



**Elabscience®**

Focus on your research  
Service for life science

# 常见免疫细胞 流式配色及实验流程

**Elabscience®**  
Elabscience Biotechnology Co.,Ltd

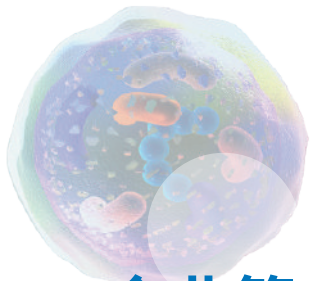


关注微信公众号



关注积分商城

武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司  
Elabscience Biotechnology Co.,Ltd



## 企业简介 ABOUT US

武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司 (Elabscience Biotechnology Co.,Ltd) 是一家专注于免疫检测类试剂的高科技生物公司，主要产品为抗体、流式抗体、ELISA试剂盒、生化试剂盒、标记试剂盒、细胞功能检测盒和其它相关试剂。

## CONTENT 目录

- 热销流式抗体配色方案 -----1
- 荧光基团信息 -----2
- 流式实验流程 -----3
- 流式配色案例分享 -----6
- 流式配色服务 -----8
- 流式数据分析服务 -----9

### Elabscience® 热销流式抗体配色方案

细胞亚群	种属	指标	荧光标记	克隆号	货号
T 细胞	Human	CD3	PE	OKT3	E-AB-F1001D
		CD4	FITC	RPA-T4	E-AB-F1109C
		CD8a	APC	OKT-8	E-AB-F1110E
	Mouse	CD3	PE	17A2	E-AB-F1013D
		CD4	FITC	GK1.5	E-AB-F1097C
		CD8a	APC	53-6.7	E-AB-F1104E
B 细胞	Human	CD3	FITC	OKT3	E-AB-F1001C
		CD19	APC	CB19	E-AB-F1004E
	Mouse	CD3	FITC	17A2	E-AB-F1013C
		CD19	APC	1D3	E-AB-F0986E
NK 细胞	Human	CD3	FITC	OKT3	E-AB-F1001C
		CD16	PE	3G8	E-AB-F1236D
		CD56	PE	MEM188	E-AB-F1006D
	BALB/c Mouse	CD3	FITC	17A2	E-AB-F1013C
		CD49b	APC	DX5	E-AB-F1116E
	C57BL/6 Mouse	CD3	FITC	17A2	E-AB-F1013C
		NK1.1	APC	PK136	E-AB-F0987E
Th1/Th2/Th17 细胞	Human	CD4	ER780	RPA-T4	E-AB-F1109S
		IFN-γ	FITC	B27	E-AB-F1196C
		IL-4	PE	MP4-25D2	E-AB-F1203D
		IL-17A	APC	BL168	E-AB-F1173E
	Mouse	CD4	ER780	GK1.5	E-AB-F1097S
		IFN-γ	FITC	XMG1.2	E-AB-F1101C
		IL-4	PE	11B11	E-AB-F1204D
		IL-17A	APC	TC11-18H10.1	E-AB-F1199E

Treg 细胞	Human	CD4	FITC	RPA-T4	E-AB-F1109C
		CD25	PE	BC96	E-AB-F1194D
		CD127	APC	A019D5	E-AB-F1152E
	Mouse	CD4	FITC	GK1.5	E-AB-F1097C
		CD25	PE	PC-61.5.3	E-AB-F1102D
		FOXP3	APC	3G3	E-AB-F1238E

\* 检测人的样本时，特别是病人血液样本 / 肿瘤样本，建议实验方案增加指标 CD45 辅助后期数据分析；

\* 推荐方案仅适合无自发荧光样本，如有自发荧光请联系技术支持免费定制配色方案；

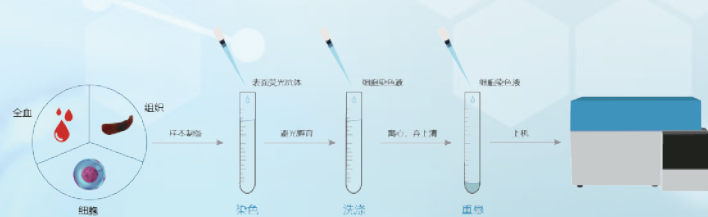
\* 部分配色方案对流式细胞仪配置要求较高，购买前请确认荧光素信息和流式细胞仪检测通道是否匹配。

## 荧光基团信息

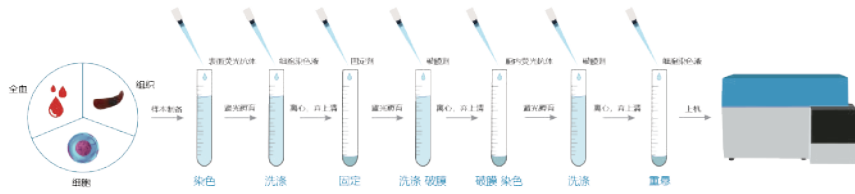
荧光	发射光颜色	激光器 (nm)	最大激发波长 (nm)	最大发射波长 (nm)	相对荧光亮度
EV450	Violet	405	410	450	★★★
AF488	Green	488	495	520	★★★★
FITC	Green	488	490	530	★★★★
PE	Yellow	488/561	495, 565	575	★★★★★★
PE/TR	Orange	488/561	495, 565	620	★★★★★★
APC	Red	633	650	660	★★★★★
AF647	Red	633	650	670	★★★★★
PE/Cyanine5	Red	488/561	495 565, 655	670	★★★★★
PerCP	Red	488	440, 480, 675	675	★
PerCP/Cyanine5.5	Red	488	440, 480, 675	675	★★★★
PE/Cyanine5.5	Far Red	488/561	495, 565, 675	690	★★★★★
PE/Cyanine7	Infrared	488/561	495, 565, 755	775	★★★★★★
ER780	Infrared	633	625	765	★★★

## 流式实验流程

- ▶ 01. 阅读文献，确认目标 Marker。
- ▶ 02. 了解目标 Marker 间的圈门逻辑关系。
- ▶ 03. 了解实验使用流式细胞仪的配置 (激光器、检测通道、滤光片信息)。
- ▶ 04. 通过流式细胞仪配置确认可选择的荧光素及补偿关系。
- ▶ 05. 确认目标 Marker 在样本中的表达量 (文献、资料、预实验等)。
- ▶ 06. 确认目标 Marker 表达位置 (胞内、核内、表面等)。
- ▶ 07. 流式配色。
  - 原则如下：
    - 强弱搭配
    - 选择干扰少的荧光组合
    - 使分析的复杂程度降到最低
    - 谨慎使用串联染料
    - 注意环境因素对荧光素的影响
- ▶ 08. 样本管的设置：
  - 空白对照 (不加任何荧光抗体的样本管，用来调节电压)
  - 单阳管 (所选荧光素之间存在荧光溢漏时，每个染料需要单独染一管含阳性样本的细胞用于调节补偿，有多少种荧光素，需要多少个单阳管)
  - 同型对照管 (对于阴阳性不易区分的样本，必须要用同型对照，通常情况下所有同型对照全部加入同一个样本管)
  - FMO 对照 (荧光减一对照，可选，连续表达或不易区分阴阳性群体的指标，每个指标做一个 FMO 对照。)
  - 生物学对照 (即通常理解意义的对照样本，所有抗体染色管)
  - 实验组 (所有抗体染色样本管)
- ▶ 09. 样本制备成单细胞悬液，并计数。确保 10<sup>6</sup> 个细胞 (常规 1 Test) 添加对应的抗体量。
- ▶ 10. 流式染色 (如有胞内 Marker，需先染表面 Marker，固定破膜后再染胞内 Marker)，染色流程如下：



细胞表面 Marker 染色步骤



细胞内 Marker 染色步骤

\*对于巨噬细胞 / 树突状 (DC) 细胞样本, 或者指标用含 Cyanine 荧光素标记的, 强烈推荐样本染色前加入 FcR 封闭剂

▶ 11. 上机检测。

注意事项:

- 流式细胞仪需定期进行质检, 确保数据的准确性
- 样本上机前, 确认是单细胞悬液, 避免结团细胞堵塞流式细胞仪
- 对流式细胞仪的阈值进行设定, 减少细胞碎片对实验结果的干扰
- 空白组调节电压 (将目的细胞至于视野范围内, 电压过低 / 过高会引起细胞压线, 导致细胞分群不明显或者数据无法分析)
- 选择荧光素对应的通道, 实验通道全部打开 (开通荧光素的 A 和 H 检测)
- 补偿清零。强烈建议离线调补偿 (一旦在线调节补偿出错, 分析数据时无挽回余地)
- 选择上机细胞数量

Desired CV (%) →	1	5	10	20	40
r = no. of events of interest →	10000	400	100	25	6
When occurring at a frequency of (%)	Total no. of events which must be collected <sup>(b)</sup>				
10	10	4 × 10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	2.5 × 10 <sup>2</sup>	6.3 × 10 <sup>1</sup>
1	100	4 × 10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	2.5 × 10 <sup>3</sup>	6.3 × 10 <sup>2</sup>
0.1	1000	4 × 10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	2.5 × 10 <sup>4</sup>	6.3 × 10 <sup>3</sup>
0.01	10,000	4 × 10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	2.5 × 10 <sup>5</sup>	6.3 × 10 <sup>4</sup>
0.001	100,000	4 × 10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	2.5 × 10 <sup>6</sup>	6.3 × 10 <sup>5</sup>
0.0001 <sup>(c)</sup>	10,000,000	4 × 10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	2.5 × 10 <sup>7</sup>	6.3 × 10 <sup>6</sup>

<sup>(a)</sup>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.

<sup>(b)</sup>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.

<sup>(c)</sup>Estimated frequency of CTCs in the peripheral blood of cancer patients.

Circulating Tumor Cell Analysis: Technical and Statistical Considerations for Application to the Clinic  
Allan, A. L., & Keeney, M. (2010) Journal of Oncology, 2010, 426218

- \*通过文献确定目的细胞占总细胞的比例确定收集的总细胞数, 目标细胞量少容易造成分析结果不准。
- \*细胞上机一般建议低速检测。

- ▶ 12. 导出数据。
- ▶ 13. 数据分析。  
分析流程如下:



- \*注意了解通道数据的含义 (包括物理参数 FSC/SSC 和荧光参数)
- \*数据分析时可选择合适的坐标轴呈现 (线性坐标轴、对数坐标轴 or 双指数坐标轴)

## 流式配色案例分享

### 配色方案:

细胞亚群	种属	指标	荧光标记	克隆号	货号
T 细胞	Human	CD45	EV450	HI30	E-AB-F1137Q
		CD3	PE	OKT3	E-AB-F1001D
		CD4	FITC	RPA-T4	E-AB-F1109C
		CD8a	APC	OKT-8	E-AB-F1110E

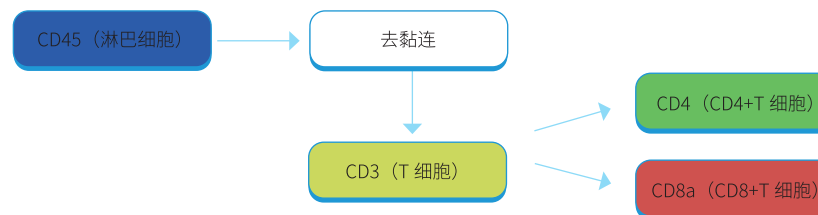
### 样本管设置:

目的	样本	设置
调电压	1	Black (空白管)
调补偿	2	加 CD45-EV450
	3	加 CD3-PE
	4	加 CD4-FITC
	5	加 CD8a-APC
Full Panel	6	加 CD45-EV450、CD3-PE、CD4-FITC、CD8a-APC

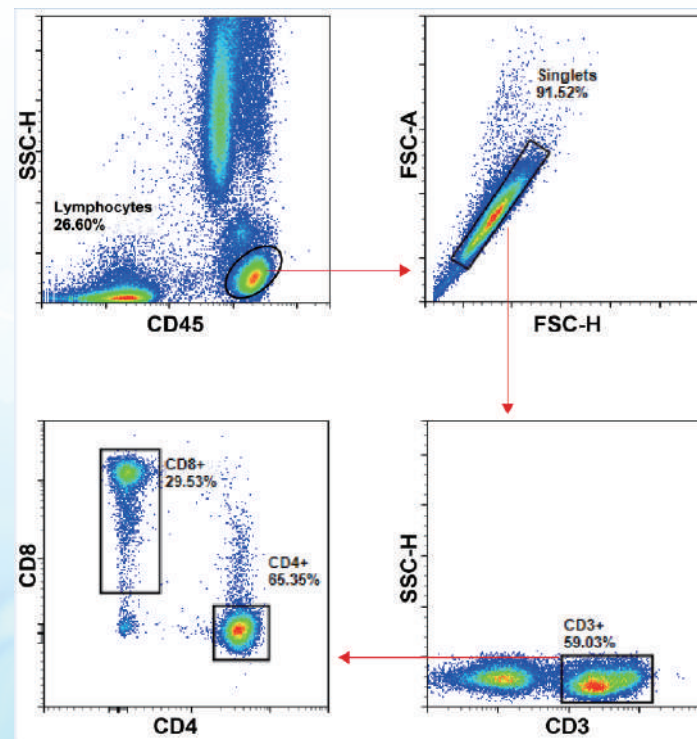
### 解析:

- ① 除APC和FITC、APC和EV450 之间不存在补偿外，其他荧光素间有溢漏，故建议新手设置单阳管用于调节补偿；
- ② CD45/CD3/CD4/CD8a 分群明显，无需同型对照或 FMO 对照；
- ③ 本实验取正常人全血验证，无生物学对照。

### 圈门路径:

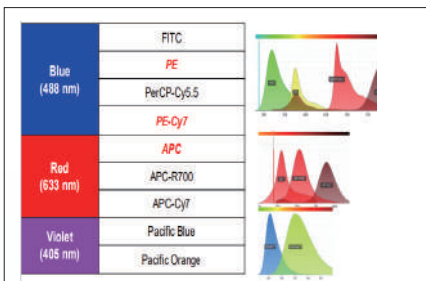


### 结果展示:

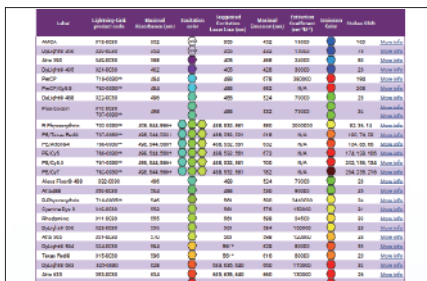


## Elabscience® 专业的流式配色服务

Elabscience® 为客户提供专业的免费配色服务，您只需要将您的流式实验指标（逻辑关系或参考文献、表达量高低）和流式细胞仪的基本信息（激光器、检测通道、滤光片信息）提供给我们的技术支持，我们会结合您的实验，提供专业的免费配色服务。



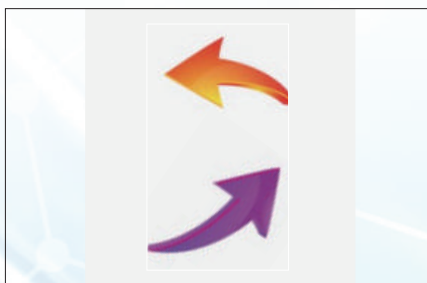
结合仪器可选通道选择最佳的荧光标记物



荧光染料图谱及荧光强度查询

细胞	抗原	密度
淋巴细胞	CD3	高
	CD4	高
	CD8	中
	CD19	中
	CD132	低

抗原表达强弱查询



抗原染料合理搭配

### 配色服务联系方式:

将您的信息提供给技术支持，我们将给您提供专业的免费配色服务。



技术电话: 027-65521719

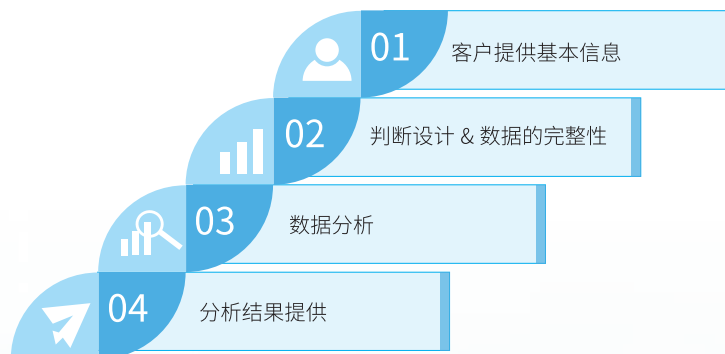


技术微信:



## Elabscience® 专业的流式数据分析服务

对于使用 Elabscience® 产品的客户，也可将 FSC 格式原始数据、指标逻辑关系提供给技术支持，我们可以为您提供专业的数据分析。



### Elabscience® 流式数据分析结果展示

