



---

# 流式细胞术的原理与应用

FACS: fluorescence-activated cell sorting

大型仪器中心 赵彤

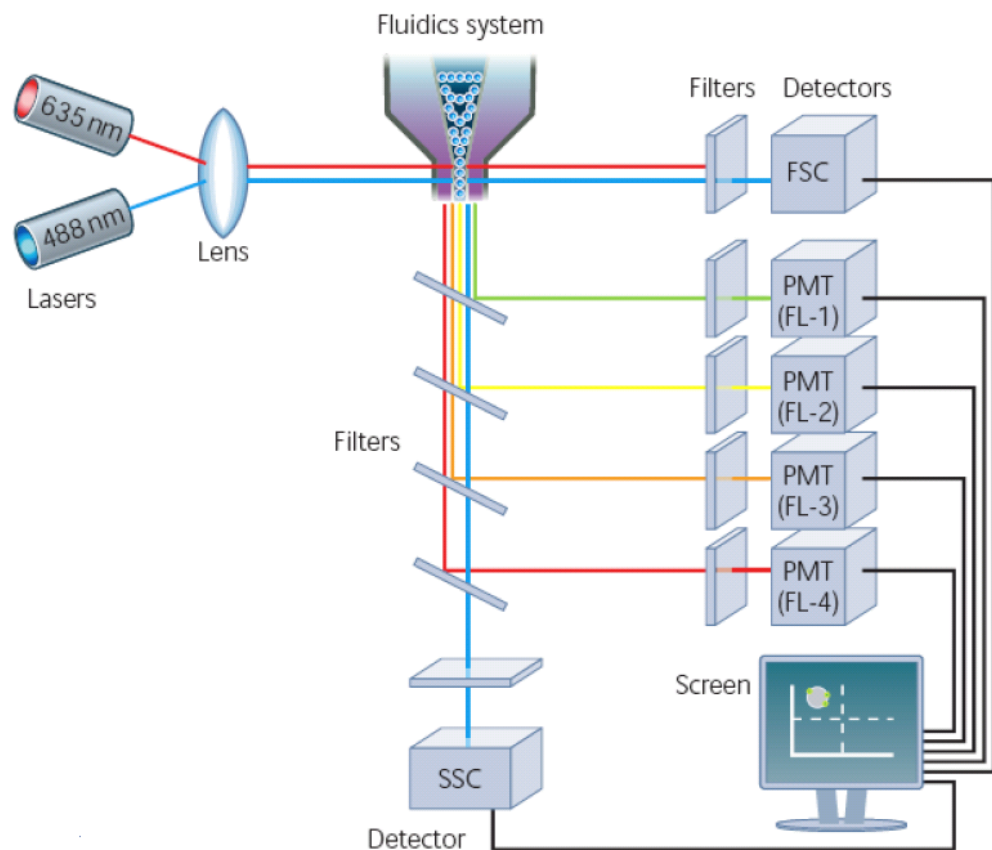
- 
- 
- 以**FACS Aria**为例讲解流式细胞术的原理
  - 样本制备和结果分析
  - 流式细胞术的应用



# 流式细胞术的原理

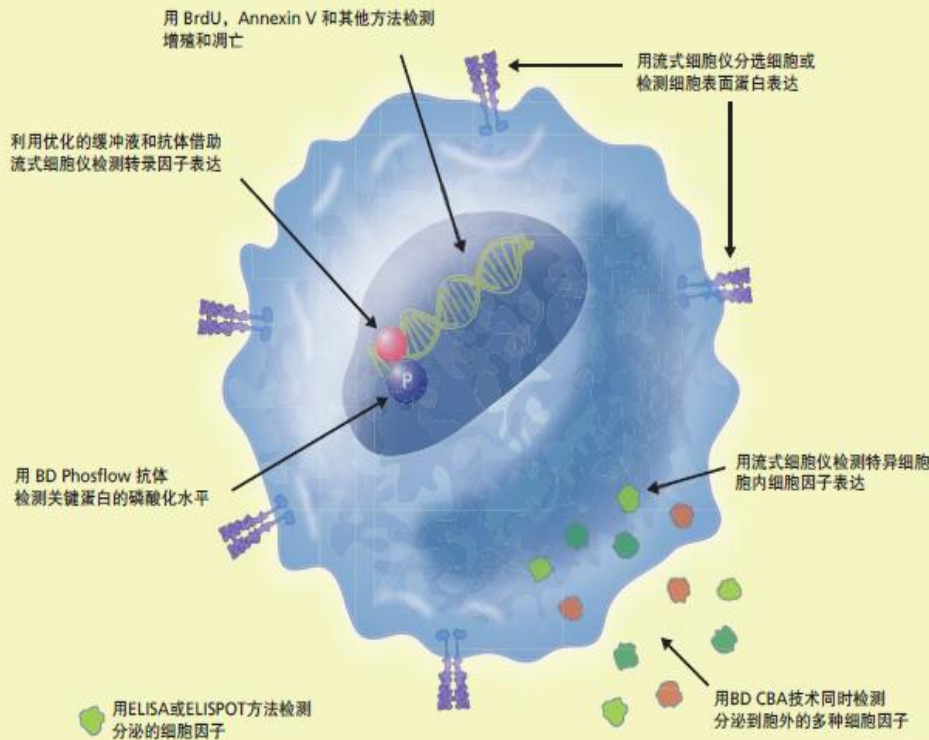
---

# 流式细胞术的原理



■ 利用**激光**激发高速匀速运动的带有各种**荧光标记的微粒**，并检测微粒由此产生的**散射光信号和荧光信号**来反应微粒的各个参数，并将特定性状的微粒**分选**出来，再进行分析或培养的技术。

# 流式细胞术的特点



- **研究对象：**细胞的群体信息（比例值、平均荧光强度）
- **分析速度快：**10万个细胞/秒
- **分选纯度高：**99%以上
- **可同时检测细胞的多种信息：**细胞膜（浆、核）



# BD FACS Aria

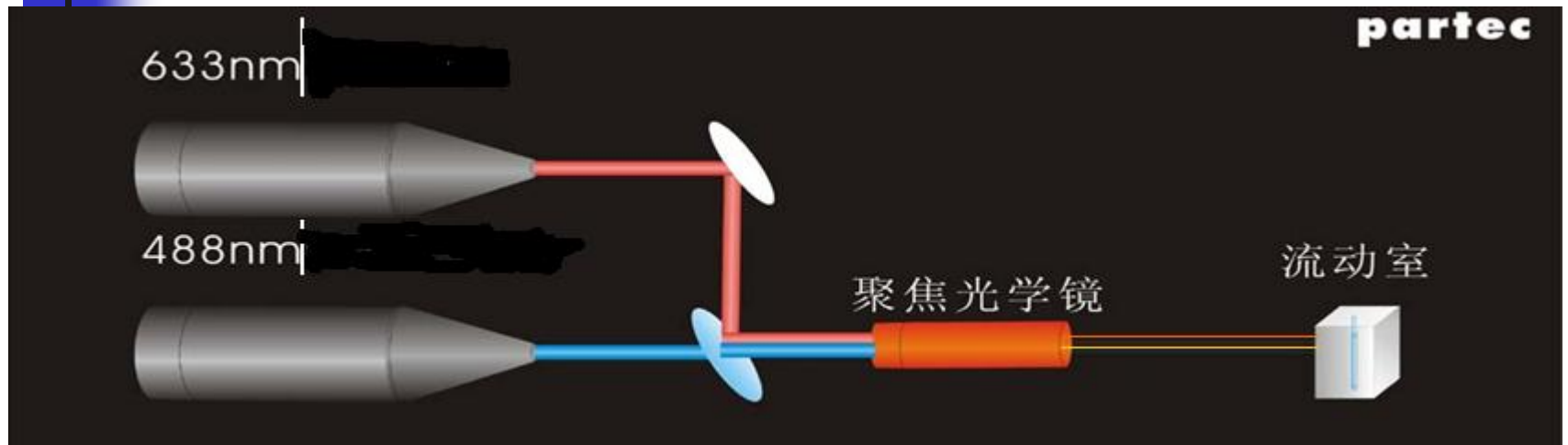


# 光路系统

---

- 激光器
- 荧光收集系统

# 光路系统：激光光源



- 已有激光器：488nm（蓝），633nm（红）、405nm（紫）
- 准备增加的激光器：375nm（紫外），561nm（橘红），等。

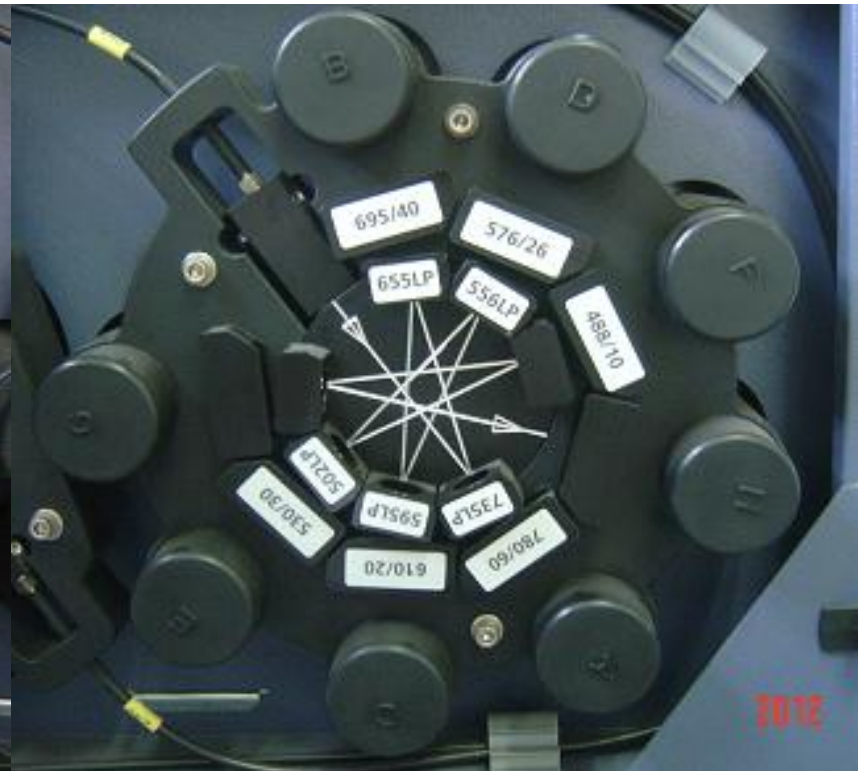


# 荧光信号收集系统



407nm

633nm

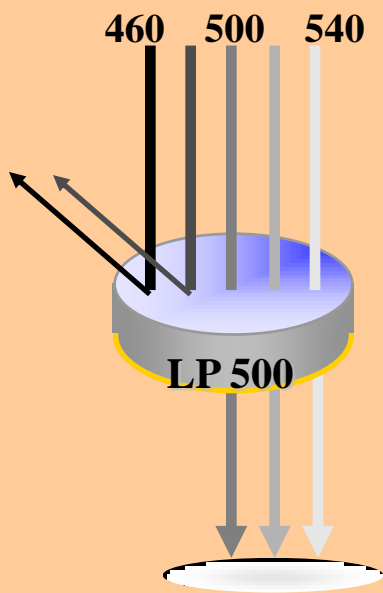


488nm

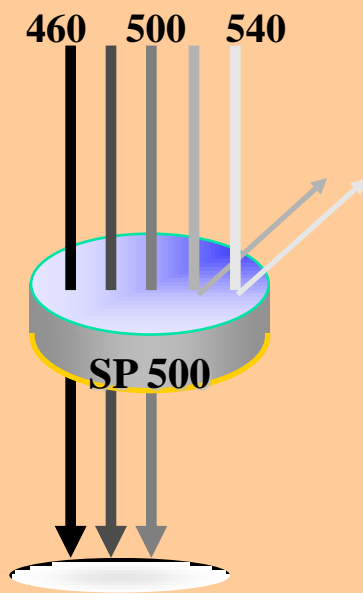
# 荧光信号收集系统

滤光片置于荧光探测器前，限定其接收不同的荧光范围

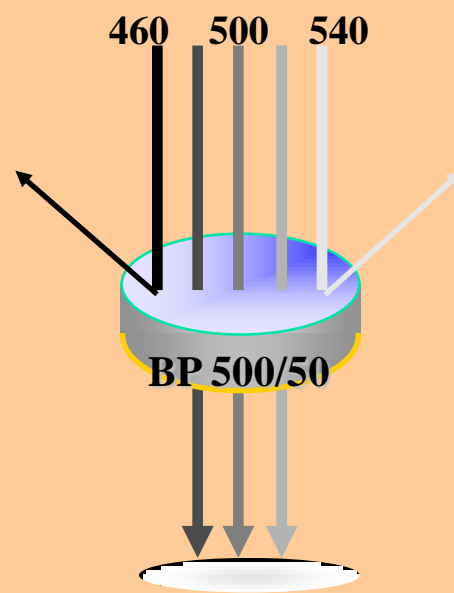
**Longpass(LP)**



**Shortpass(SP)**



**Bandpass(BP)**





# 光信号变成电信号

---

- 光电倍增管**PMT**：连接光路系统和计算机分析处理系统。
  - 把光学信号转换成电子信号
  - 通过一定比例进行信号放大

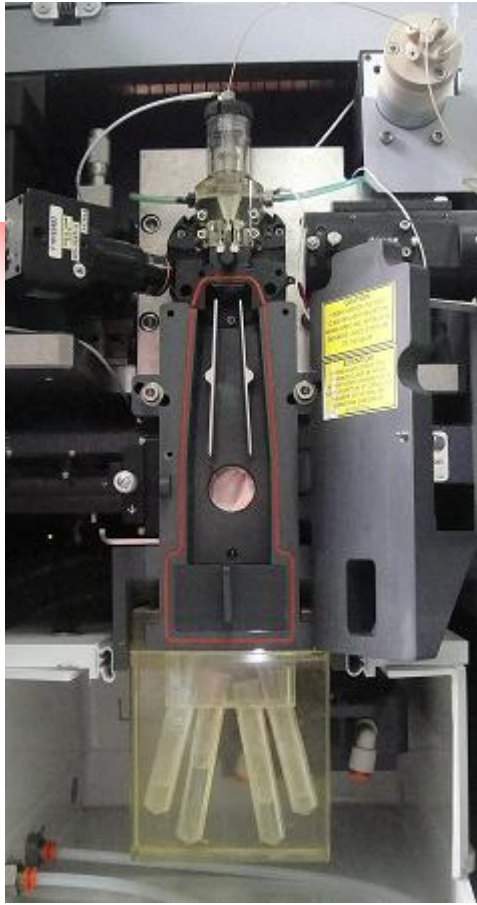
# FACS Aria 各通道的配置

检测器排列 (激光)	PMT	LP镜片	BP滤光片	可用染料
Octagon (488-nm blue laser)	A	735	780/60	PE-Cy7
	B	655	695/40 675/20	PerCP-Cy5.5 or PI PerCP
	C	595	610/20	PE-Texas Red
	D	556	575/26 585/42	PE or PI Alternative for PE/PI when using PE-Texas Red
	E	502	530/30	FITC
	F	—	488/10	Side scatter (SSC)
Trigon (633-nm red laser)	A	735	780/60	APC-Cy7
	B	—	660/20	APC
Trigon (407-nm violet laser)	A	502	530/30	Alexa Fluor 430
	B	—	450/40	Cascade Blue, Pacific Blue, DAPI, Hoechst, Alexa Fluor 405

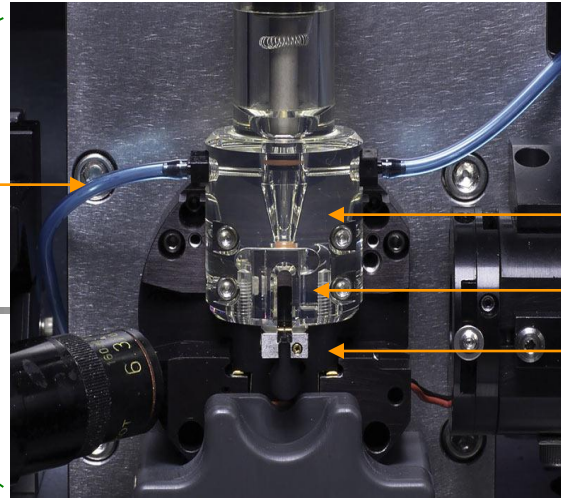




# BD FACS Aria



鞘液  
进入

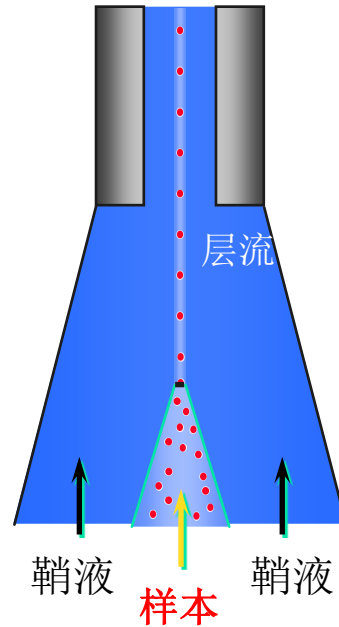


样品进入

液滴振荡器

激光照射点

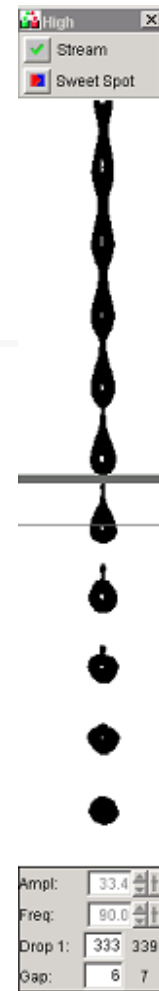
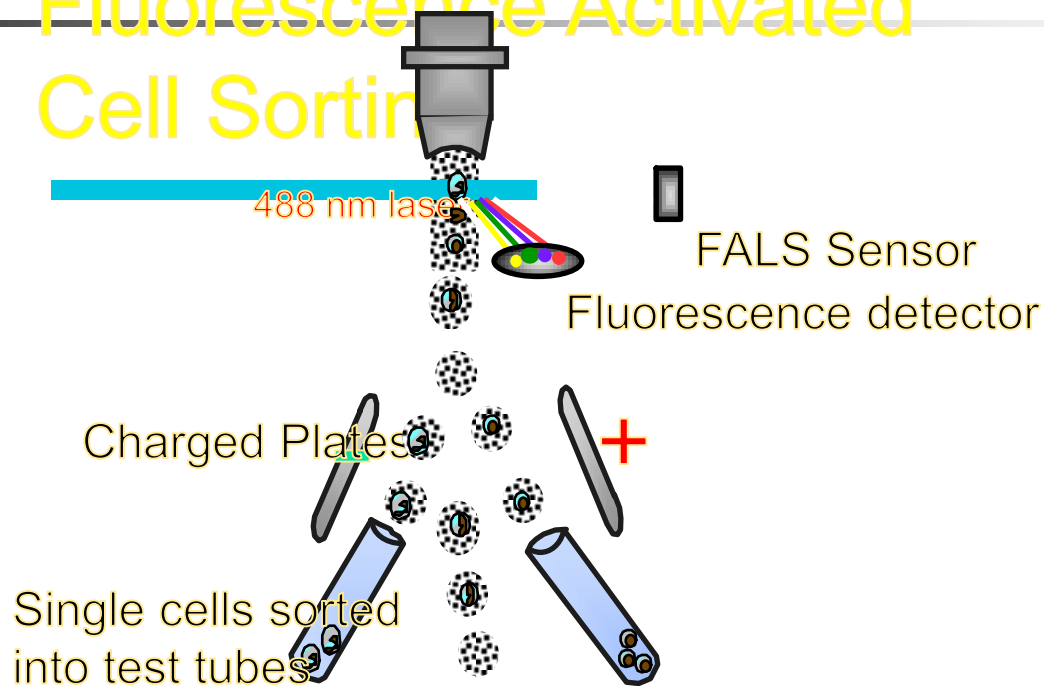
喷嘴



■ **液流驱动系统：**  
鞘液（PBS）包绕着单行排列的细胞依次高速通过流动室，而激光聚焦于流动室中心的样本流上，随后经检测的样本和鞘液流向废液桶。

# 流式细胞术分选的原理

## Fluorescence Activated Cell Sorting

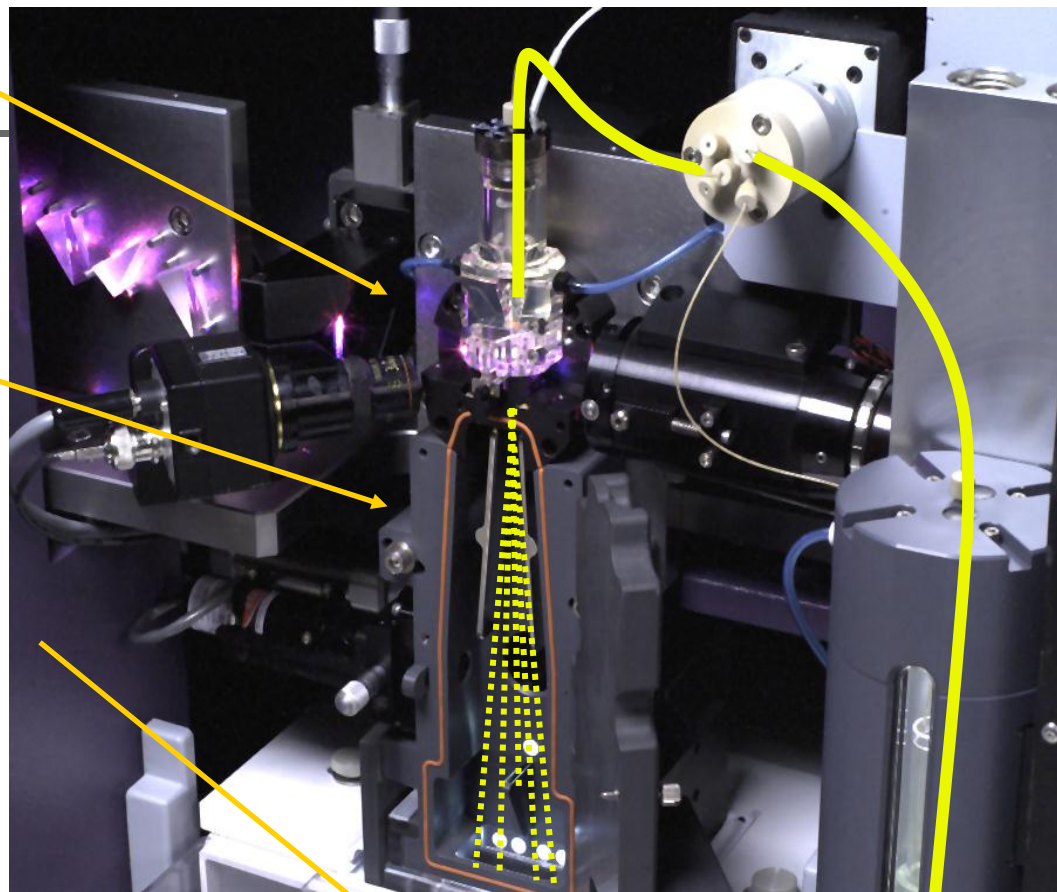


喷嘴处的高频振荡器，使液流形成上段连续、下段独立的液滴，系统判断断点处的液滴是否是目标细胞，应分选到哪一路，给液滴带上相应的**电荷**，液滴经过电压场后，发生**偏转**，落入到相应的收集管中。

1. 流动室

2. 电偏转板

3. 细胞收集器

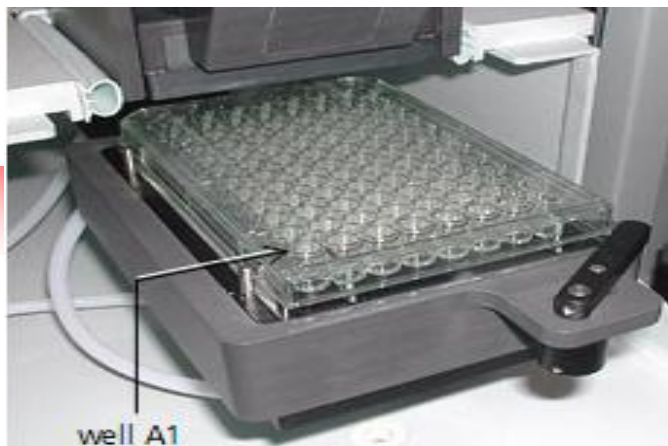




# 分选的收集系统多样



- 二路或四路分选装置：  
5ml管、15mL管
- **ACDU**装置：  
微孔板：6、8、24、  
96、384 孔、载玻片



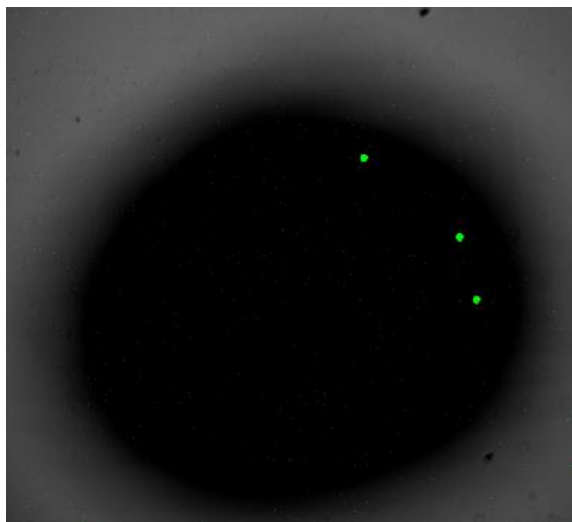
FITC Sort: Sort Layout 001

Device: 96 Well - Falcon    Precision: Single Cell    Target Events: 20    Save Conflicts:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2
B	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2
C	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2
D	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2
E	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2
F	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2
G	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2
H	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2	<input checked="" type="checkbox"/> FITC : 2

Sort    Pause    View Counters

微孔板任意位置上分选任意数量的细胞，每孔可分选**1~10**万个细胞，做到精确的“点对点”分选



绿色荧光微球**sort**后，在**confocal**下观察（李春立老师观察）



## 以BD FACS Aria为例



液流车：鞘液桶、废液桶、水桶、次氯酸钠桶



# 样本制备和结果分析

---



# 检测的微粒样本

- 微粒：只要是一定大小的**单细胞悬液**均可分析
  - 动物细胞、微生物（大肠杆菌、酵母菌）、植物细胞（核）、吸附蛋白beads
- 样本要求：
  - $10^6$ （大细胞、肿瘤细胞） $\sim 1 \times 10^7$ （菌）个/ml，约0.5~1ml
  - 300目筛网过滤

# 标记抗体的步骤

膜表面抗原染色  
(荧光素标记抗体+样本)



溶血  
(溶血素, 去红细胞)



洗涤



固定与细胞膜打孔



细胞内抗原染色  
(荧光素标记抗体)



洗涤

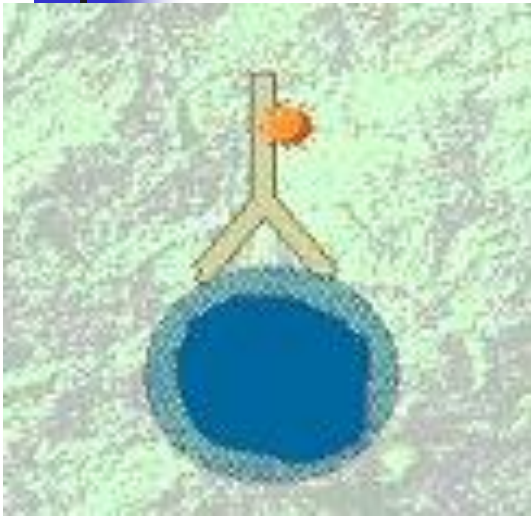


上机

细胞膜表面标记

细胞内或核内抗原标记

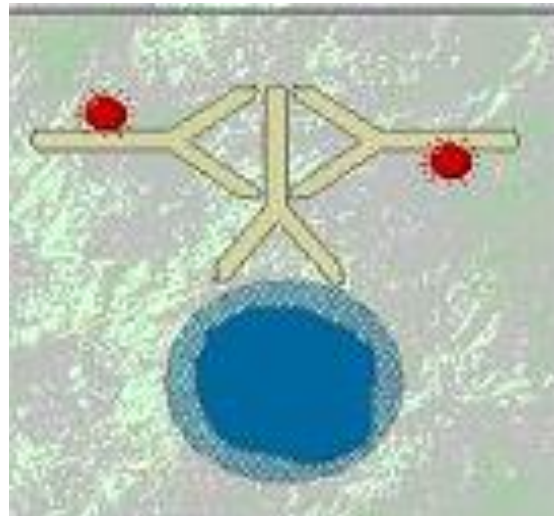
# 标记荧光素偶联抗体的方法



## 直接标记法

荧光素偶联的抗体  
+抗原

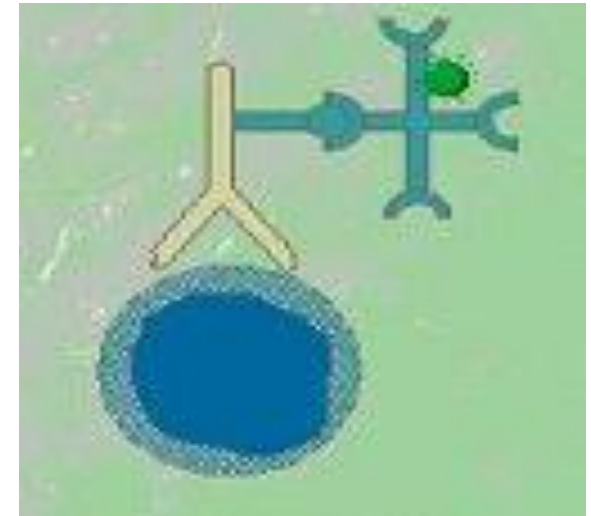
■ 特异性强，操作步骤少



## 间接标记法

1、未标记的一抗  
+抗原

2、荧光素偶联的二抗  
■ 多通道分析时，节约抗体种类

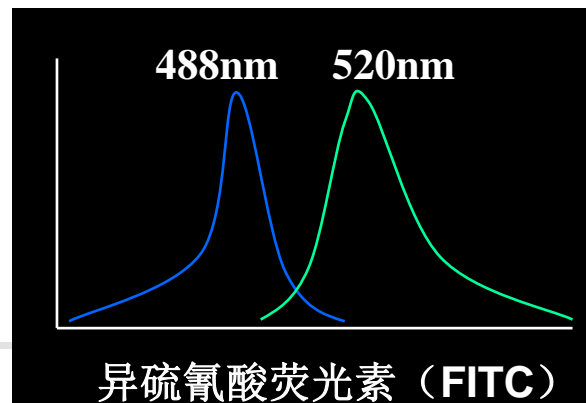


## 间接标记-生物素染色法

1、生物素偶联一抗+抗原

2、荧光素偶联链霉亲和素+生物素

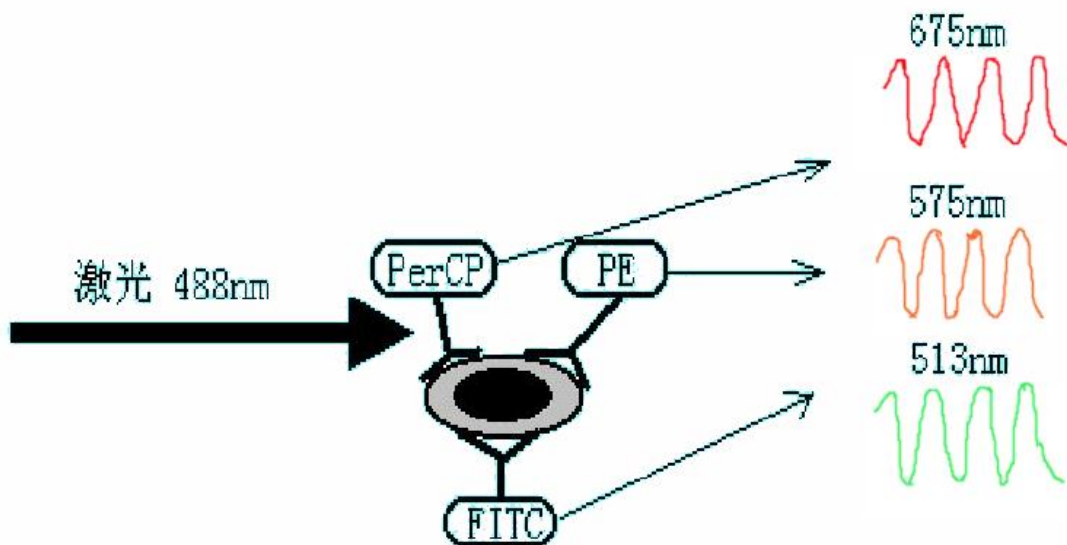
# 常用荧光染料



蓝色激光 (L1) 488nm	绿色	FITC	Alexa Fluro 488	
	黄色	PE	PI	
	红色	PE-Texas Red	PE-Cy5	PerCP
	远红	PerCP-Cy5.5		
	红外	PE-Cy7		
红色激光 (L2) 633nm	红色	APC	Alexa Fluro 647	
	红外	APC-Cy7		
紫色激光 (L3) 405nm	蓝色	Alexa Fluro 405	Pacific Blue	
	绿色	AmCyan	BD Horizon V500	



# 荧光素的选择



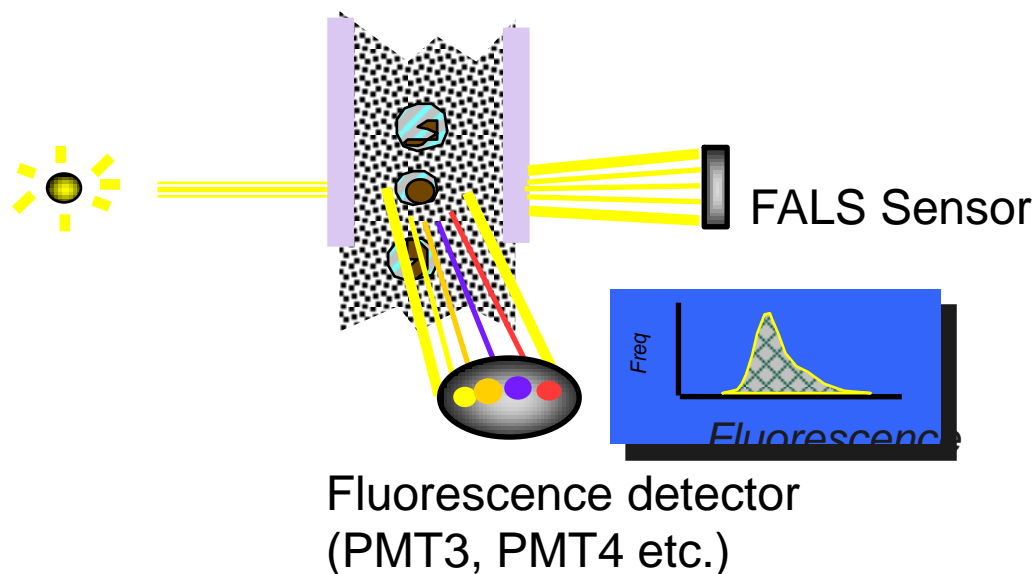
## ■ 选择正确的荧光素：

- 多荧光染料同时使用时要选择光谱重叠少（不同荧光通道）的染料
- FITC、GFP、CFSE荧光素的荧光通道（PMT）相同，不能同时标记一个样品

## ■ 荧光素强度： PE > FITC > PerCP

- PE最强，适用于弱表达抗原
- FITC最便宜，适用于强表达抗原，适用范围广

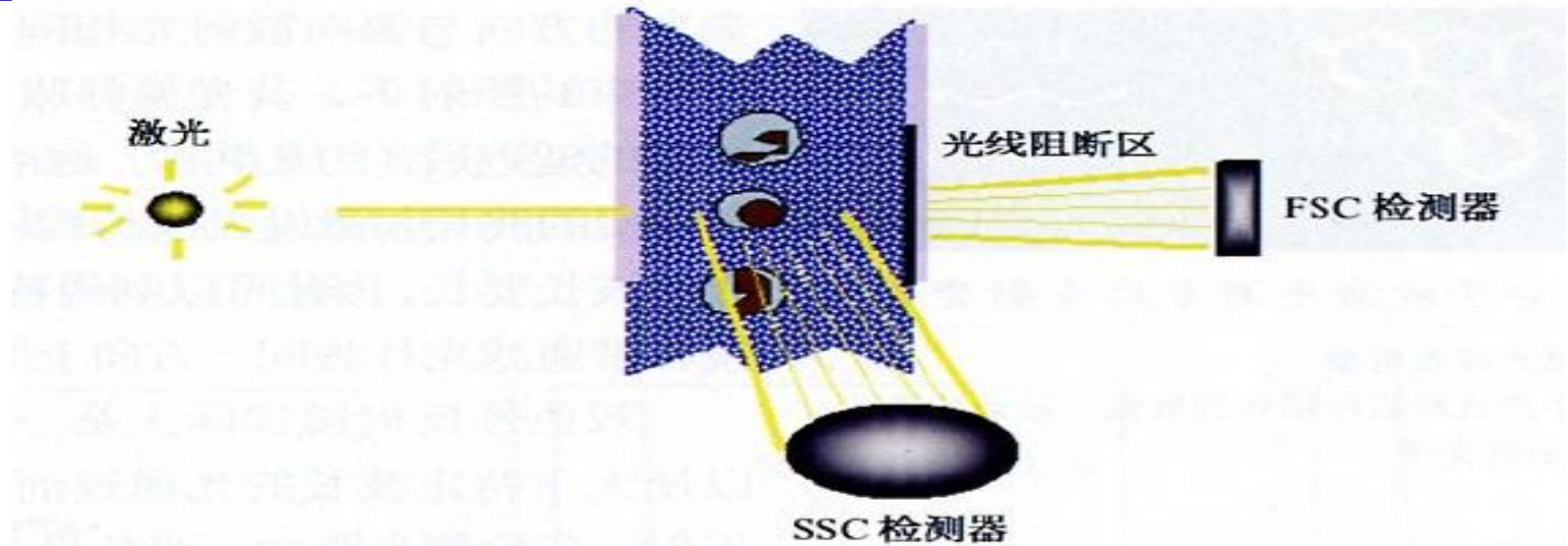
# 信号检测



- 散射光信号  
(FSC、SSC) :  
物理参数

- 荧光信号:  
非特异荧光 + 特异荧光

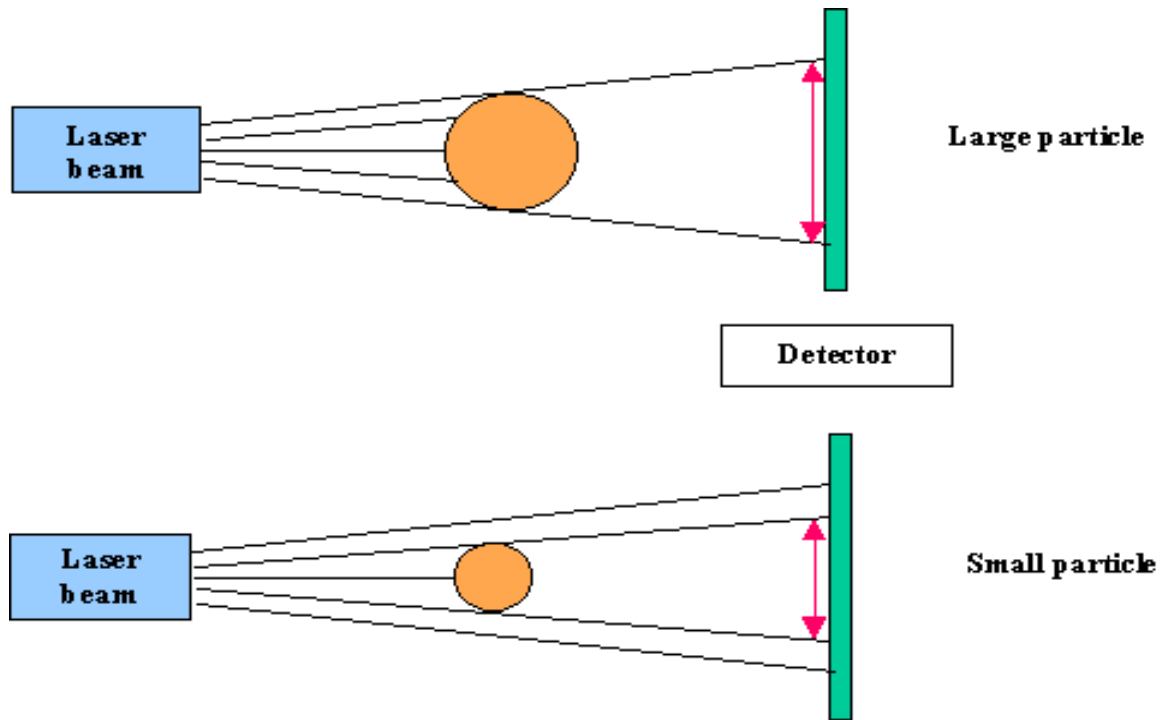
# 散射光信号



前向角和侧向角散射光检测原理

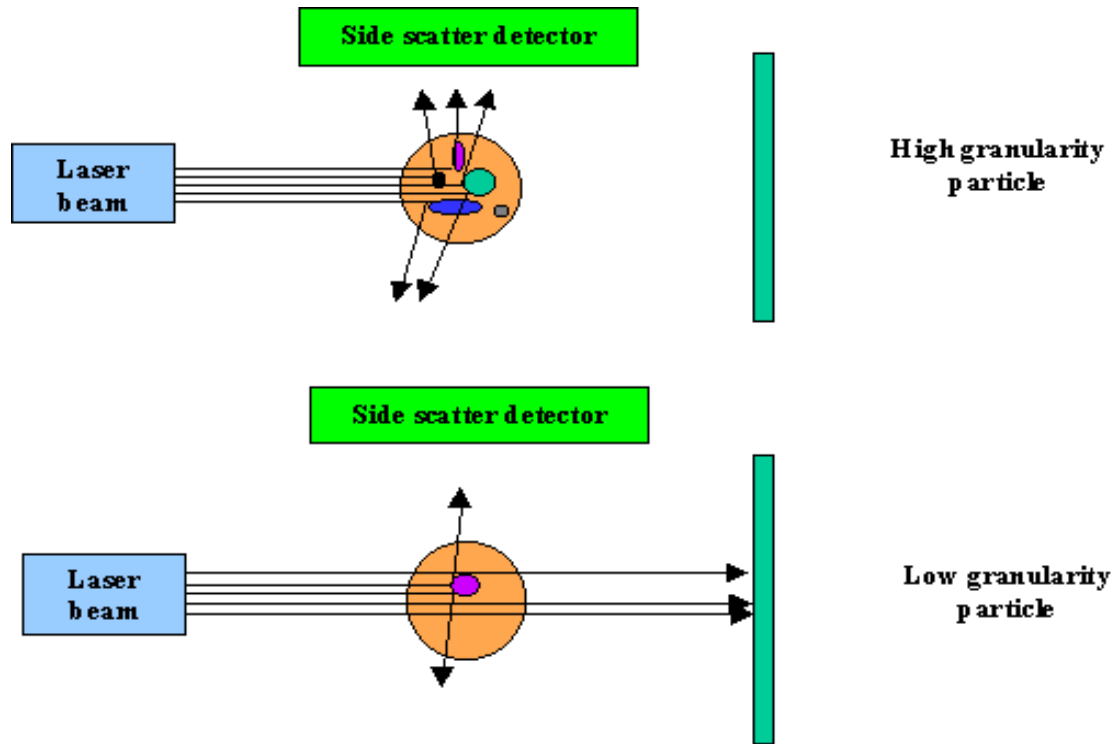
- 前向角散射光信号 (FSC , Forward Scatter ) : 与激光方向同轴
- 侧向角散射光信号 (SSC, Side Scatter ) : 与激光束垂直

# 前向散射光信号 (FSC)



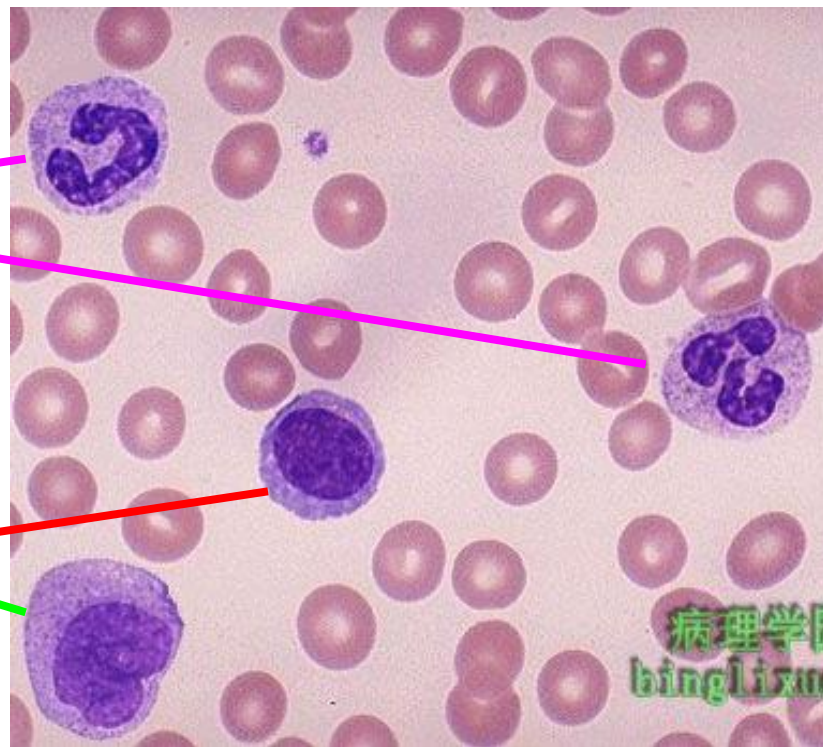
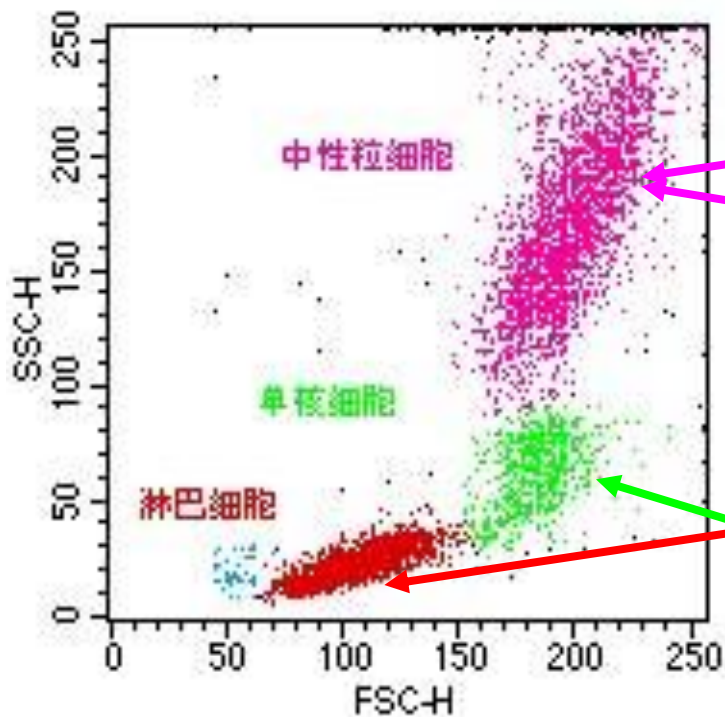
前向散射光信号 (FSC )：与细胞**相对**大小和体积相关

# 侧向散射光信号 (SSC)

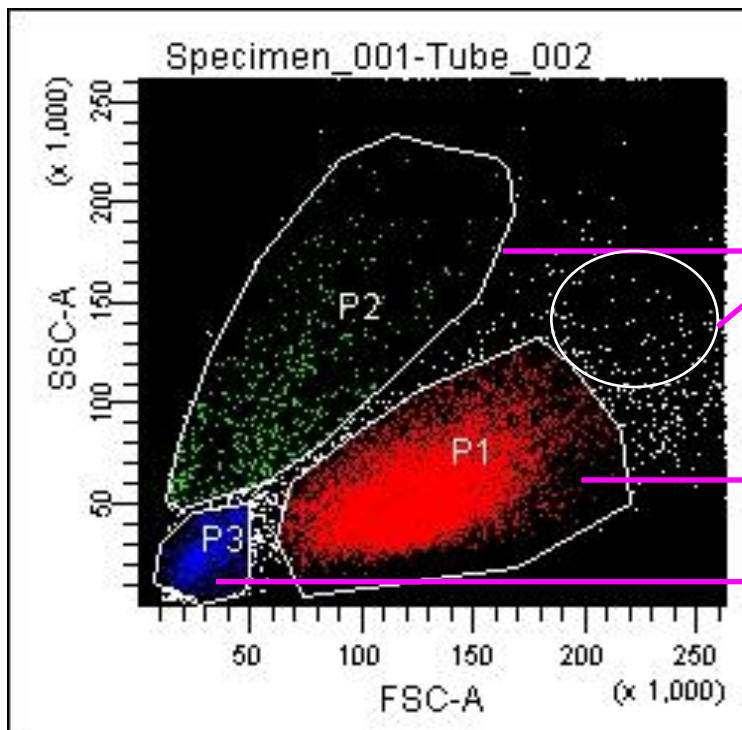


侧向角散射光 (SSC) :代表细胞内部的精细结构变化, 对胞膜、胞质、核膜变化更敏感

# 外周血细胞散射光双参数点图



# 根据散射光判断细胞状态



凋亡或粘连的细胞

正常细胞

碎片或坏死的细胞

- 死细胞对光的散射能力发生变化。

- 细胞坏死时，FSC和SSC会同时出现强度增加，然后迅速下降的情况，这是因为细胞起始时膨胀，然后质膜破裂，内容物释放。



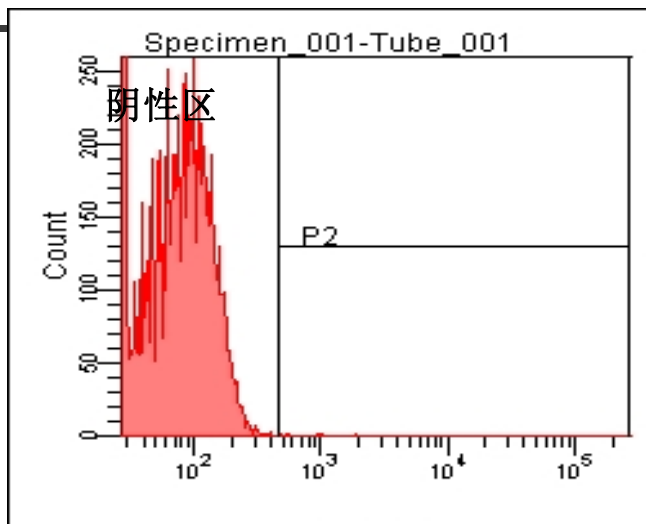
# 信号的显示方式

---

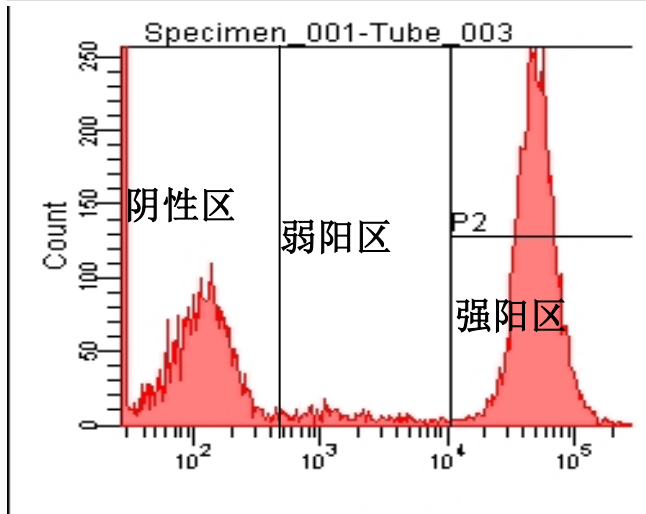
- 单参数直方图 (Histogram)
- 双参数：
  - 二维点图 (Dot Plot)
  - 等高线图 (Contour Plot)
  - 二维密度图 (Density Plot)
- 三维图 (3D Plot)



# 单参数直方图 (Histogram)



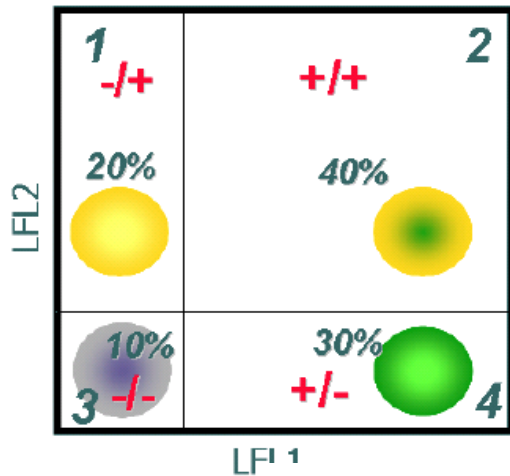
阴性  
对照



实验  
样本

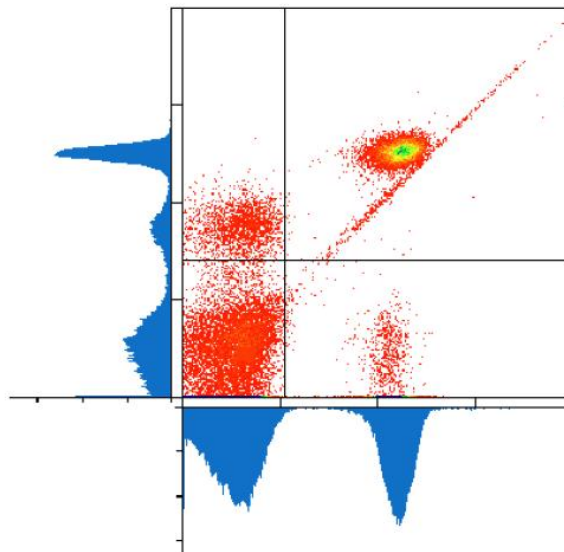
- **横坐标:** 荧光信号的强弱 (相对强度), 反映了细胞抗原的表达含量
- **纵坐标:** 细胞相对数量, 此种荧光强度的细胞在样本中所占比例

# 二维点图 (Dot Plot)



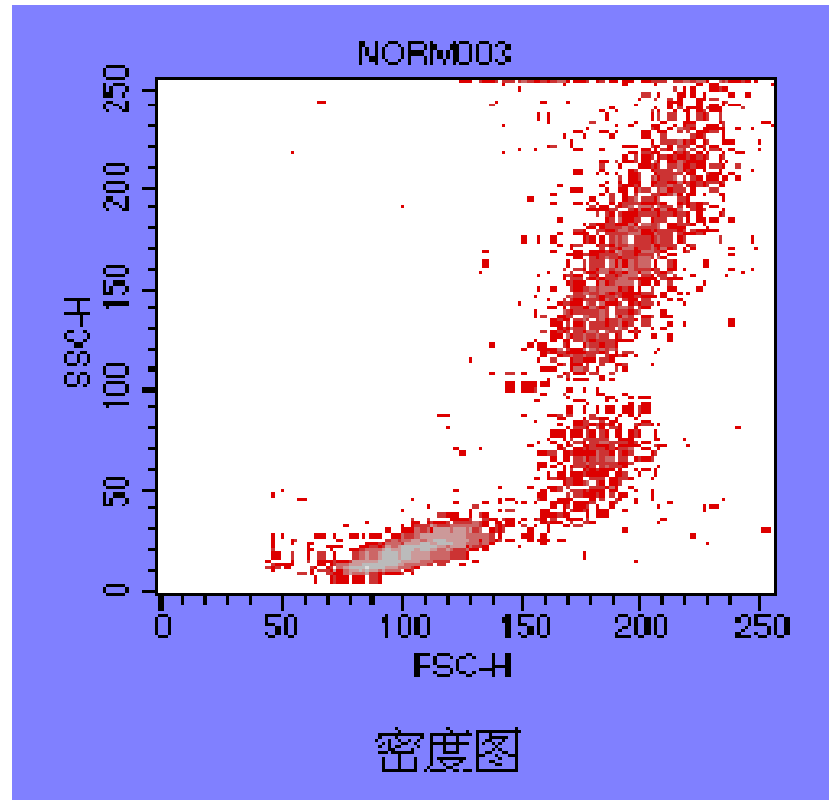
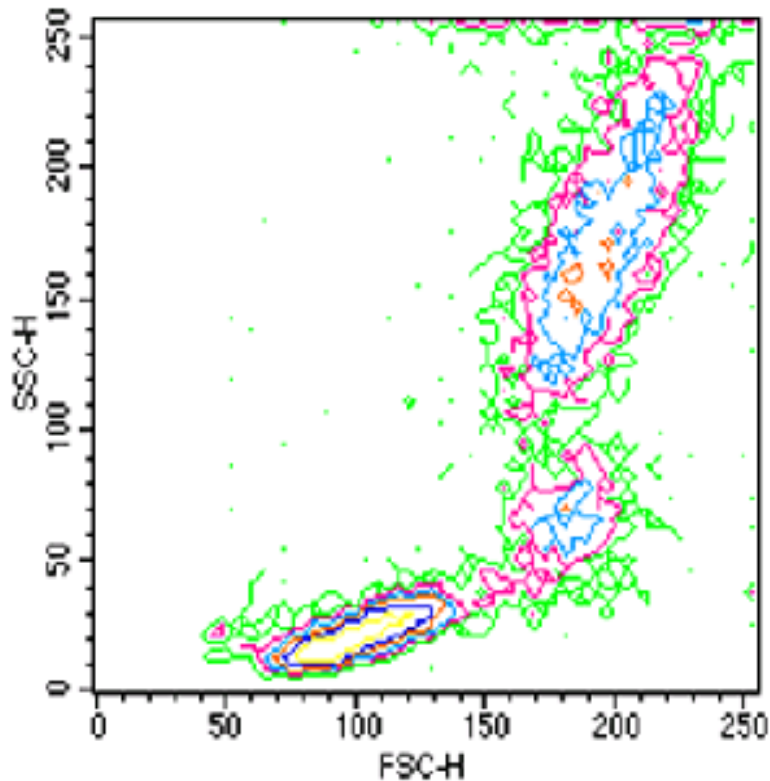
## ■ 二维图

- 每个点代表一个细胞
- 任意一个二维图都可以看作是两个单参数直方图在两个方向上的叠加



- 四个象限：分别显示双阴性、双阳及两个单阳性的细胞群体

# 等高图和密度图





---

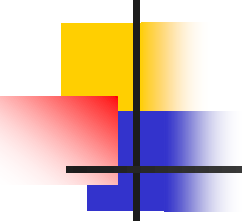
# 流式细胞仪的应用



# 流式细胞仪的应用

---

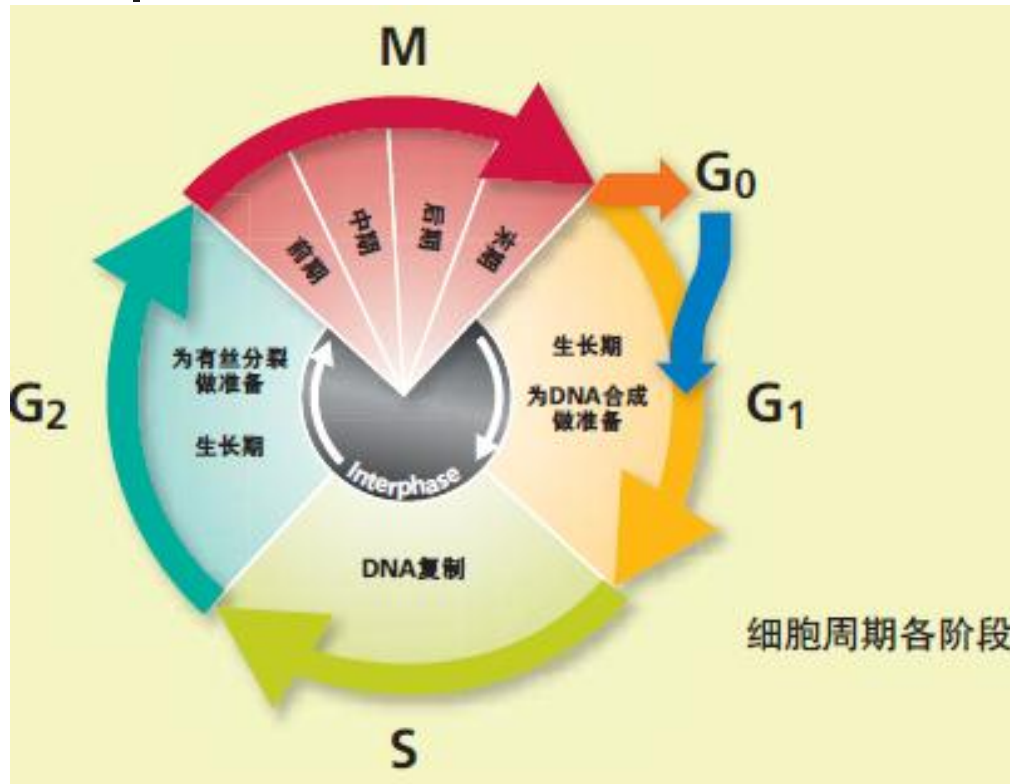
- 细胞DNA含量的检测：周期、倍体的分析
- 细胞凋亡的检测
- 细胞增殖的检测
- 细胞融合的检测
- 胞内活性氧水平（**ROS**）的检测
- 细胞因子的检测
- 报告基因的检测
- 荧光共振能量转移(**FRET**)的检测



---

# 细胞DNA含量的检测 ——周期、倍体的分析

# 细胞DNA含量的检测 -周期分析

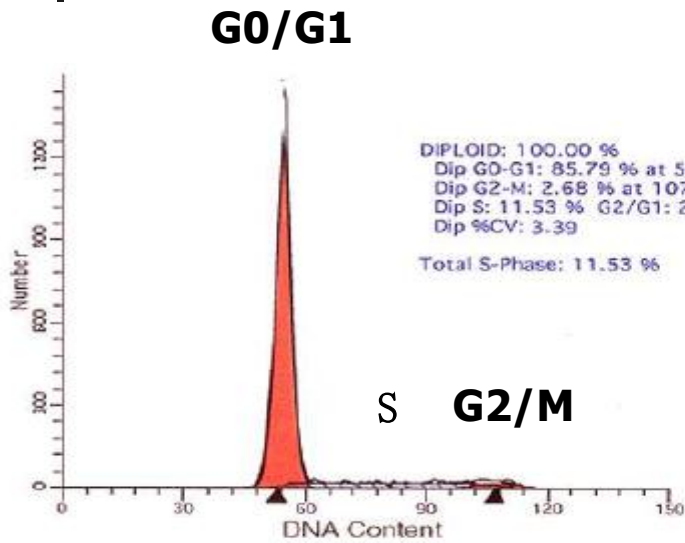


■ **G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期:** 2n

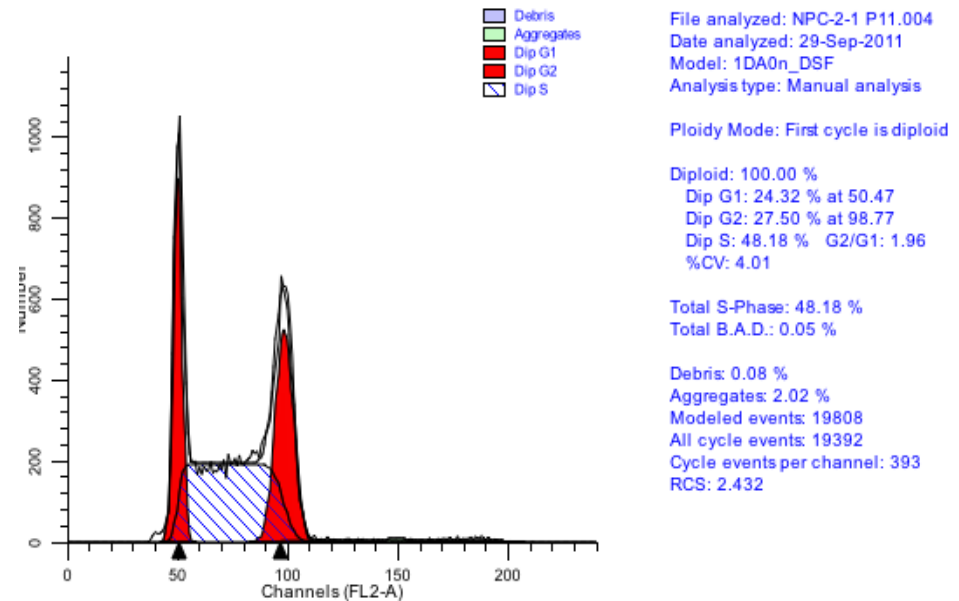
■ **S期:** 2n~4n

■ **G<sub>2</sub>/M期:** 4n

# 细胞DNA含量的检测 -周期分析



正常人细胞DNA

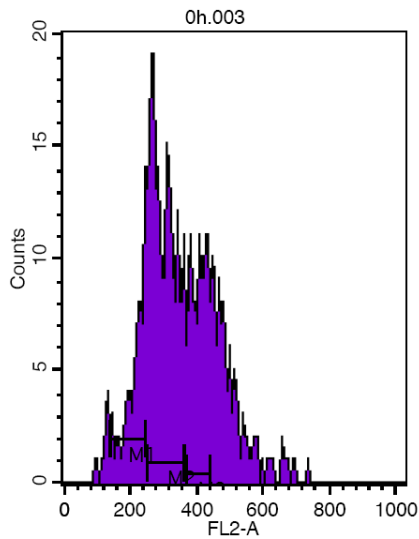


胚胎干细胞ES

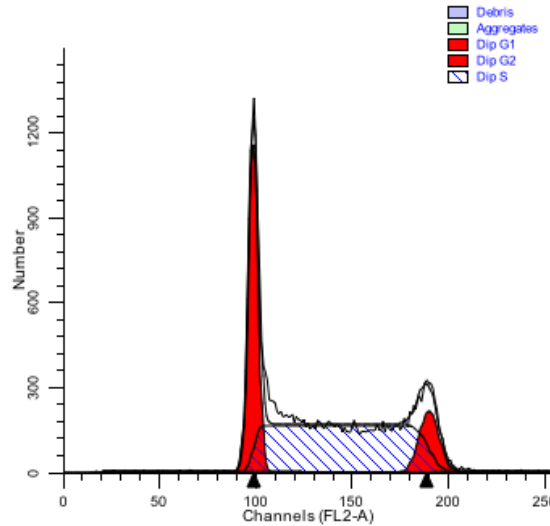
■ **PI:** 对DNA进行染色。 **Modfit**分析



# 检测DNA含量时需要注意的几点



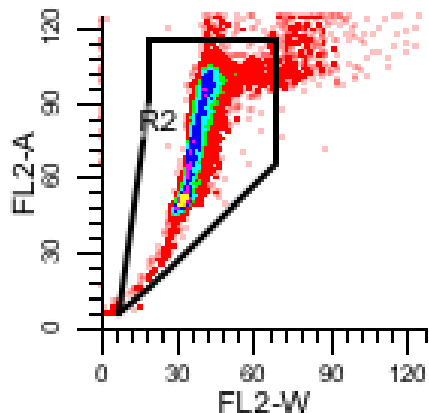
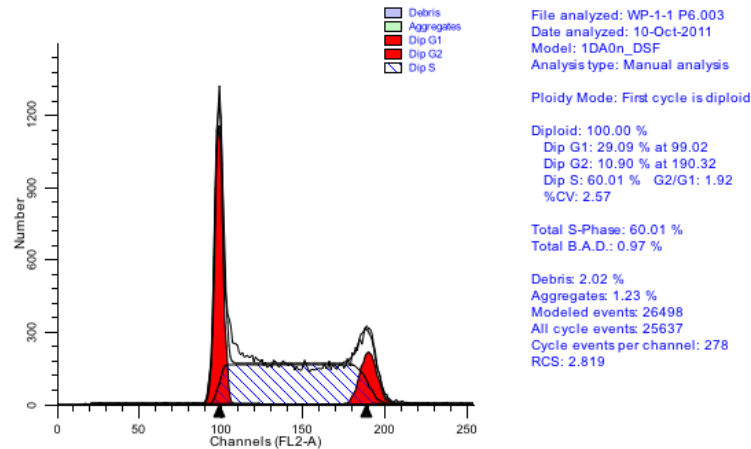
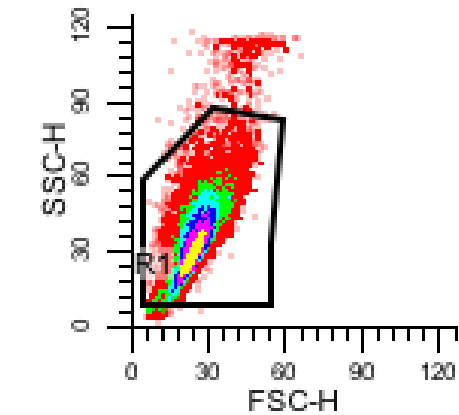
失败的染色



DNA含量测定  
modfit分析

- 固定和通透细胞膜：  
70%乙醇（缓慢加入）
- RNase充分去除RNA
- PI在37℃充分染色，  
10min

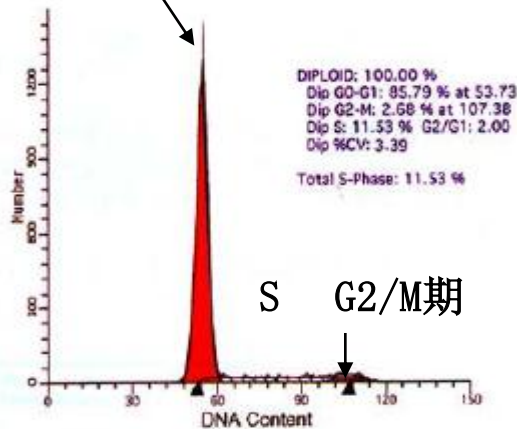
# 检测DNA需要排除粘连细胞



- **FSC-SSC**圈目标细胞
- **FL2-W**排除粘连的两个二倍体细胞
- 降低上样速度，避免将相邻两个细胞当作一个细胞
- 滤网过滤

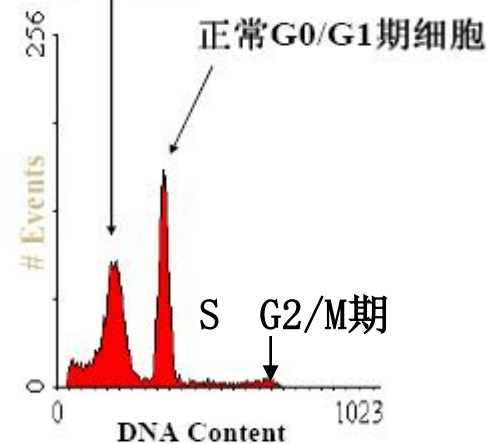
# 细胞凋亡的检测

正常G0/G1期细胞



正常的细胞周期图

凋亡细胞

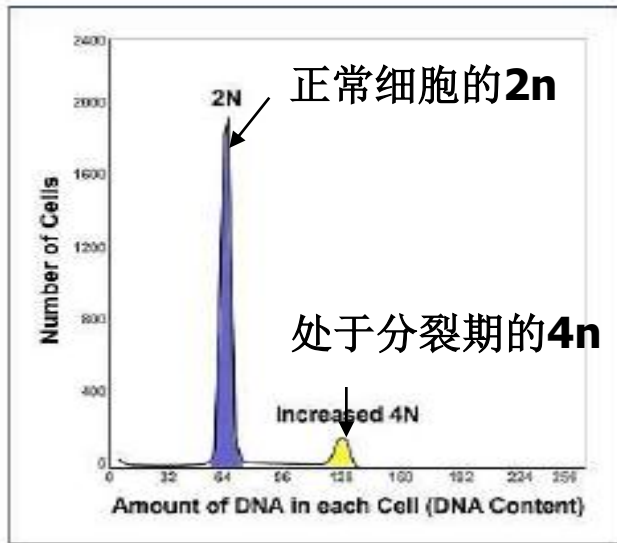


凋亡细胞的细胞周期图

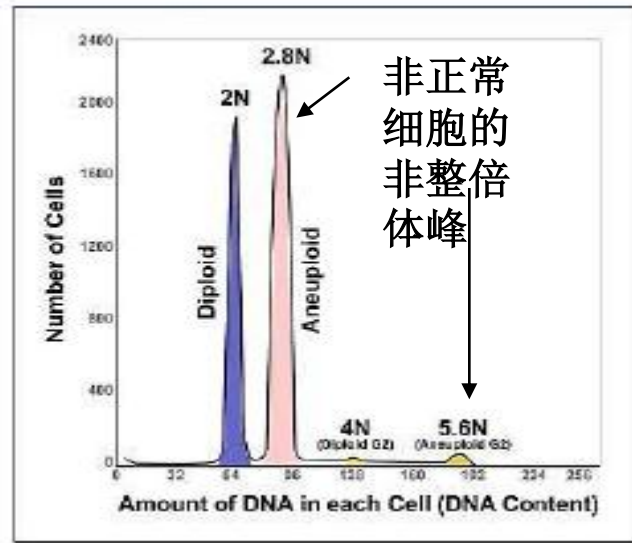
凋亡后期，细胞膜的通透性增大，DNA降解，降解产生的核小体DNA片段从细胞中逸出，所以，**凋亡细胞比活细胞含有更少的DNA**，会在正常细胞G0/G1峰之前出现凋亡峰（**sub-G1峰**）。

但PI染色法证明凋亡的特异性低，一般还需其他结果同时证明。

# 肿瘤细胞异倍体



正常的细胞周期图



肿瘤细胞异倍体图

由峰图出现非整倍体可以判断细胞出现了异常。但是，由峰图是整倍体不能判断细胞是正常的，还要结合其他检测结果综合作出判断。



# DNA和蛋白染色方法的不同

---

## ■ DNA染色后，一定不要洗涤

### ➤ 原因

- 很多DNA染料本身不发光，只有结合到DNA上才能发出荧光（PI）
- DNA和染料的结合不是牢固，洗涤会丢失染料

## ■ 蛋白染色后，必须洗涤

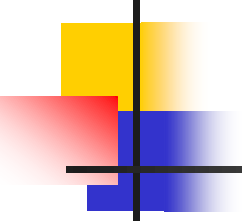
### ➤ 原因

- FITC等染料本身发光，必须洗掉非特异性结合
- 抗原与抗体结合牢固，洗涤不会丢失特异性结合



---

# 细胞凋亡的检测

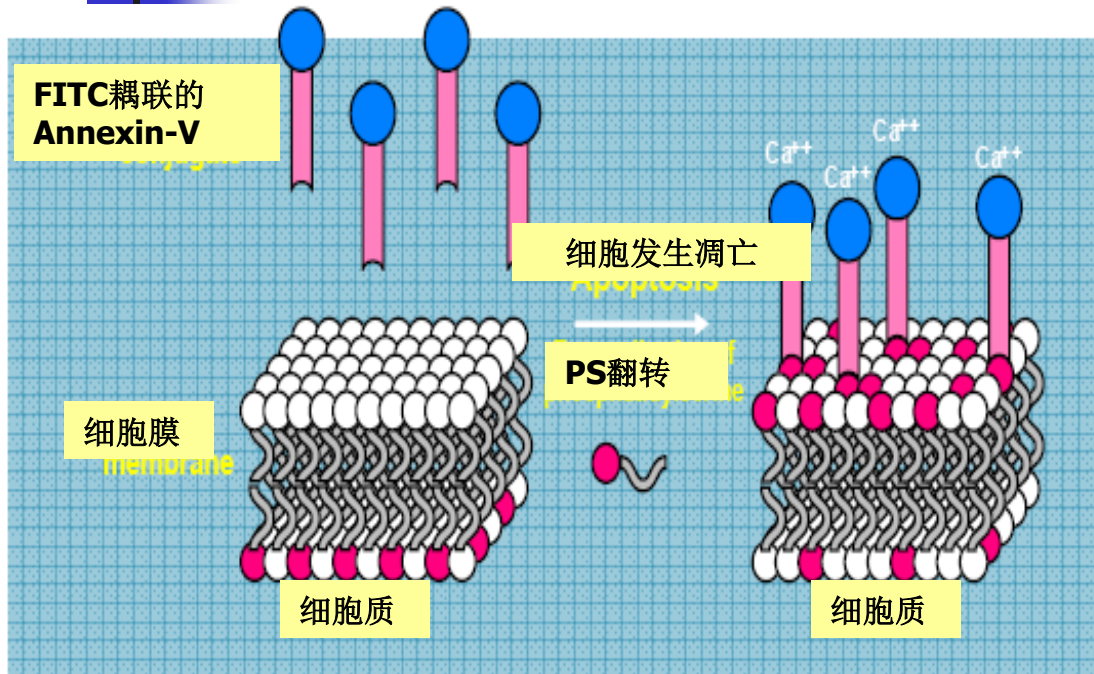


# 细胞凋亡的检测

---

- 凋亡相关**细胞膜**变化的检测
- 凋亡相关**线粒体膜**变化的检测
- 凋亡相关**酶活性**的检测
- 凋亡相关**DNA**片段的检测

# 早期凋亡-细胞膜检测： Annexin V/PI双染色法



磷脂酰丝氨酸 (PS)：凋亡早期细胞的PS可从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面，暴露在细胞外环境中。

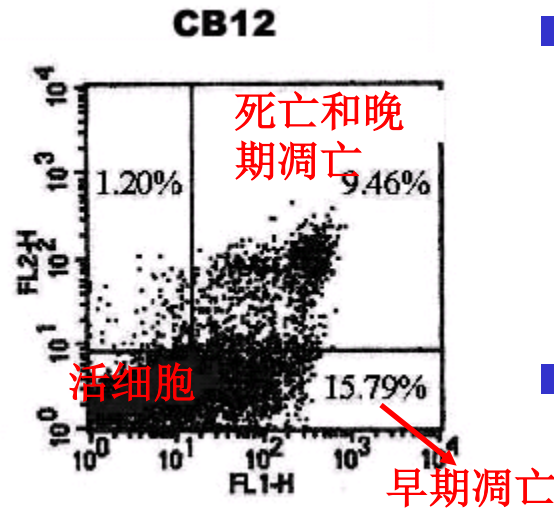
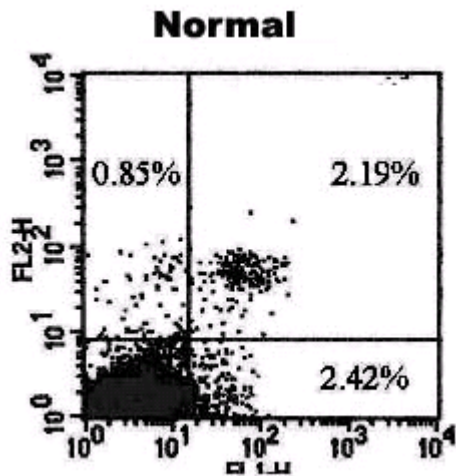
**Annexin-V**：一种Ca<sup>2+</sup>依赖性磷脂结合蛋白，能与PS高亲和力特异性结合。将Annexin-V进行荧光素标记，检测细胞凋亡的发生。但不能区分凋亡和死细胞。

**PI**：区分凋亡细胞和坏死细胞。PI可与细胞内的DNA结合。活细胞或凋亡时PI不能自由通过细胞膜，细胞死亡时，PI才能通过细胞膜与DNA结合。



# 细胞膜检测:

## Annexin V/PI双染色法

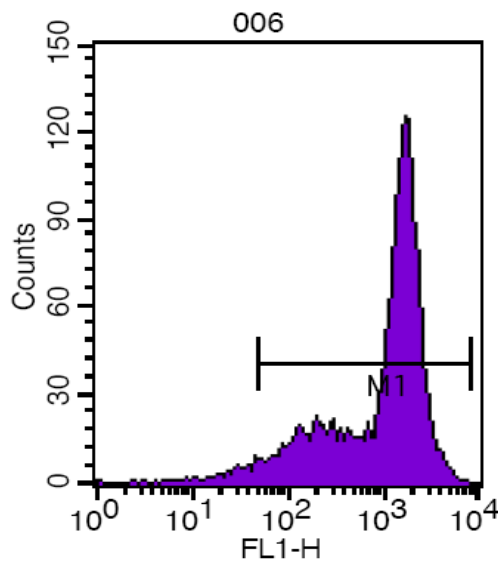


- 活细胞:  
annexinV<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>
- 早期凋亡:  
annexinV<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>
- 死亡和晚期凋亡:  
annexinV<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>

新功能基因**CB12**质粒转染的**293T**细胞明显促进细胞凋亡

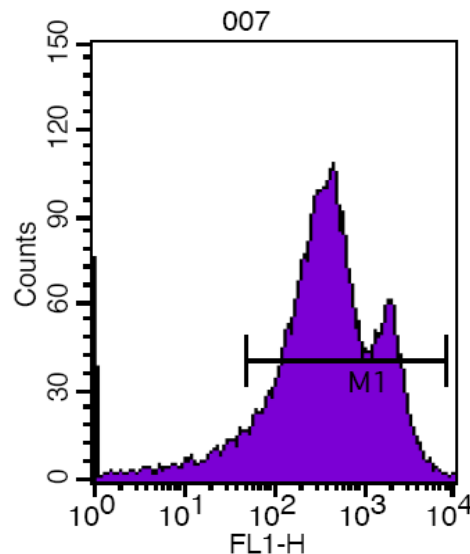
**FL1:FITC-annexinV, FL2:PI**

# 线粒体膜电位检测 -Rhodamine123染色法



正常细胞:

**Mean: 1277.29**



处理组: 平均荧光强度下降,  
线粒体膜电位下降

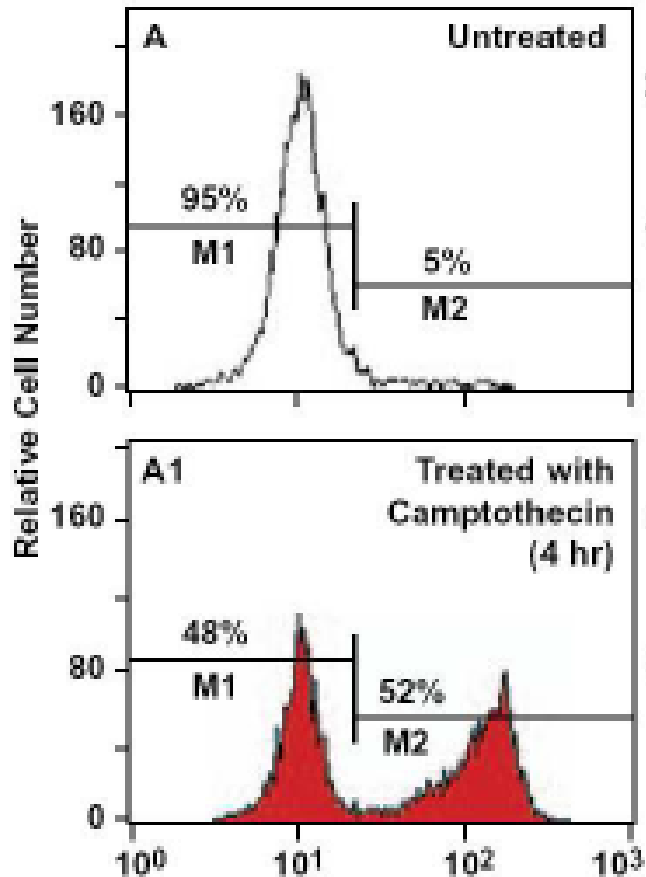
**Mean: 691.66**

- **Rhodamine123**的荧光对线粒体膜电位非常敏感。
- **Rhodamine123**是一种亲脂性阳离子荧光染料,能顺利通过活细胞的细胞膜和线粒体膜,进入细胞后可以选择性的富集在线粒体上。
- 当细胞凋亡时,线粒体外膜的通透性选择性增加,会导致线粒体膜电位下降,反映膜电位的荧光强度下降。

# 凋亡早期相关酶活性的检测

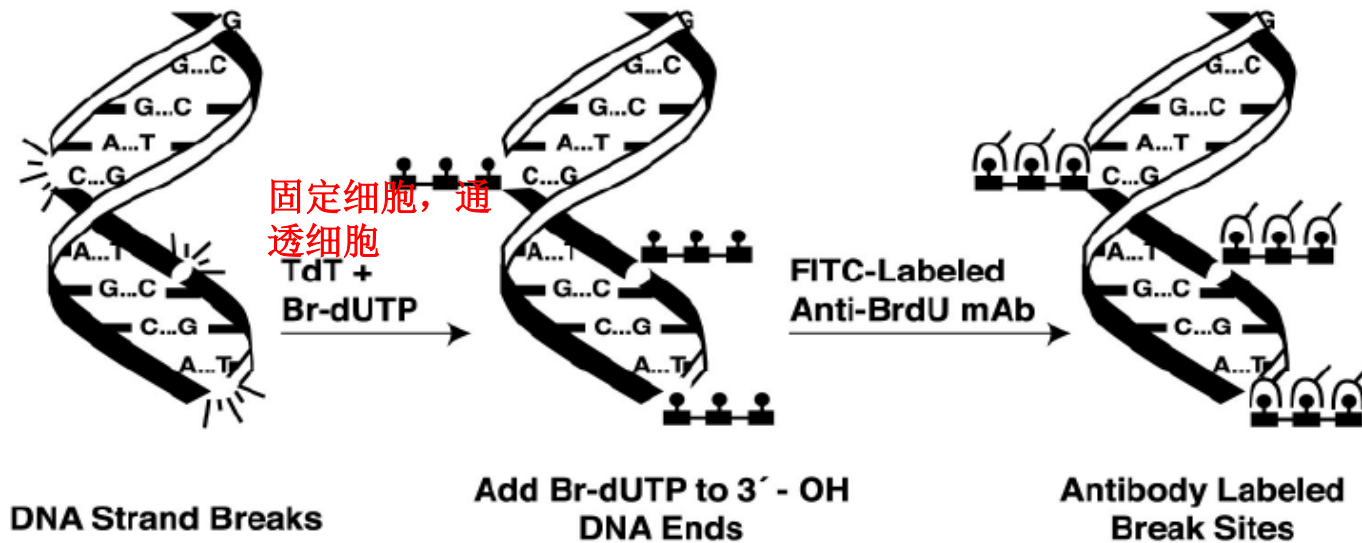
## - caspase-3

Jurkat T-Cells



- 活化的caspase-3位于细胞内：
  - 固定细胞
  - 细胞打孔
  - 荧光素偶联的抗活化的caspase-3抗体通过细胞膜上的小孔进入细胞内与活化的caspase-3结合

# 凋亡晚期—TUNEL检测法



- 1. 细胞晚期凋亡时，核酸内切酶被活化，细胞内双链DNA断裂，缺口处出现一系列DNA的3'-OH末端（用3'-OH末端表示DNA断裂数目）
- 2. 将外源脱氧核苷酸末端转移酶（TdT）和DNA聚合酶I渗入到凋亡细胞中，催化BrdU（BrdU代替胸腺嘧啶核苷）结合到断裂DNA的3'-OH末端上
- 3. 荧光素FITC偶联的抗BrdU抗体染色，检测凋亡细胞



---

# 细胞增殖的检测



# 细胞增殖的检测

---

- 细胞分裂：**CFSE、VPD450、PKH**
- DNA的合成：**BrdU掺入法**

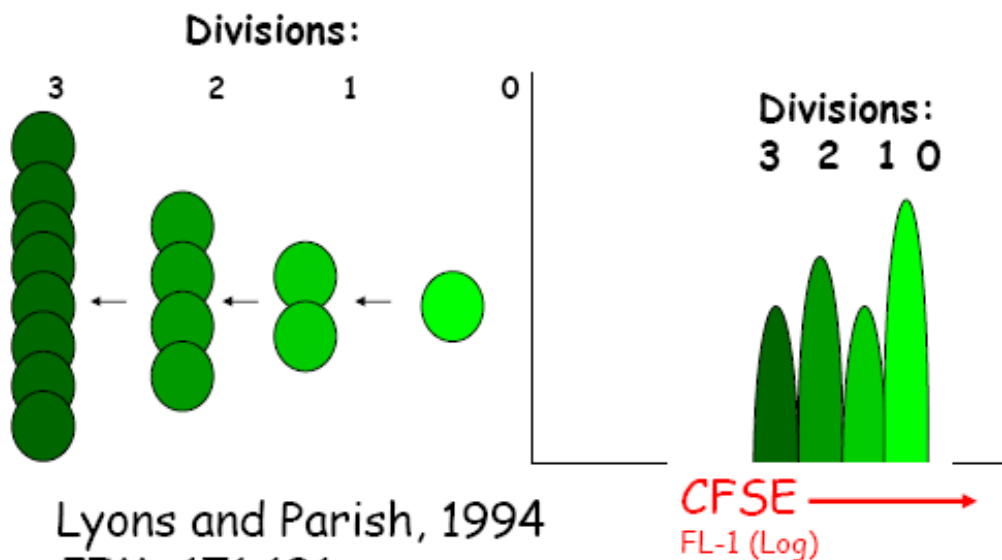


# 细胞增殖的检测

---

- 检测细胞分裂
- 示踪染料与细胞的结合方式
  - 染料与细胞内的**蛋白质**非特异性的共价结合 (CFSE)
  - 染料与**细胞膜的脂质双分子层**非特异性的非共价结合 (PKH26,PKH-67)

# 细胞增殖—CFSE法



Lyons and Parish, 1994  
JIM, 171;131

■ CFDA-SE是一种非极性分子，没有荧光，能自由通过细胞膜，并在细胞内被酯酶转化成荧光物质—CFSE。

■ 结合：CFSE不可逆的、非特异性的与细胞内的蛋白质共价结合。

■ 分裂：细胞分裂时，CFSE被平均分配到两个子代细胞中，所以荧光强度是亲代细胞的一半。

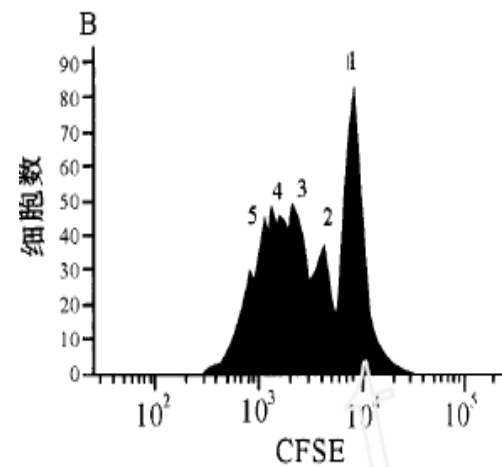
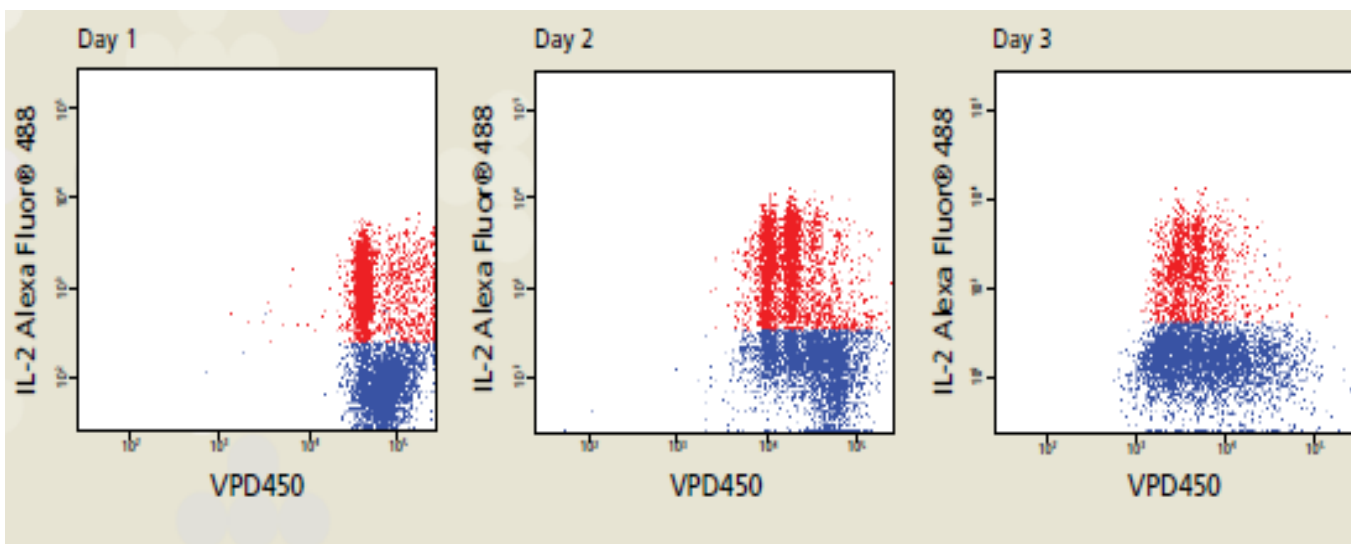
■ 特征：在一个增殖细胞群中，各连续代细胞以荧光强度的2倍递减，峰形左移为特征。



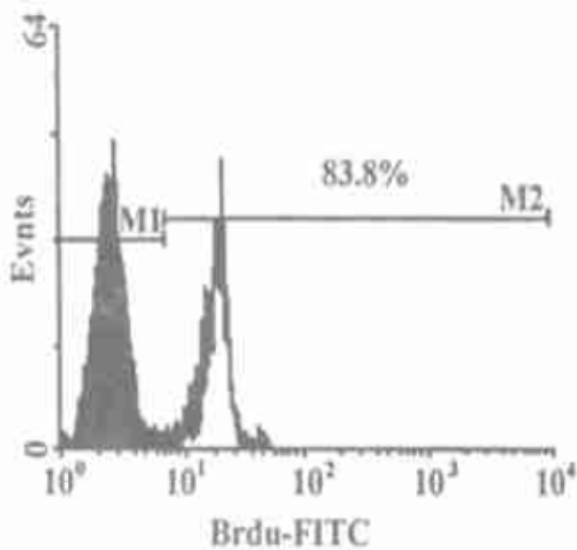
# 细胞增殖- VPD450

## ■ VPD450:

- 原理和CFSE相同。
- 多荧光染料同时使用时，可空出FL1通道（CFSE）。
- 激发光407nm，发射光450nm。



# 细胞增殖—BrdU掺入法



**PMA刺激8h后T细胞**

李学义等，流式细胞术检测淋巴细胞增殖方法的建立.2003

BrdU掺入到鼠的引用水中，可代替胸腺嘧啶核苷掺入到新合成的DNA中

↓  
固定和通透细胞

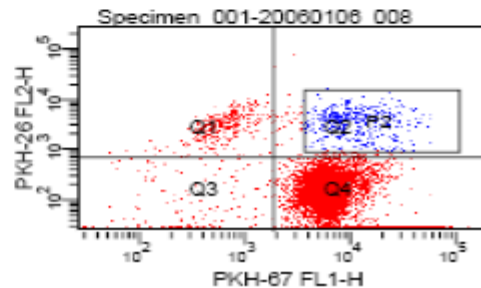
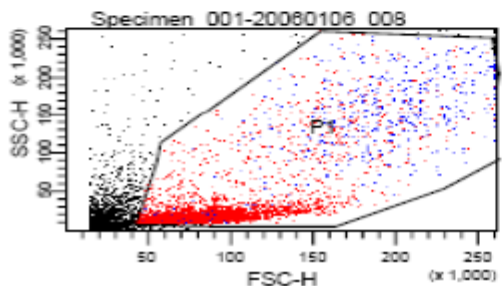
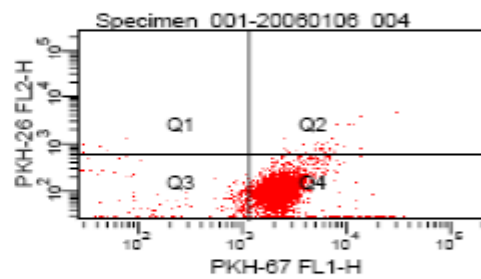
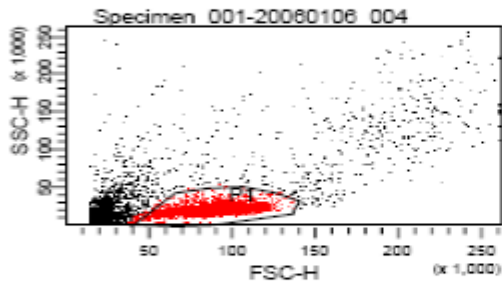
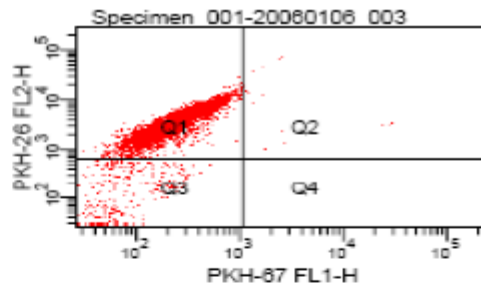
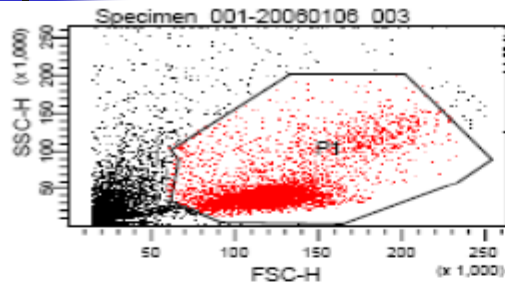
↓  
荧光素偶联的BrdU抗体特异性识别BrdU



# 细胞融合的检测

---

# 细胞融合的检测



■ **PKH**: 非特异性细胞膜嵌入式的荧光染料

■ **PKH26**: FL2, 橙红色荧光膜结合染料

■ **PKH67**: FL1, 绿色荧光膜结合染料

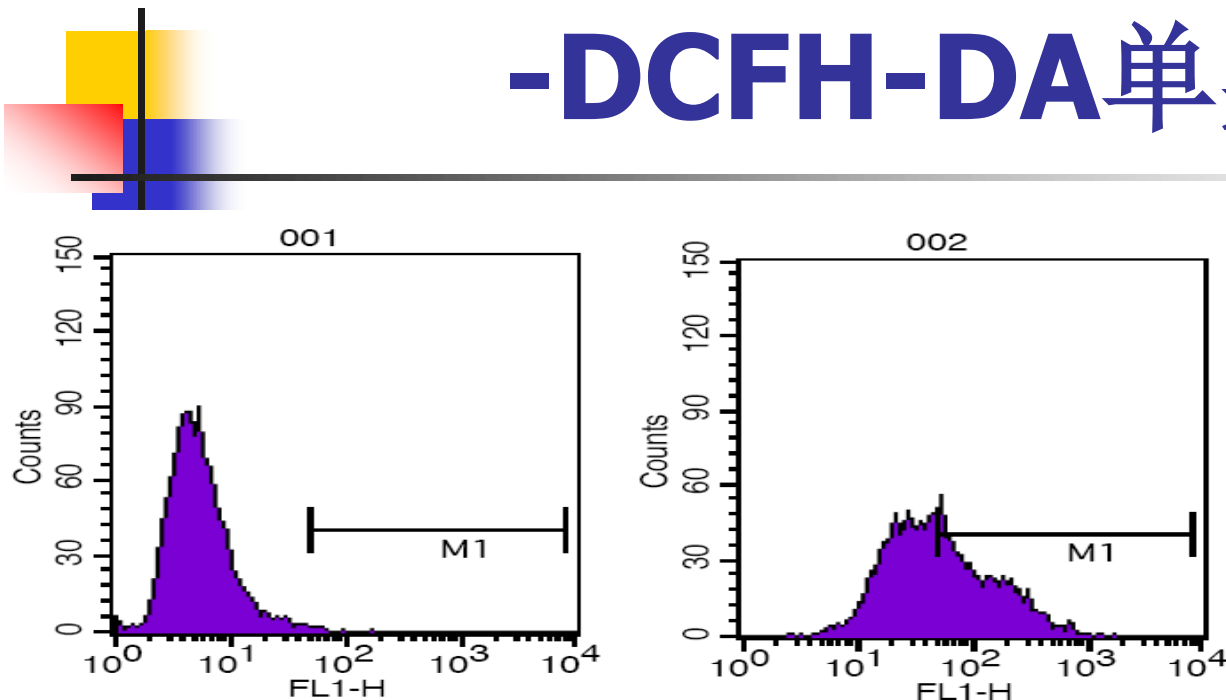


# 胞内活性氧水平 (*ROS*)的检测

---

# ROS的检测

## -DCFH-DA单染色法



刺激前 DCF

刺激后 DCF

不发光 DCFH-DA → 不发光 DCFH → 发光 DCF

**DCF:** 检测细胞内活性氧的生成量 (FL1)

**PI:** 检测细胞的损伤或死亡 (FL2)

- 原理：不发光的2',7'-二氢二氯荧光黄双乙酸钠 (DCFH-DA) 为 ROS 捕获剂，可迅速通过细胞膜进入细胞，在细胞内酯酶作用下脱去二酯生成不发光的 DCFH，而 DCFH 不能通透细胞膜。
- 当细胞内存在  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  等 ROS 时，即被氧化成发荧光的 DCF 的荧光强度。
- DCF: 488nm 激发波长, 525nm 发射波长



---

# 细胞因子的检测



# 细胞因子的检测

---

- 胞内细胞因子测定
- **CBA (cytometric bead array):**胞外细胞因子测定



# 胞内细胞因子测定

激活细胞



阻断细胞因子向细胞外排



固定细胞  
细胞膜打孔



抗细胞因子抗体染色

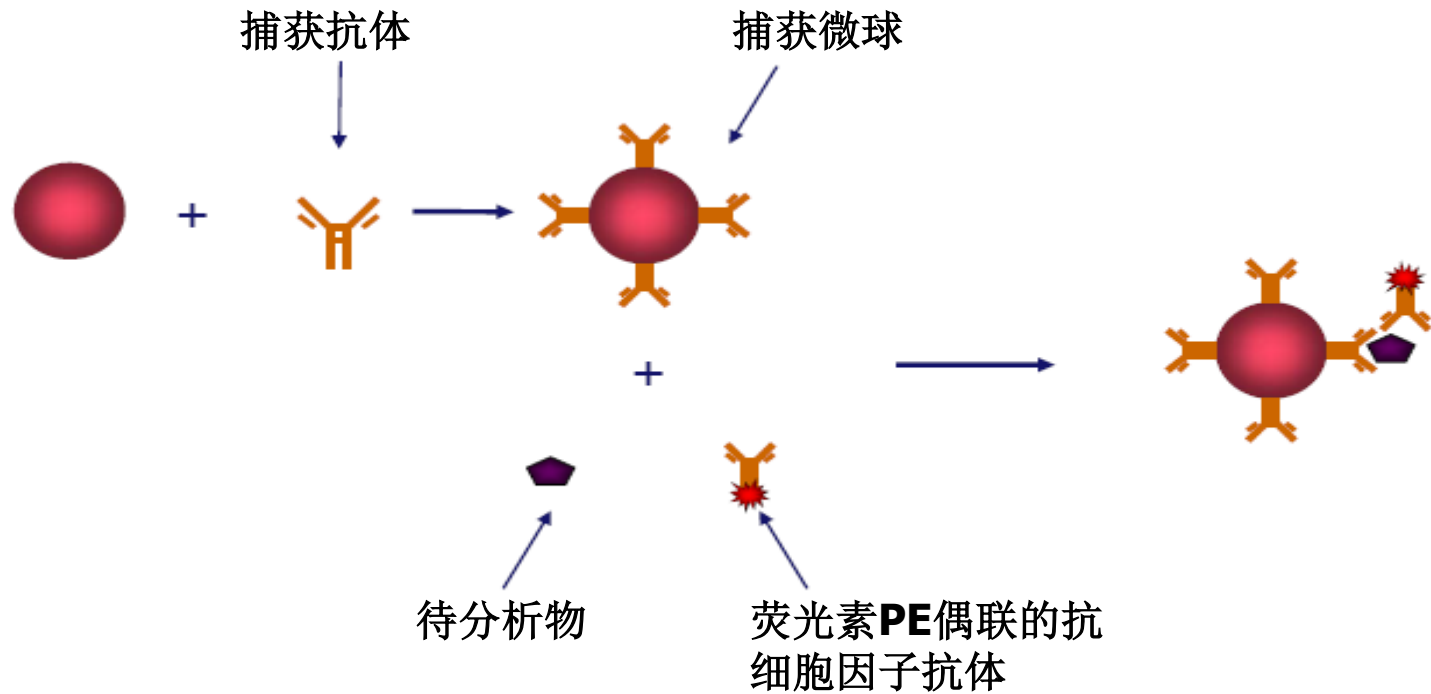


上机

- 1、**激活细胞**：未活化的细胞所分泌的细胞因子很少，很难在流式细胞仪上检测。
- 2、**阻断细胞因子**：为了阻止产生的细胞因子分泌到细胞外，需要同时加入**BFA**(高尔基体阻断剂)等
- 3、**固定细胞和细胞膜打孔**：胞内染色前需用多聚甲醛固定，保留细胞形态完整性；随后用皂角苷（去垢剂）增加细胞膜通透性
- 4、**染色**：荧光素偶联的抗细胞因子抗体染色
- 5、**流式分析**

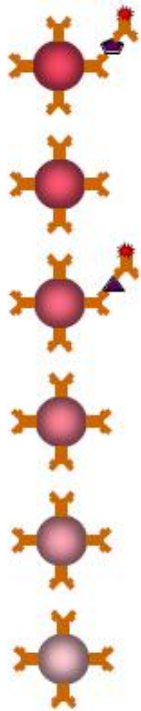
# 细胞外细胞因子的检测

## CBA(cytometric bead array)

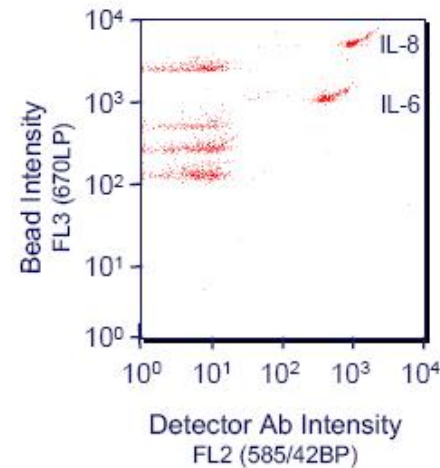


■原理：一系列荧光强度不同的聚苯乙烯微球（7.5um）包被有特异性细胞因子抗体，与待测样本孵育后，当待测样本中含有相应的细胞因子时，细胞因子抗体能够与相应的细胞因子结合，最后加入荧光素偶联的抗细胞因子抗体，形成“三明治”的复合物。

# CBA(cytometric bead array)

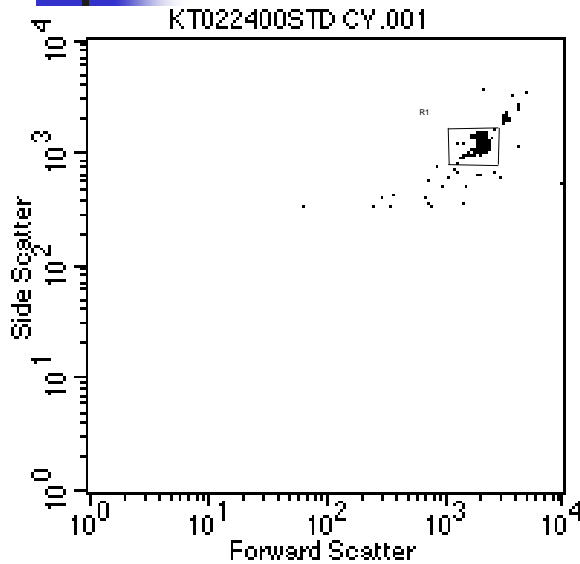


+

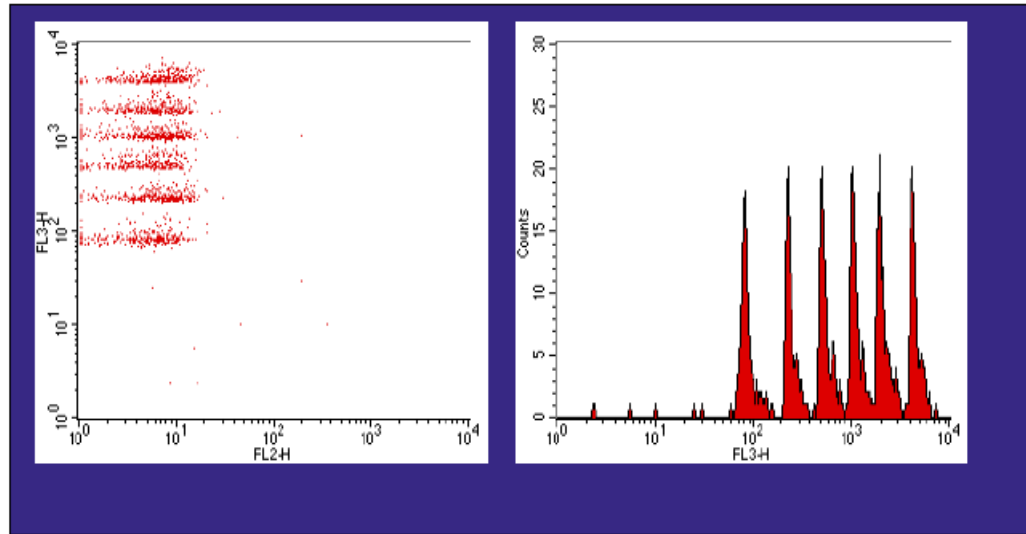


- **Y轴:** 根据FL3通道的PE-CY5荧光信号的不同区分6种不同的细胞因子。
- **X轴:** 根据FL2通道的PE荧光信号判断样品中是否含有相应的细胞因子。

# CBA(cytometric bead array)



IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF  $\alpha$ , IFN  $\gamma$

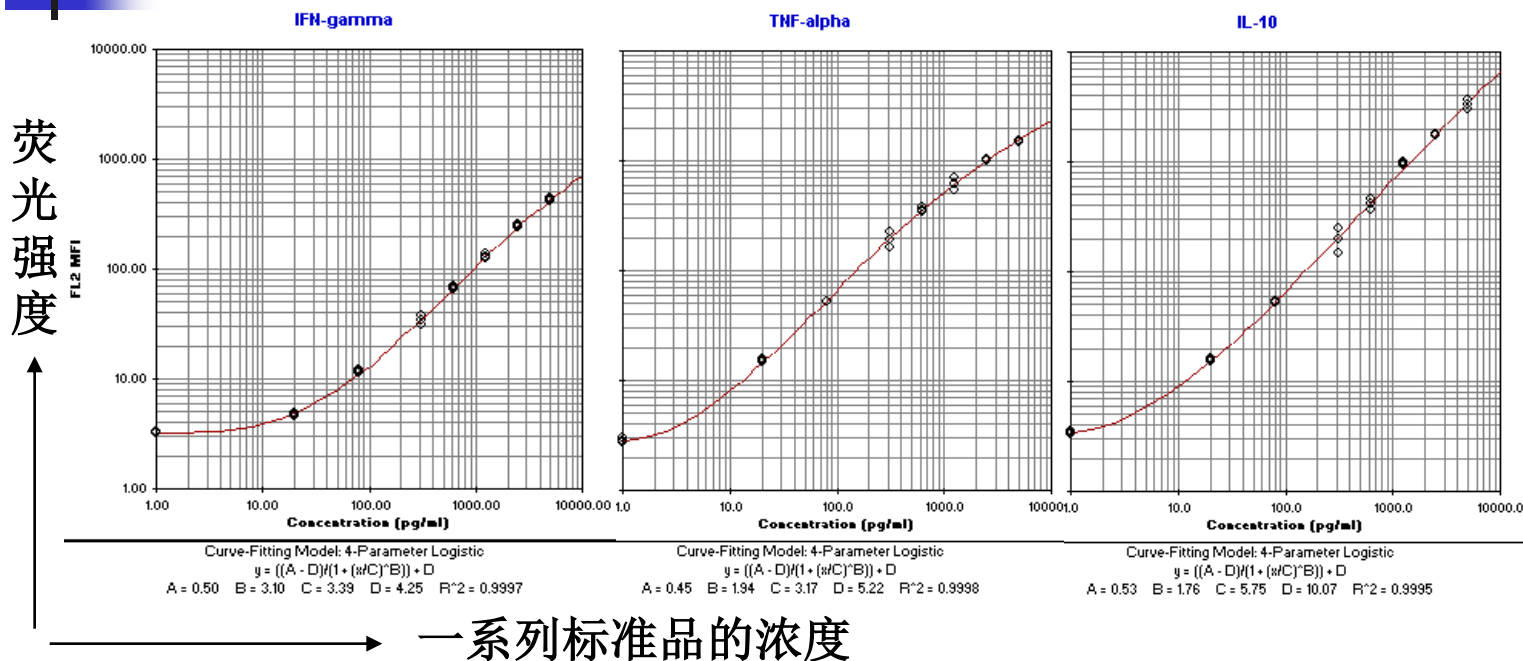


二维点图

直方图

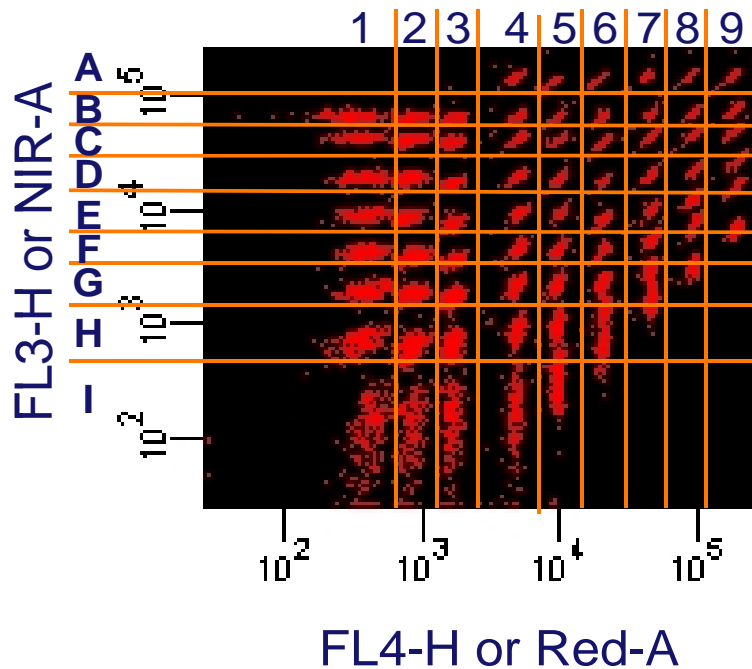
- 在FSC/SSC点图中，找到聚苯乙烯球复合物的位置
- 在FL3通道，根据聚苯乙烯球上荧光素量(PE-cy5)的不同，区分6种不同的细胞因子，达到一次检测6种细胞因子的目的。

# 细胞因子的标准曲线

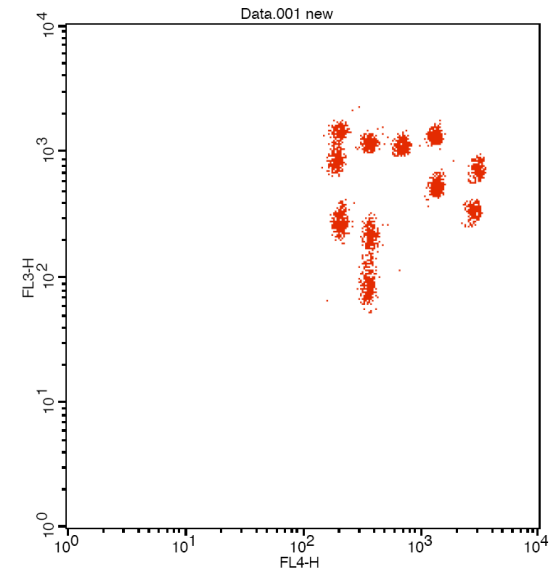


■ 根据标准曲线能够计算出测试样本的细胞因子浓度。

# CBA Flex Set



**Flex Set**可同时检测更多的细胞因子



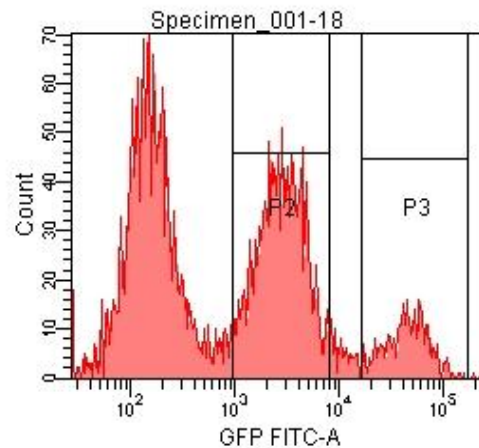
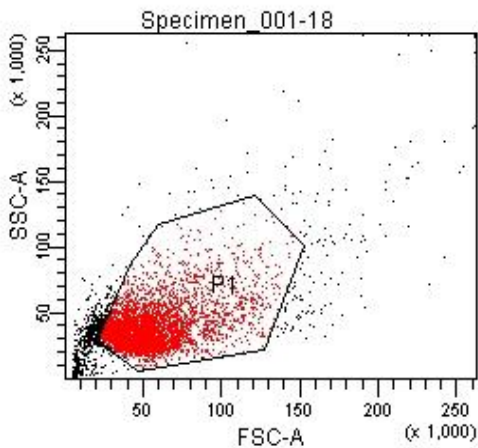
- **FL3,FL4:** 细胞因子的种类
- **FL2-PE:** 每种细胞因子的浓度



# 报告基因的检测

---

# GFP的检测



Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	5,000		100.0
P1	4,160	83.2	83.2
P2	1,588	38.2	31.8
P3	393	9.4	7.9

弱阳细胞 强阳细胞

将**GFP**与目的基因连接，转染进细胞中，将干扰**RNA**也转染到细胞中，通过观察**GFP**的表达情况，观察干扰**RNA**的效果。



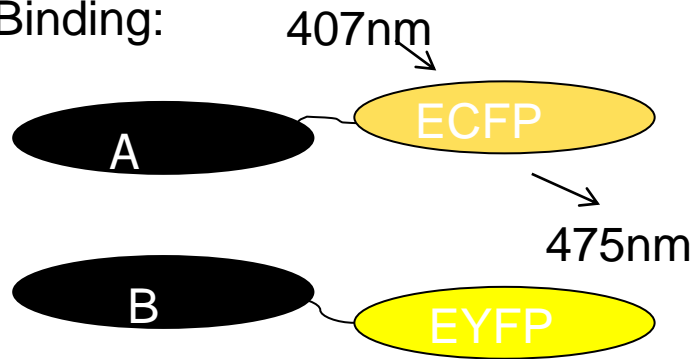


# 荧光共振能量转移的检测

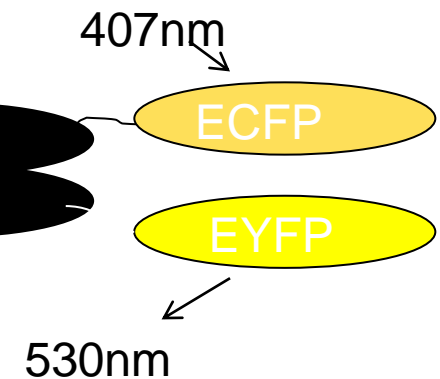
---

# 荧光共振能量转移 (FRET)

No Binding:



Binding:



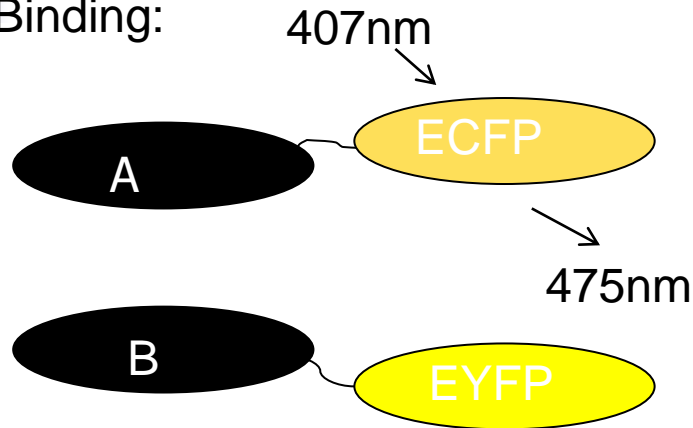
实现FRET的条件:

- 1、供体荧光素的发射光与受体荧光素的激发光光谱重合
- 2、供体荧光素和受体荧光素之间的距离足够近，一般两者为3-6nm时，发生FRET的概率有50%

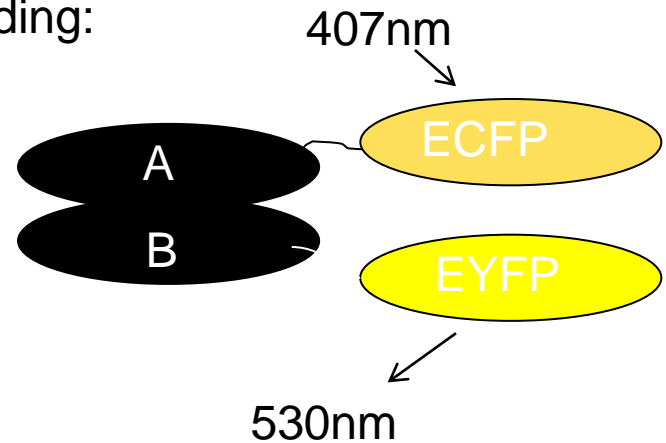
# 荧光共振能量转移 (FRET)

## 检测细胞内的蛋白质A和B是否直接结合

No Binding:



Binding:



当蛋白质A与蛋白质B不能直接结合时，ECFP与EYFP无法达到FRET：此时用407nm激光器激发，只能检测到475nm左右的荧光信号

当蛋白质A与蛋白质B直接结合时，ECFP与EYFP实现FRET：此时用407nm激光器激发，由于FRET的概率达不到100%，所以可同时检测到530nm和475nm左右的荧光信号

# 通过FRET研究细胞内蛋白的相互作用

## Intracellular protein interaction mapping with FRET hybrids

Xia You\*, Annalee W. Nguyen\*<sup>†</sup>, Abeer Jabaiah\*, Mark A. Sheff<sup>‡</sup>, Kurt S. Thorn<sup>§</sup>, and Patrick S. Daugherty

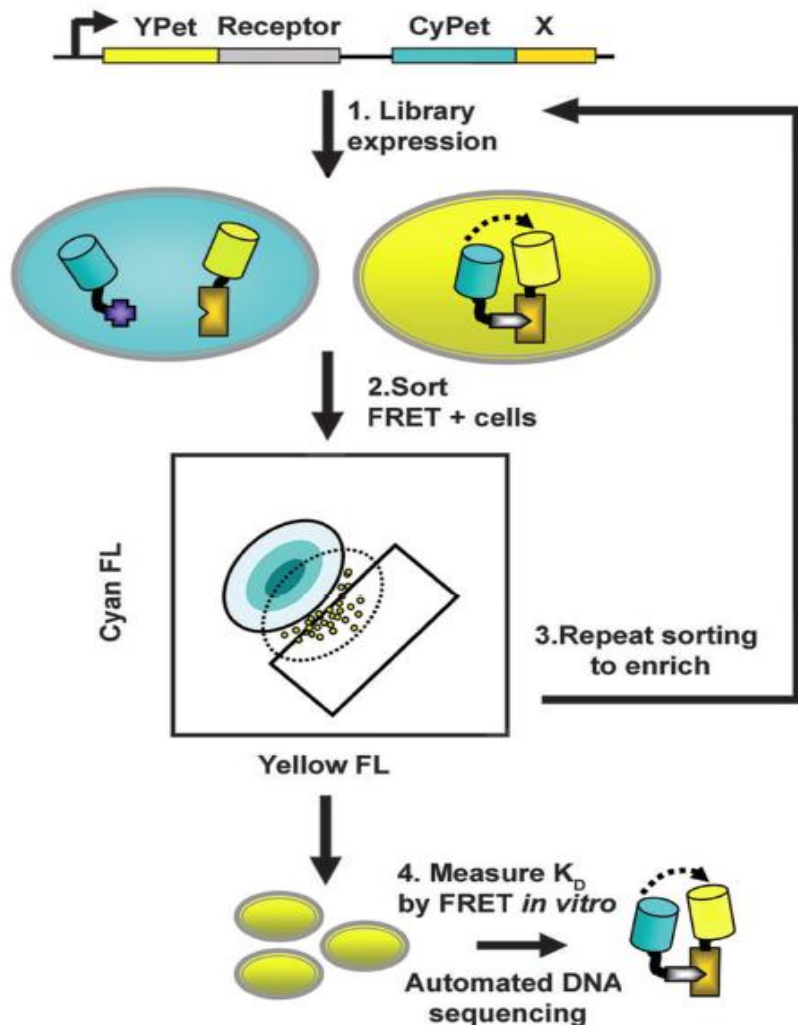
\*Department of Chemical Engineering, University of California, Santa Barbara, CA 93106; and <sup>†</sup>Bauer Center for Genomics Research, Room Harvard University, 7 Divinity Avenue, Cambridge, MA 02138

Edited by Jack W. Szostak, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, and approved October 14, 2006 (received for review June 28, 2006)

A quantitative methodology was developed to identify protein interactions in a broad range of cell types by using FRET between fluorescent proteins. Genetic fusions of a target receptor to a FRET acceptor and a large library of candidate peptide ligands to a FRET donor enabled high-throughput optical screening for optimal interaction partners in the cytoplasm of *Escherichia coli*. Flow cytometric screening identified a panel of peptide ligands capable of recognizing the target receptors in the intracellular environment.

desirable to screen for interactions directly in a specific animal or plant cell type. Finally, because interactions are composed of several unique protein-interaction partners (13), it can be difficult to match interaction partners to spatially segregated domains on the target protein. High-resolution mapping information would aid in developing a detailed picture of protein network structure that includes competitive or cooperative interactions. Given

# 通过FRET研究细胞内蛋白的相互作用



➤ **构建表达载体:** 标记YPetD的受体蛋白基因, 标记CyPet的不同肽段基因

➤ **FACSAria的多轮分选:** 分选出有FRET的细胞 (即受体蛋白和肽段可以相互作用的细胞)

➤ **FACSAria的单细胞分选:** 将有FRET的单个细胞分选的孔板中

➤ **测量 $K_D$ , DNA测序等后续实验**

Xia you, et al. Intracellular protein interaction mapping with FRET hybrids. PNAS. 103, 18458-18463 (2006)



# 谢谢大家

---