-AB-F1110J
CD25	PE	BC96	E-AB-F1194D
CD127	AF647	A019D5	E-AB-F1152M

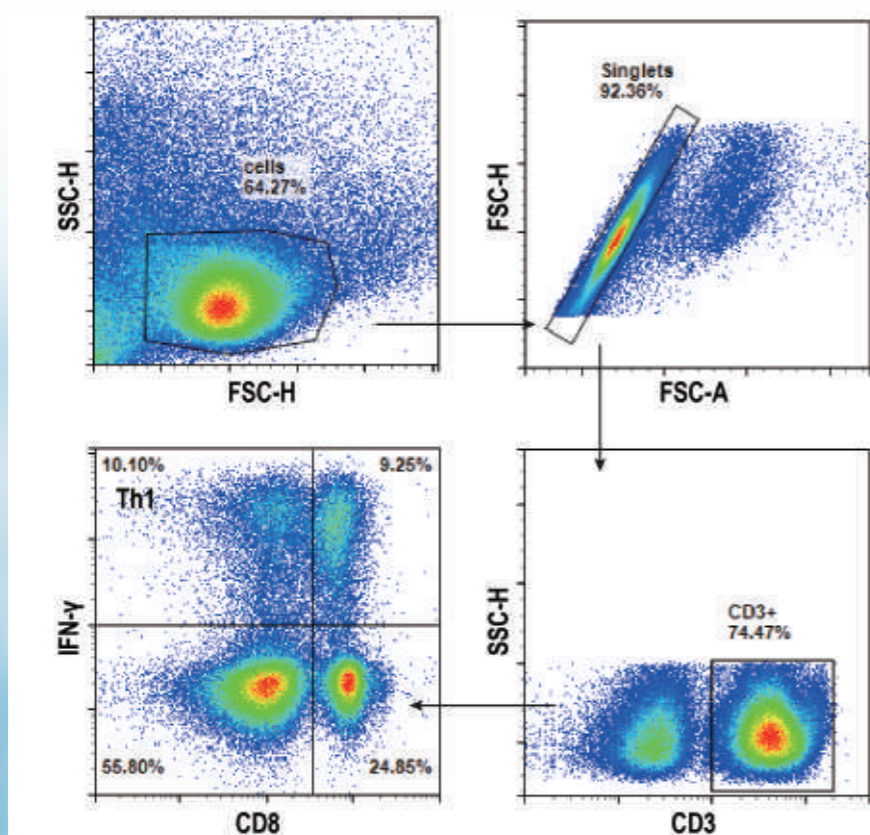


- TIPS:**
1. 传统的通过检测Foxp3鉴定Treg的方法操作相对复杂, 且固定破膜步骤对实验者要求较高, 目前流行通过CD127来检测人Treg。
  2. 直接通过CD45和SSC圈出淋巴细胞门, 分析CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-/low</sup>的细胞比例, 正常人外周血中Treg细胞在淋巴细胞中占比为3%~10%。
  3. 需要设置单阳管用于补偿调节。



案例5:人外周血Th1 (3色) 检测

指标	荧光素	克隆号	货号
CD3	EV450	OKT3	E-AB-F1001Q
CD8a	PerCP/Cyanine5.5	OKT-8	E-AB-F1110J
IFN- $\gamma$	FITC	B27	E-AB-F1196C



TIPS:

- 1.PMA刺激会导致人T细胞表面CD4表达的下调,因此我们界定CD4+ T细胞是通过染CD3和CD8,其中CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>为Th1细胞。
2. IFN- $\gamma$ 需要做同型对照,因为一般情况下细胞因子表达量不高。
- 3.破膜剂对细胞损伤较大,建议离心后形成的细胞沉淀先弹散成细胞悬液后再加入破膜剂,以减少细胞损伤。