

流式细胞技术及其 ——在水生生物研究中的应用

汪 艳



中国科学院水生生物研究所分析测试中心

预约电话：027-68780783

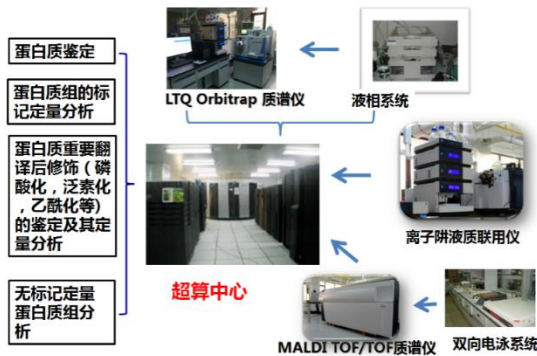


内 容

- 一、介绍分子与细胞生物学技术平台设备
- 二、流式细胞仪检测的原理
- 三、应用案例分享

中科院水生所公共技术研发与服务部（分析测试中心）

1. 蛋白组学仪器平台



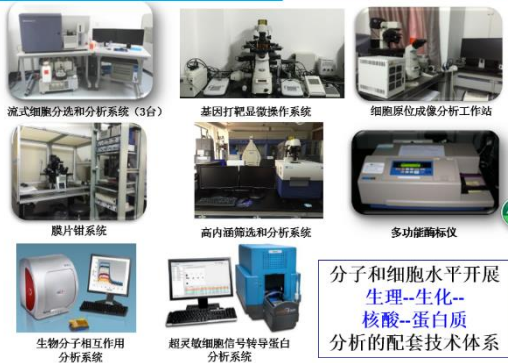
2. 光学和电子成像仪器平台



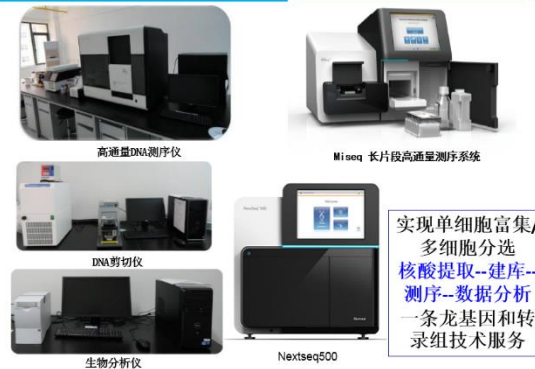
3. 化学分析和环境仪器平台



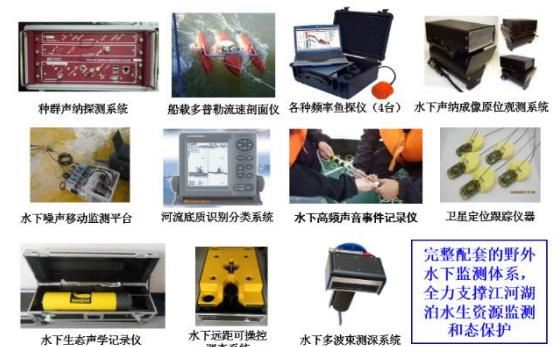
4. 细胞和分子生物学仪器平台



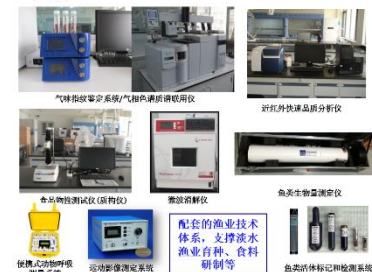
5. 基因组学仪器平台



6. 水生态和渔业资源仪器平台



(续)



260台套，仪器价值1.6亿

一、分子与细胞生物学技术平台

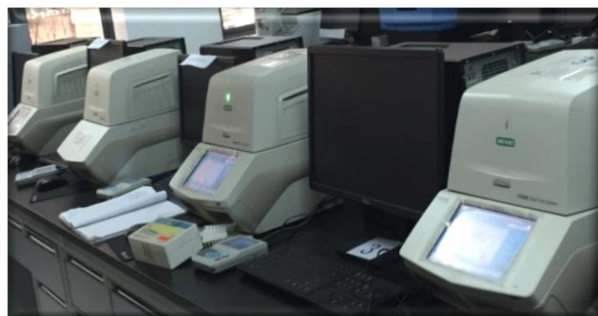
➤ 细胞水平研究：流式细胞仪



高内涵筛选和分析系统



荧光定量PCR (Bio-Rad) 6台



钙流检测工作站



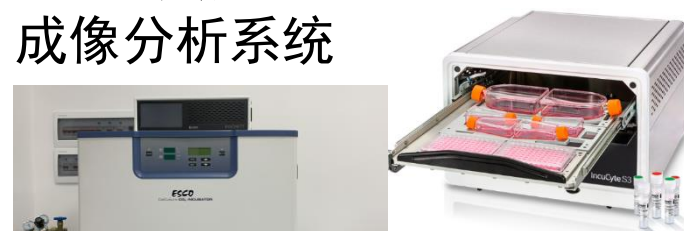
全自动细胞成像仪
显微操作系统



转基因与基因打靶
显微操作系统



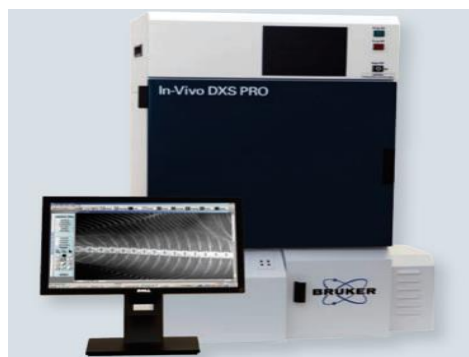
长时间动态活细胞
成像分析系统



活体可见光成像系统



X光生物样本成像系统



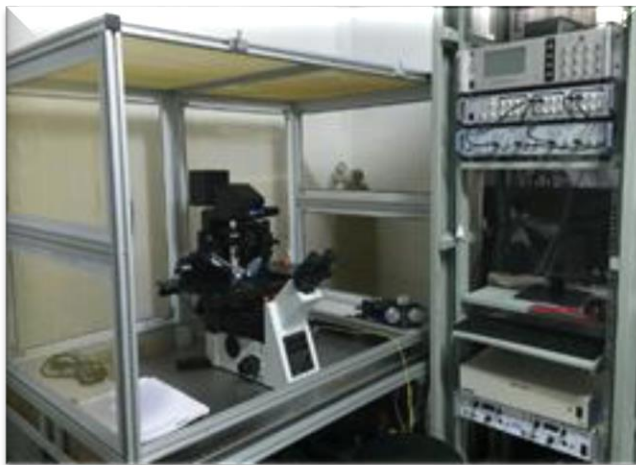
细胞计数仪



过氧化氢蒸汽
发生器



➤ 电生理设备



Multiclamp700B膜片钳系统

- 目前比较流行的双探头软件控制的自动化膜片钳放大器。
- 可以适合单通道、全细胞、细胞内离子通道的记录和脑片神经回路的研究。



MED64平面微电极矩阵记录系统

- 采用可靠而且简单的铂黑微电极阵列，是目前市场上噪音最小的电极。
- 适合电信号空间和时间关系等网路电生理研究电生理记录与细胞形态研究可同步进行

➤放射性同位素实验室设备

同位素使用范围： 3H 、 14C 、 125I 、 32P 、 35S

同位素检测室



同位素实验室



防护门



磷屏扫描仪



液体闪烁计数器



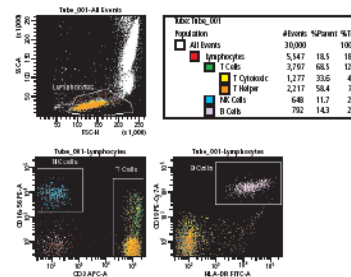
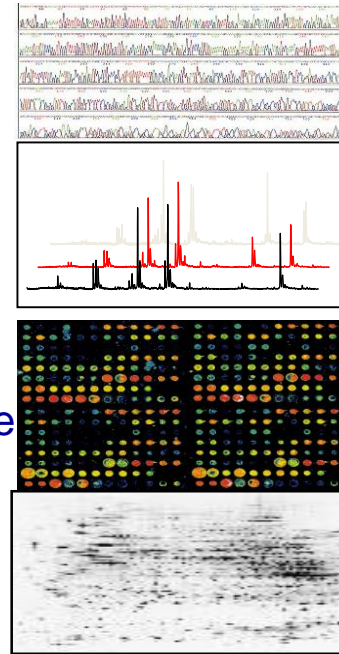
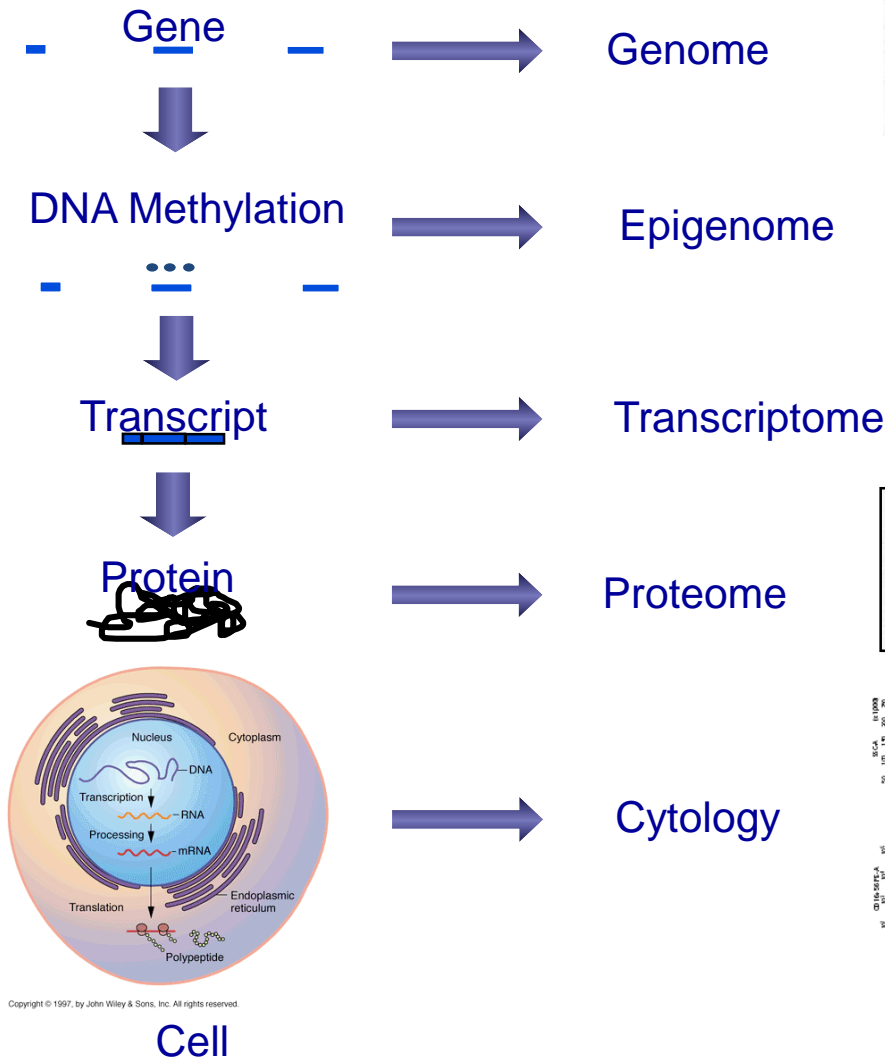
同位素废物储存室





二、流式细胞仪检测的原理

在细胞层面探讨基因、蛋白及相互间的内在联系成为生命科学的全新命题



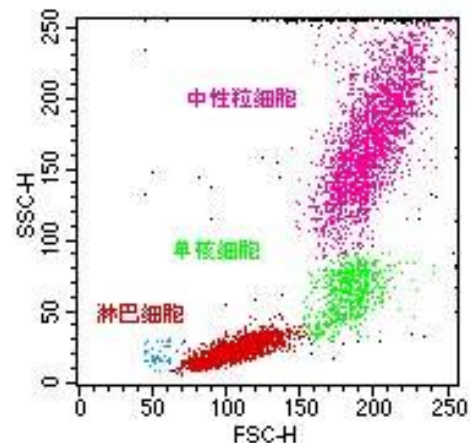
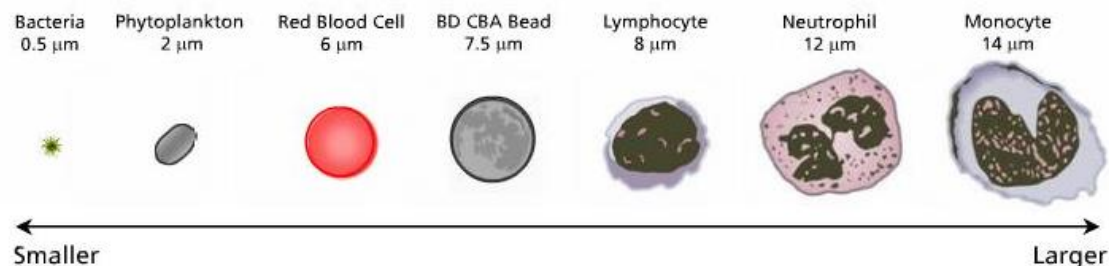
What Is Flow Cytometry?

- **Flow ~ cells in motion**
- **Cyto ~ cell**
- **Metry ~ measure**
- **Measuring properties of cells while in a fluid stream**

流式细胞术 (Flow Cytometry) 是对于处在快速直线流动状态中标记荧光和染料的细胞或生物颗粒进行多参数、快速、高通量的定量分析和分选的技术。

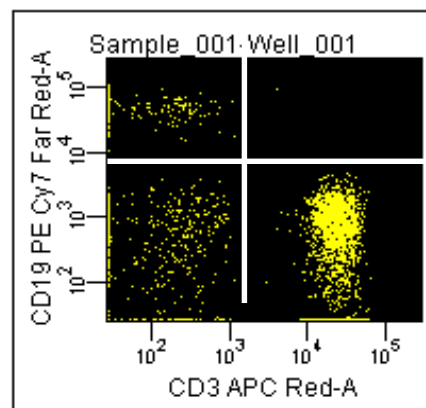
流式细胞术检测样本

外周血，骨髓，穿刺液，洗脱液，尿液，唾液，实体组织，培养细胞，微生物，微球 血清等



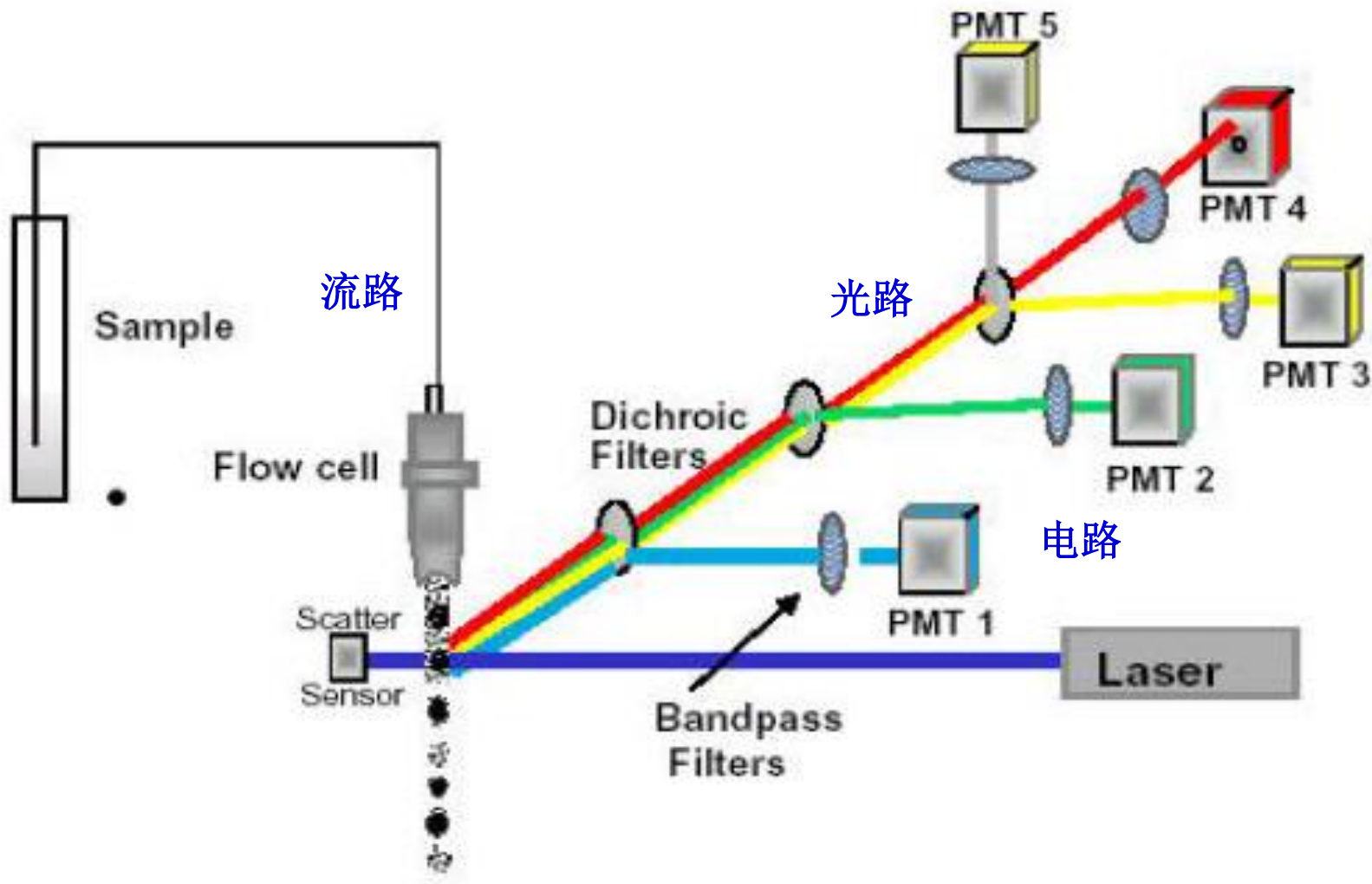
流式细胞术提供的信息：

- 相对细胞大小 (FSC)
- 相对细胞颗粒密度和内部复杂度 (SSC)
- 染色过细胞的相对荧光强度 (Fluorescence)

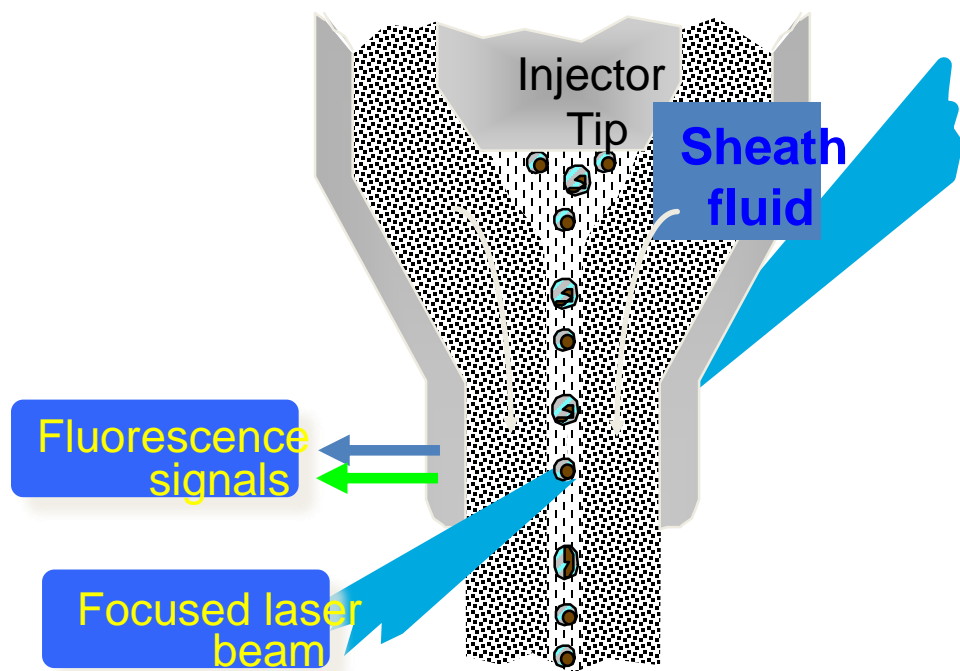


流式细胞仪原理及构造

流式细胞仪基本构成：液流系统、光学系统、电子系统、分选系统



流式细胞仪流动室



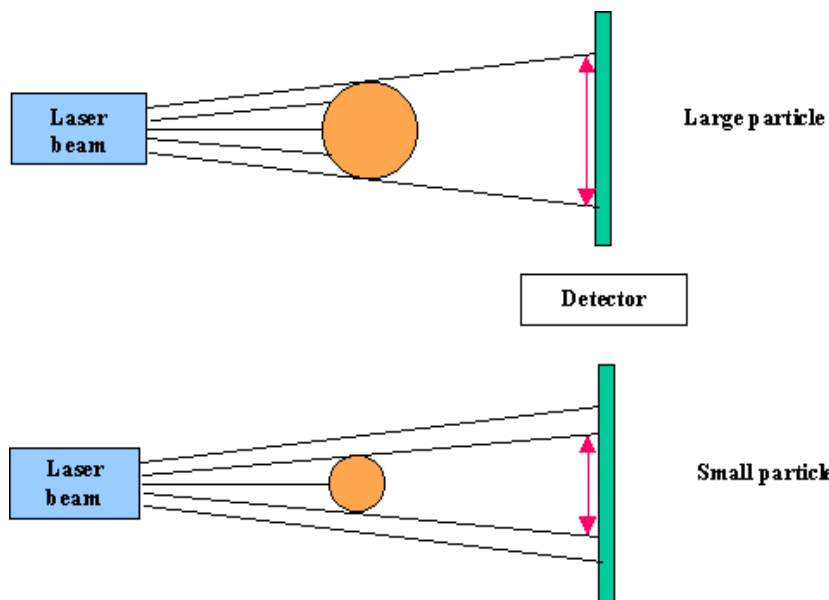
- 单细胞悬液
- 大多数仪器是在50-300 μm 大小的孔径中, 将细胞悬液注射进入鞘液中
- 这一过程, 成为流体力学聚焦

散射光信号 — 细胞大小及颗粒性

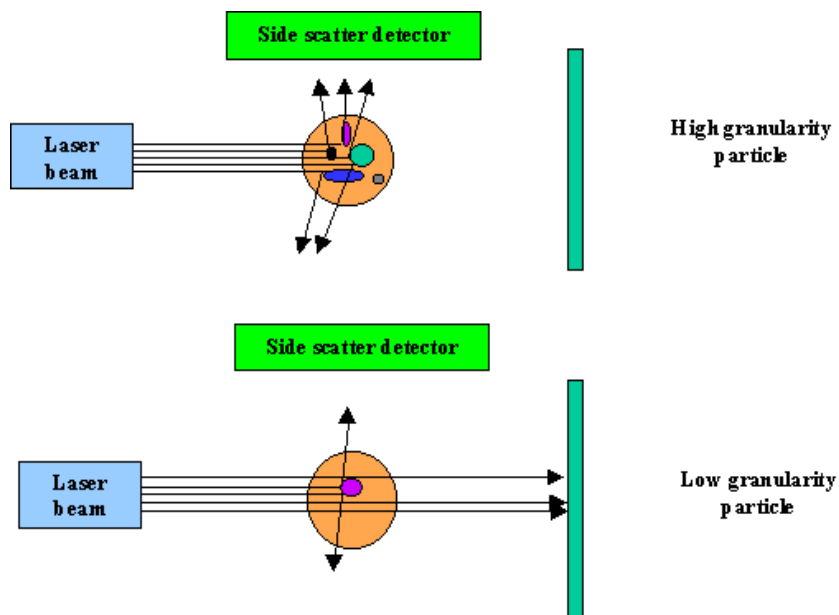
前向角散射光 (Forward Scatter, FS): 细胞大小

侧向角散射光 (Side Scatter, SS): 细胞颗粒性 (90度散射光)

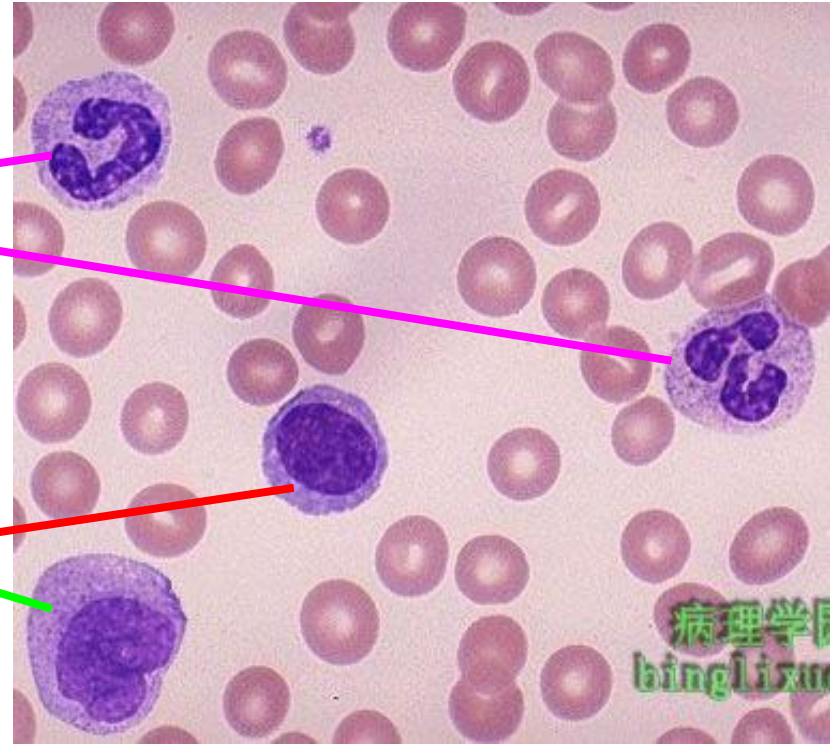
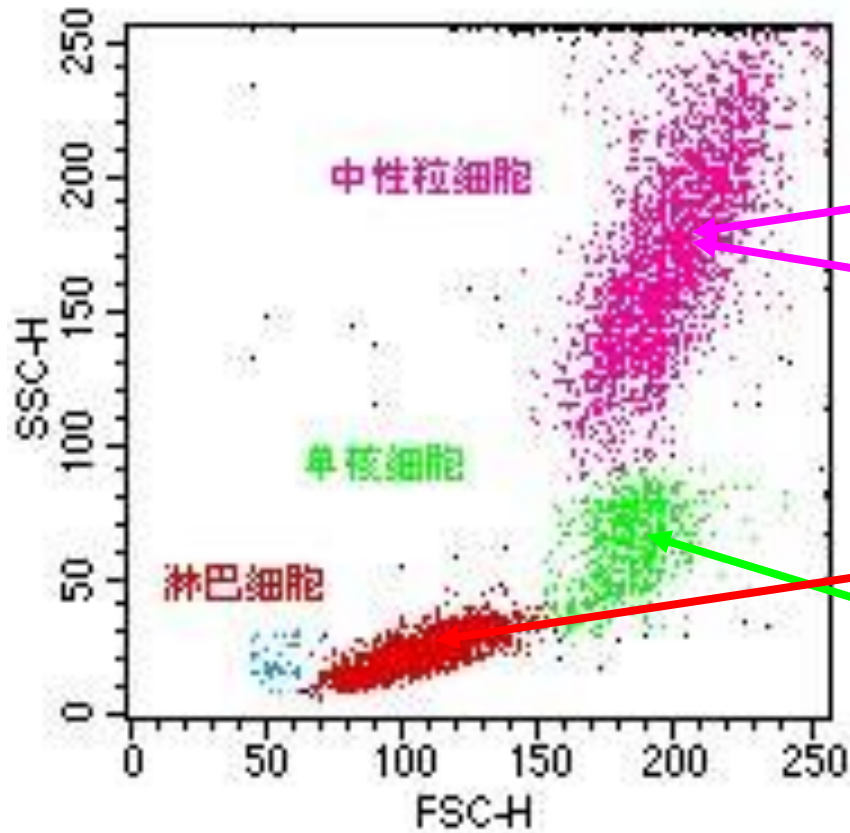
FS



SS



散射光信号：界定细胞群

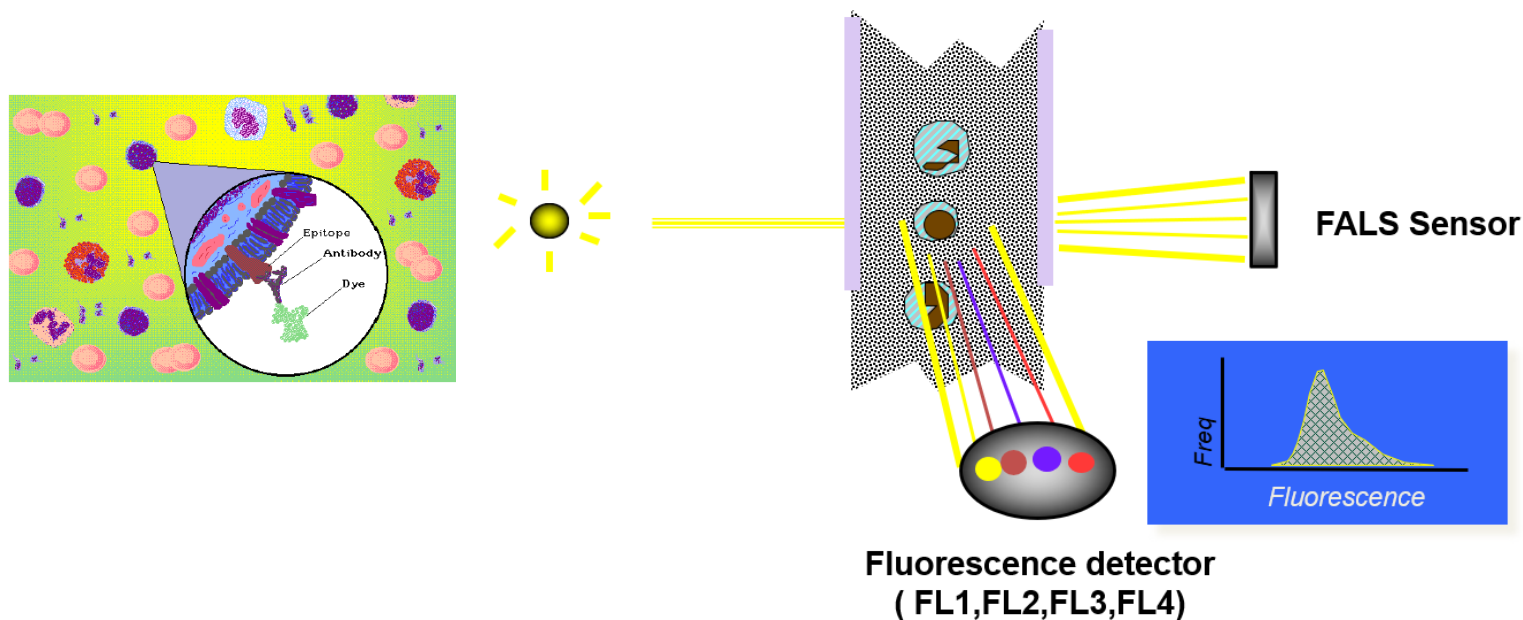


荧光信号

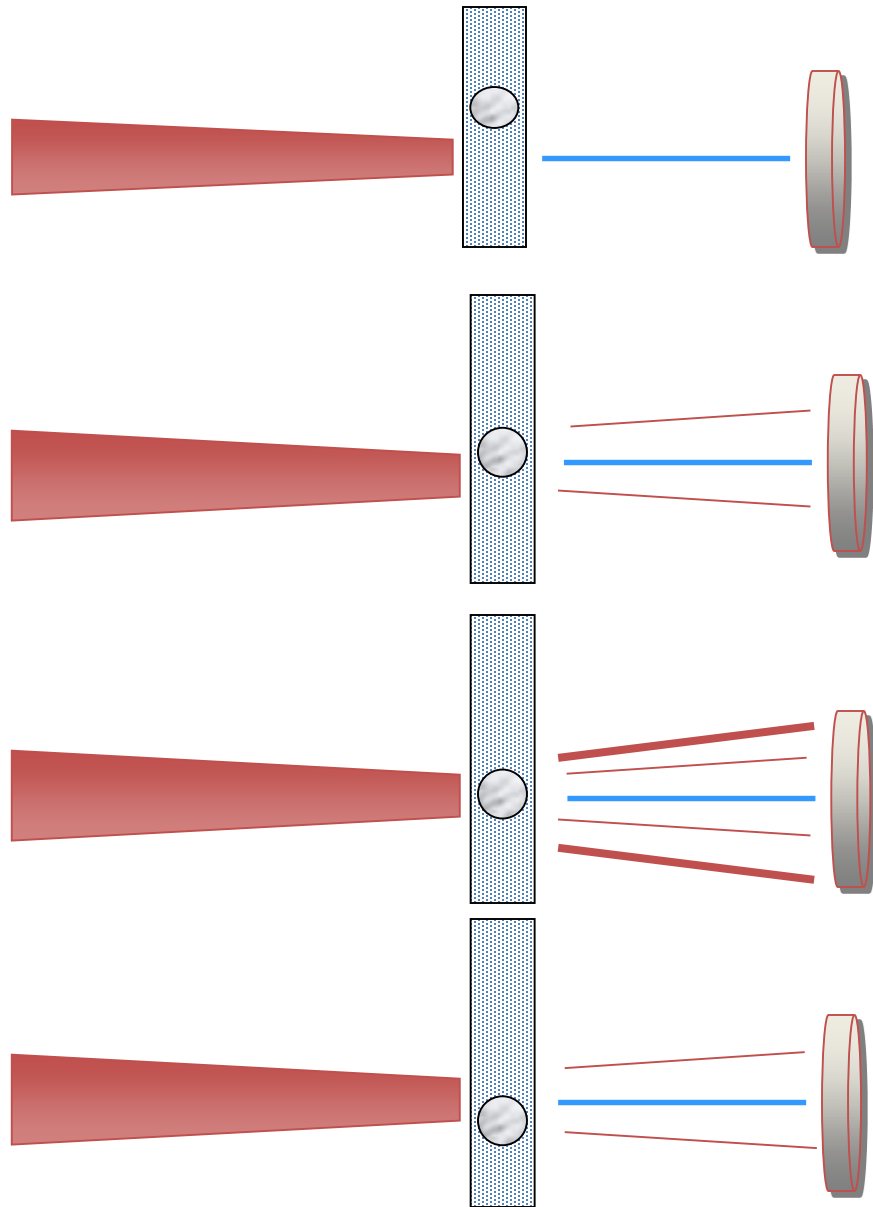
原理：

细胞表面的抗原(或细胞膜受体)与相关的荧光抗体结合，形成带有荧光的抗原抗体复合物。

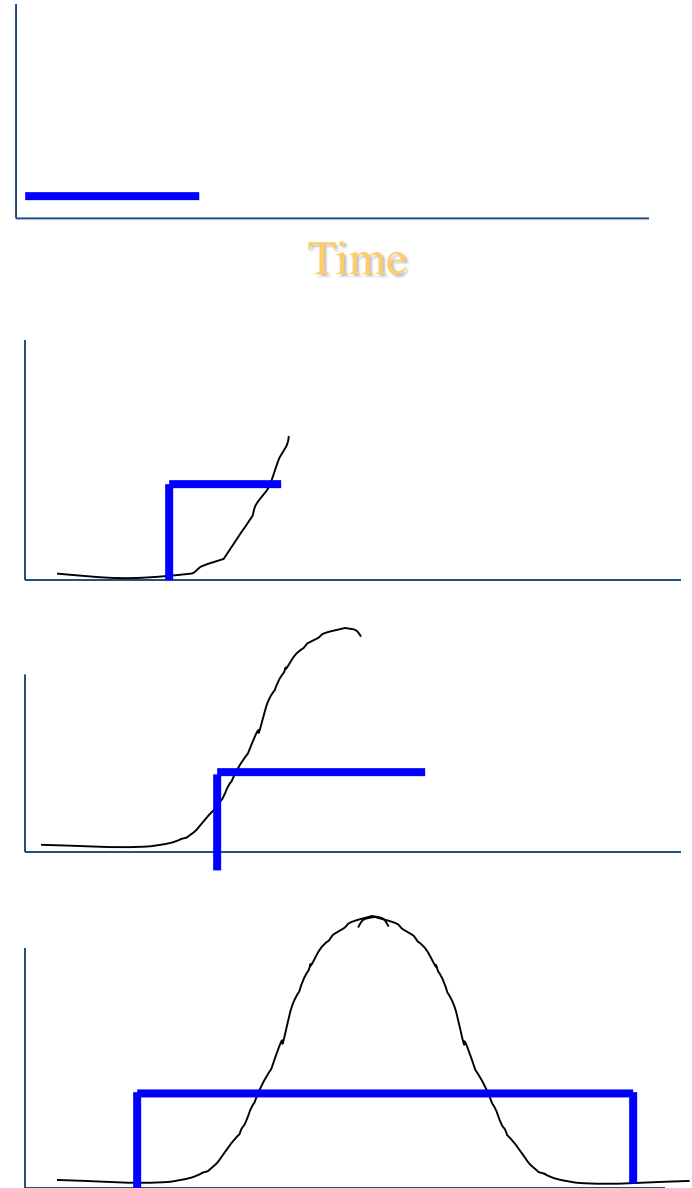
通过流式细胞仪测定其荧光量，即可得到细胞群的不同抗原位点表达情况。



The Pulse



α Photons/Detector (V)



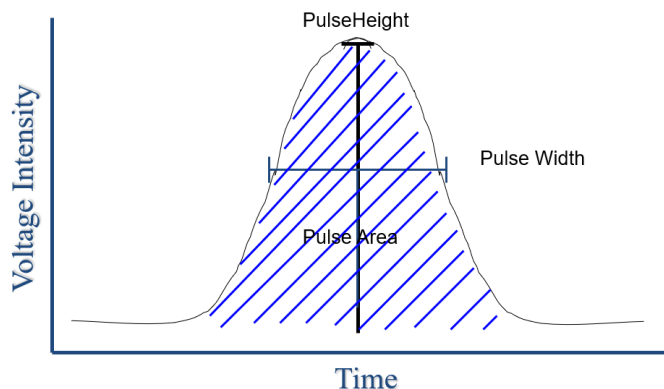
电子系统：信号放大及阈值

信号放大方式（PMT）：将光信号转换成电子信号

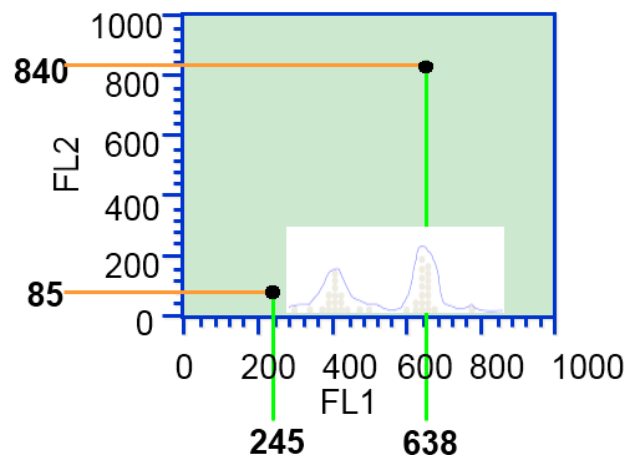
- ✓ 线性放大 Lin: 散射光信号，DNA含量、RNA含量、总蛋白质含量
- ✓ 对数放大 Log: 荧光信号，细胞膜表面抗原

✓ 数据处理系统
计算机系统数据采集与处理

Measurements of the Pulse



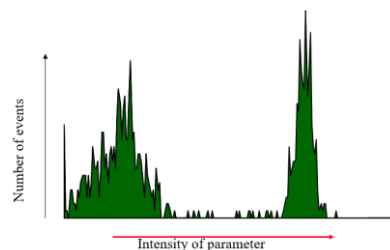
	FSC	SSC	FL1	FL2
Event 1	30	60	638	840
Event 2	100	160	245	85
Event 3	300	650	160	720



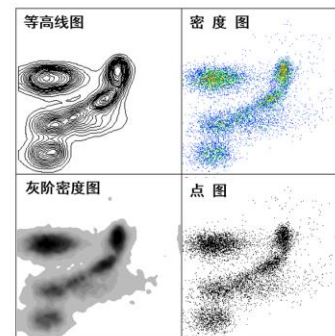
流式数据分析

- 你需要的是哪一种数据?
 - ✓ 荧光强度?
 - ✓ 阳性百分比?
 - ✓ X与y差值多少?
 - ✓ 参数1和参数2的比值?
- 可使用哪些统计手段
 - ✓ 平均荧光强度MFI (geometric or arithmetic)
 - ✓ 百分比均值%-ages
 - ✓ 变异度CV
 - ✓ 中位数Median
 - ✓ 很多其他适用于数值型数据的统计手段

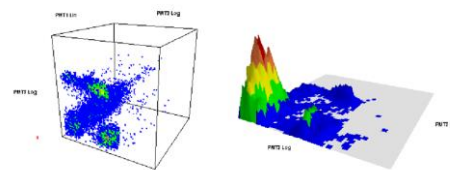
单参直方图



二维参数图



三维参数图



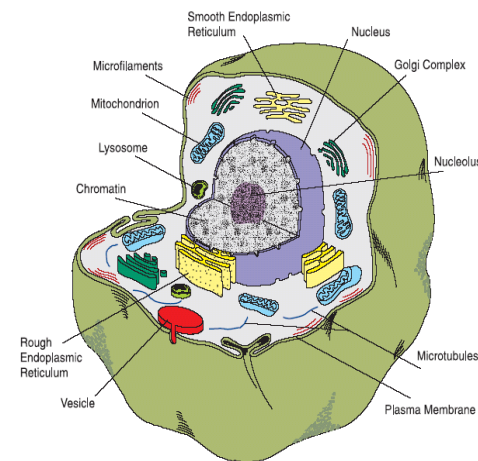
流式细胞术的应用

细胞结构

- ✓ 细胞大小
- ✓ 细胞粒度
- ✓ DNA含量与细胞周期
- ✓ RNA含量
- ✓ 蛋白质含量
- ✓ 染色体分析
- ✓ 细胞数目

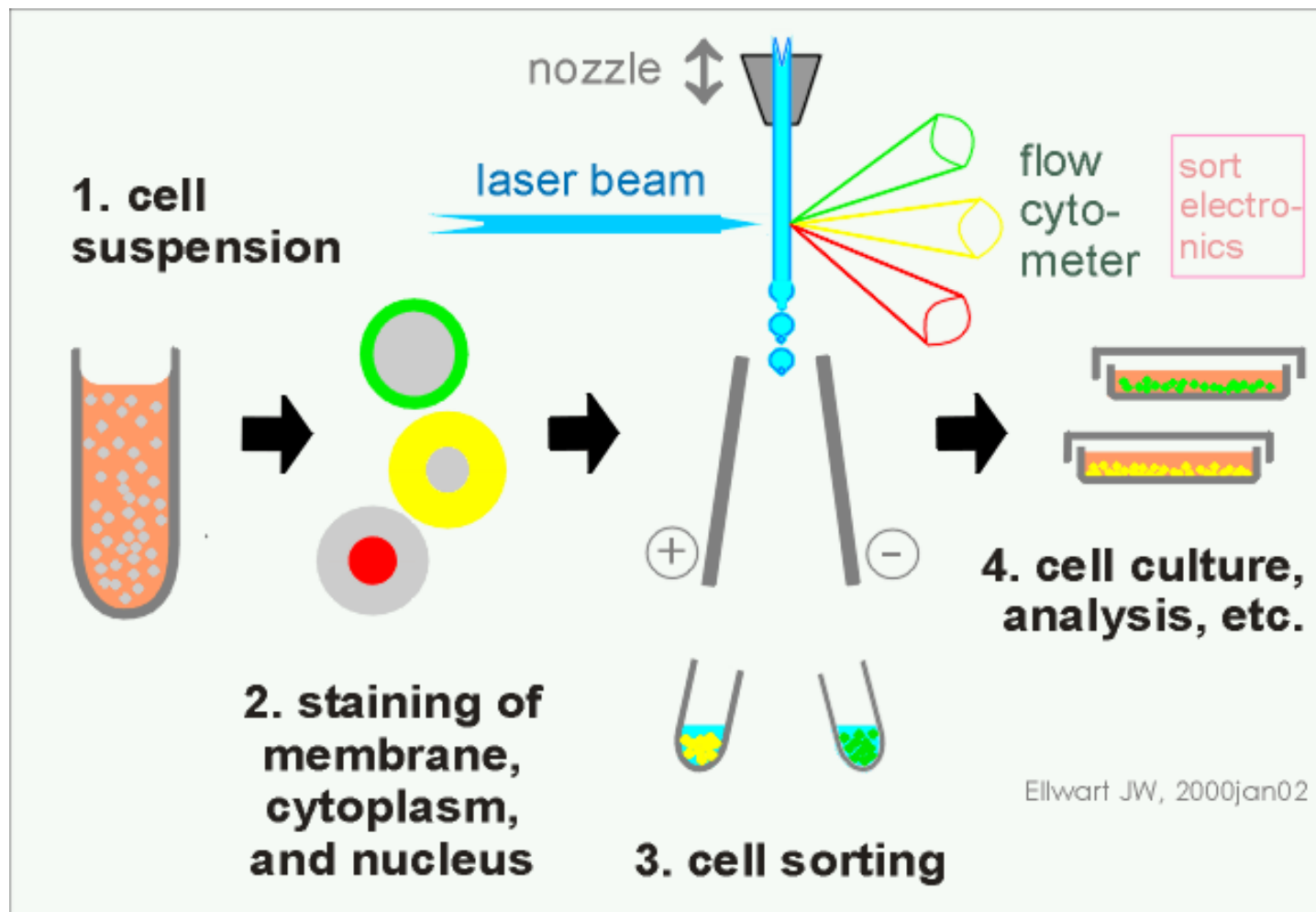
细胞功能

- ✓ 细胞活性
- ✓ 细胞分型
- ✓ DNA含量分析
- ✓ 细胞周期
- ✓ 细胞倍性
- ✓ 细胞凋亡
- ✓ 细胞转染



在上述信号基础上的细胞分选

流式分选系统：电子偏转的方式



准确的分选, 来自于精确地**充电**

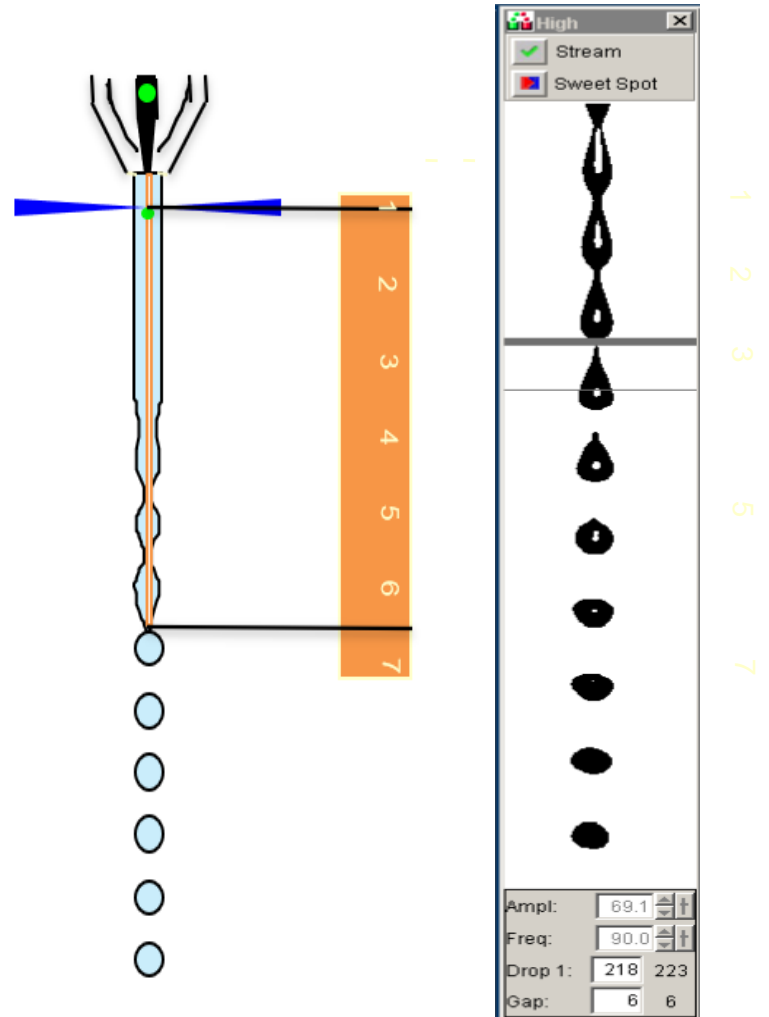
---**Drop delay**的确定

定义： Drop delay即液滴延迟时间，指细胞通过检测区到液滴分离的间隔时间。

意义： 保证包裹细胞的液滴表面不会充上相反的电荷，从而实现最高的分选纯度及细胞得率。

Sweet Spot自动监控液流

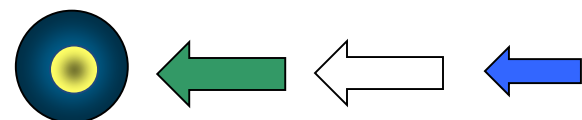
- ✓ 液滴断点监测窗口
- ✓ 振幅自动调节，维持断点稳定
- ✓ 阻塞报警，保护分选样本不受污染，实现分选时无人看管



MoFlo™ XDP: 高度智能的分选模式



Enrich mode



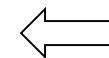
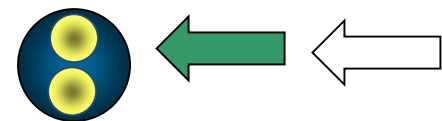
要得到所有含有目标细胞的液滴



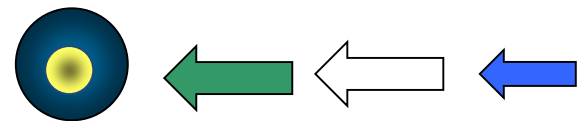
Purify mode



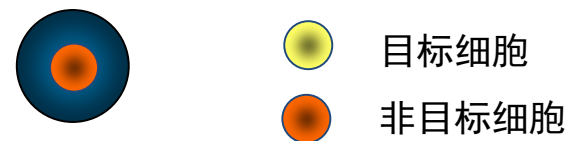
要得到所有含有目标细胞的液滴，但同时含有非目标细胞的液滴除外



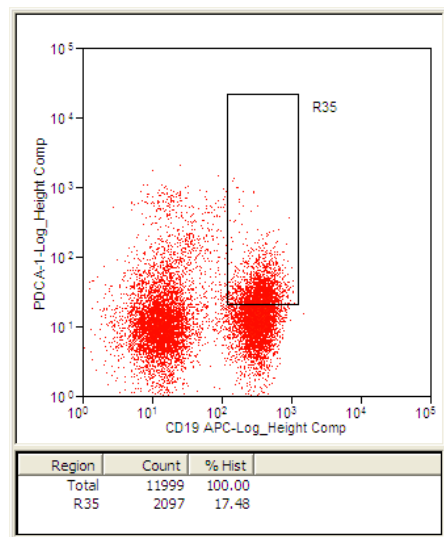
Single mode



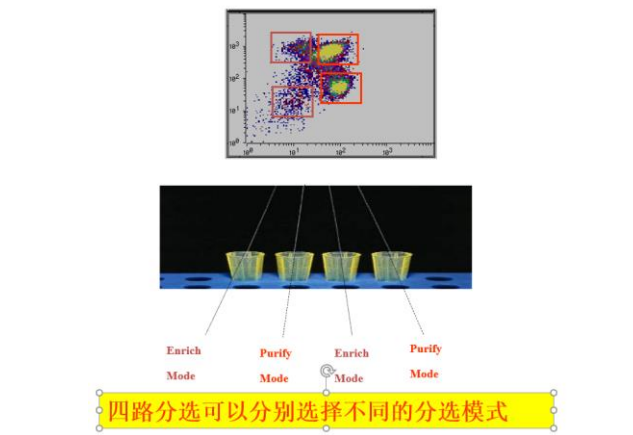
只要只含有一个目标细胞的液滴



独家的混合分选模式：四路分选分别选择不同的模式 既有高纯度细胞，又不浪费任何一个细胞

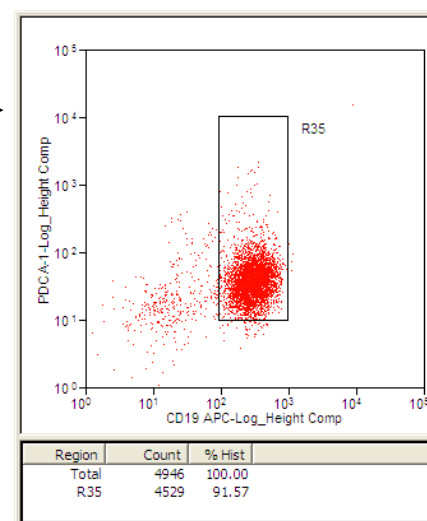
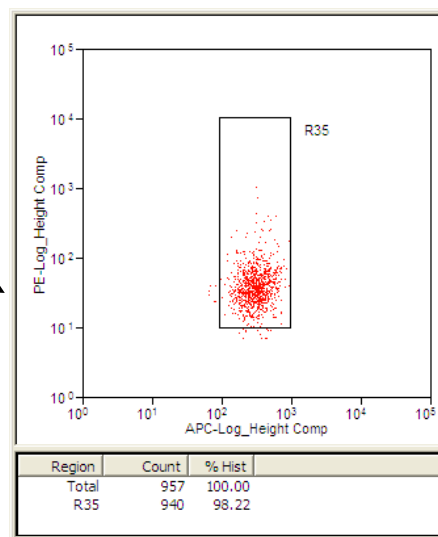


左路：纯化模式



右路：富集模式

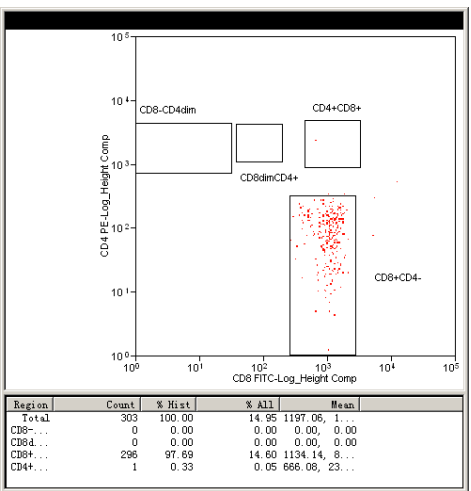
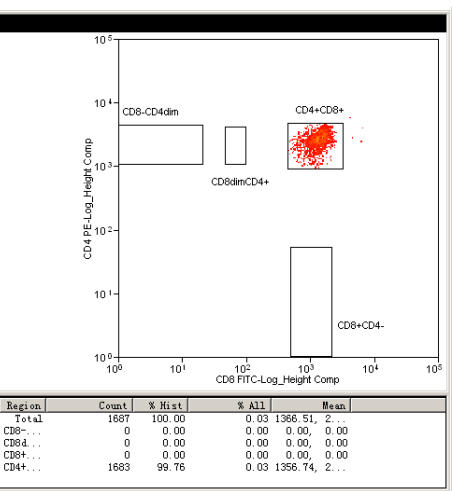
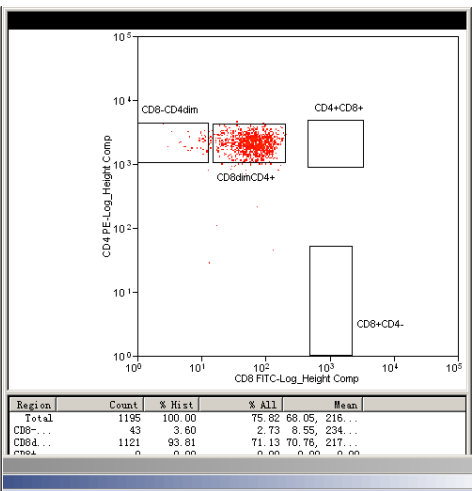
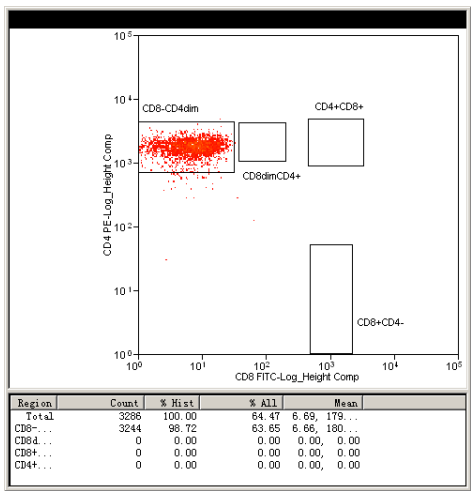
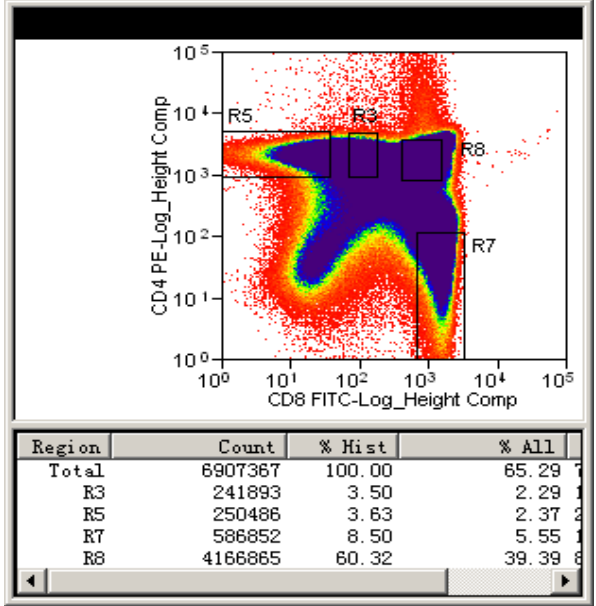
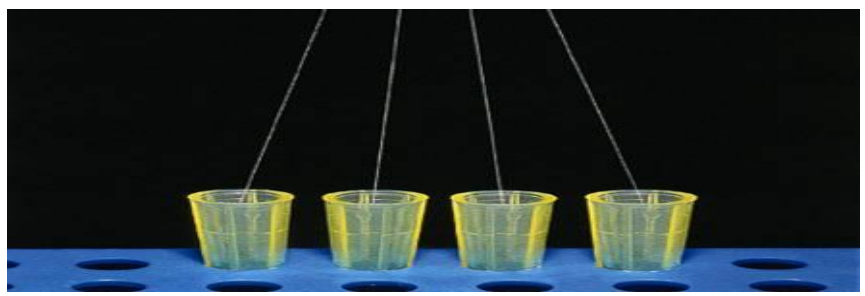
Sorted at >70,000eps for >2hrs



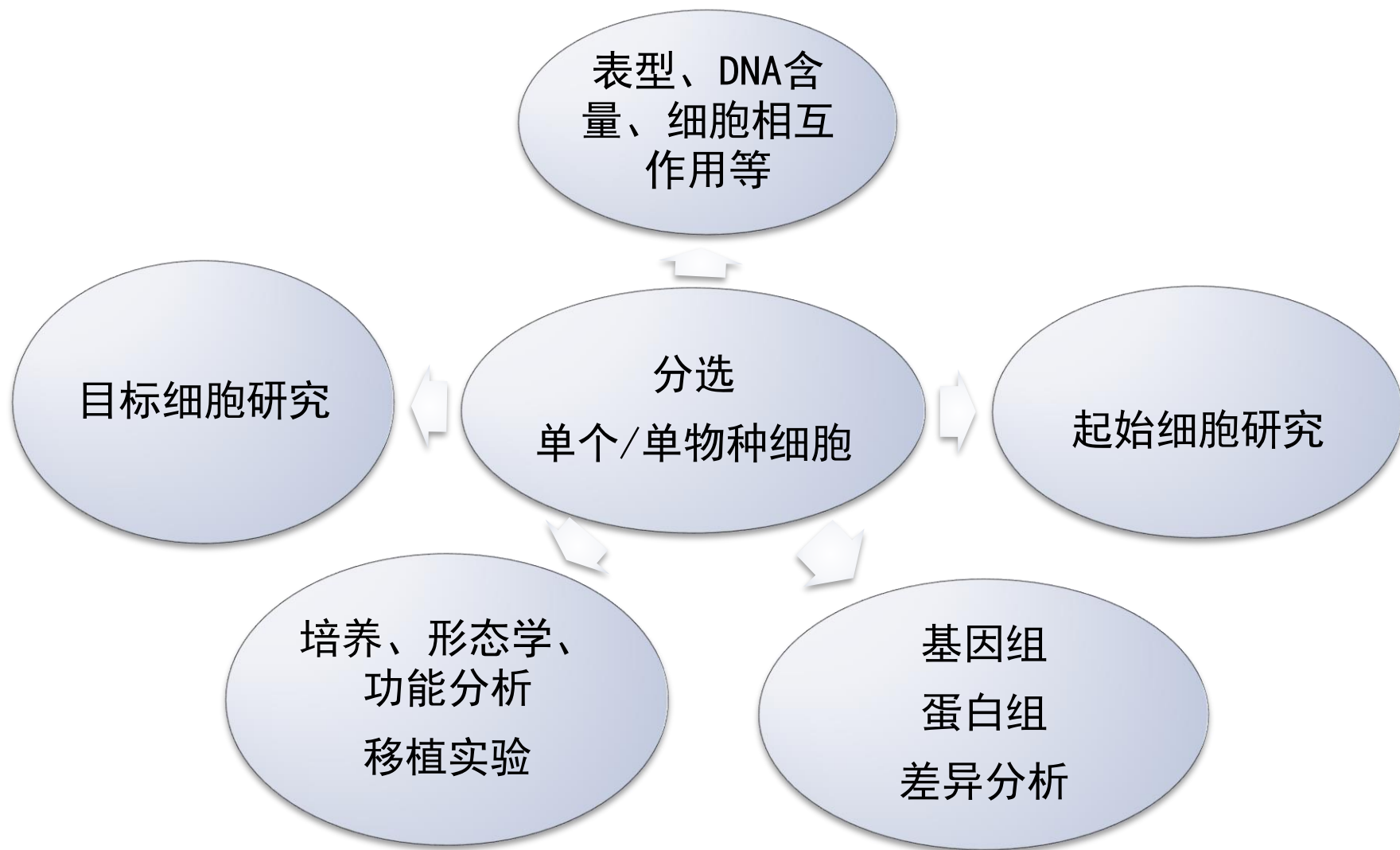
低含量细胞同时进行高速四路分选

小鼠新鲜胸腺细胞，研究T细胞发育：

XDP对700万细胞进行不同分化期亚群的高速4路分选，每群至少收获了20万以上的细胞，解决客户抽提得到足量RNA进行下游工作的问题。



分选



大型分选型流式细胞仪介绍：

可用于植物原生质体/染色体的分选、下游细胞培养、功能测定、动物实验和RNA/DNA/蛋白提取。



超速流式细选分胞系统（美国Beckman公司MoFlo-XDP）

1. 四根激光器：488nm、640nm、**405nm**、561nm可检测15种参数；
2. 分析速度：100,000 cell/sec ；
3. 分选速度：70,000个cell/sec 、 分选纯度> 99%以上、细胞成活率>90%，特别是对含量极低（低于1%）的细胞亚群有很好的分选效果。



高速分选流式细胞仪（美国BD公司AriaIII）特点：

1. 四根激光器：488nm、375nm、633nm、561nm可检测11种荧光和 2种散射光参数；
2. 分析速度：至少100,000 cell/sec ；
3. 分选速度：25,000 cell/sec，分选纯度>99%，细胞成活率>80%。

小型流式细胞仪介绍

分析型流式细胞仪（美国Beckman, CytoFlex S）



1. 四根激光器：分别**405nm**，488nm, 561nm, 638nm，可检测15种参数；
2. 侧向角散射光VSSC最低检测200nm的颗粒；
3. 检测速度：30000 events/s；
4. 绝对细胞计数：无需借助绝对计数管可实现绝对计数；
5. 上样系统：可用12 x 75-mm的流式管和1.5ml、2ml的EP管上样；并配备**自动化96孔板上样系统**。

分析型流式细胞仪（Verse）特点：（美国 BD公司）



1. 二根激光器（488nm、633nm）可检测6种荧光和 2种散射光参数；
2. 分析速度：35000细胞/秒；
3. 绝对细胞计数。

个人型流式细胞仪（Accuri C6）特点：（美国 BD公司）

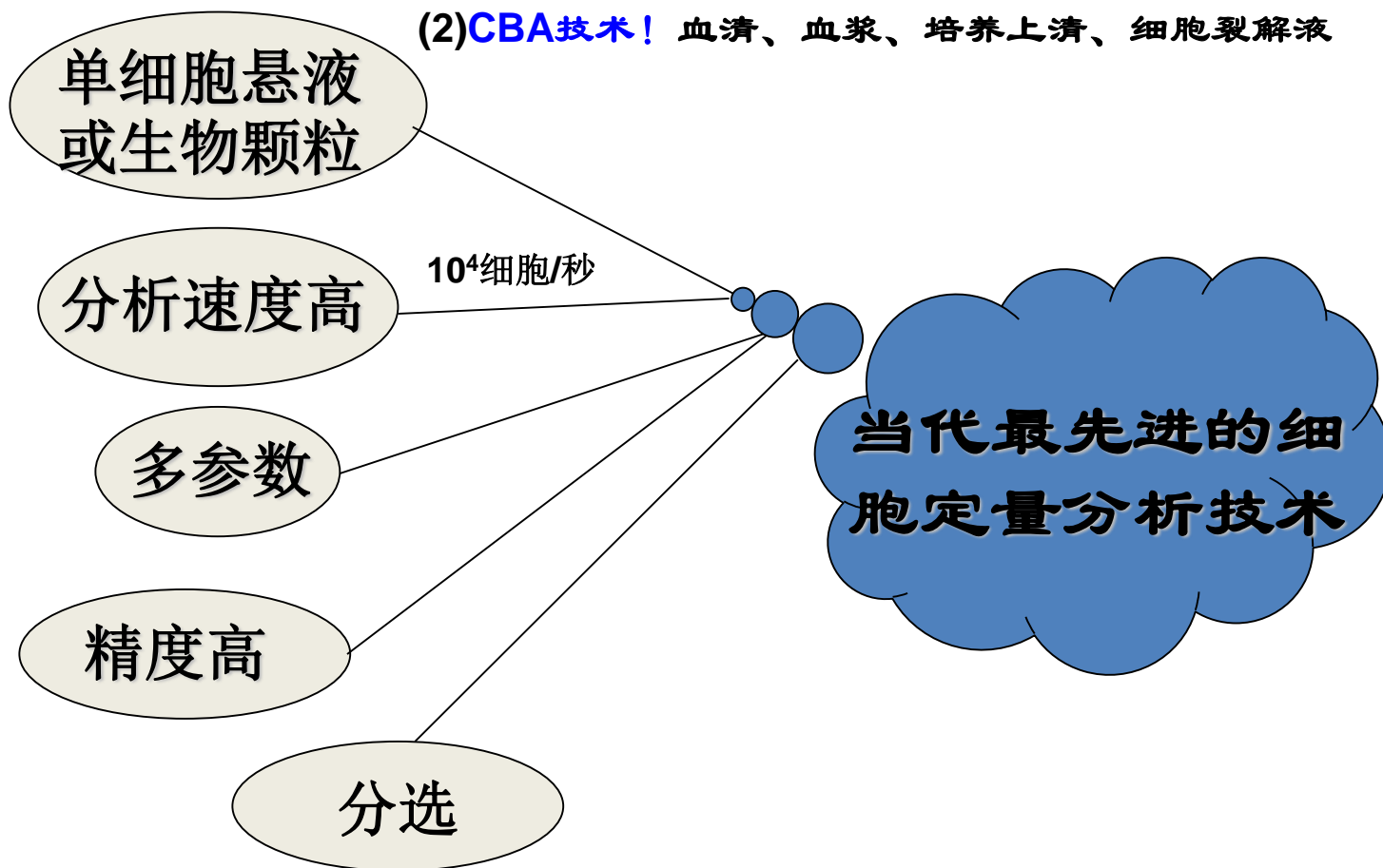


1. 二根激光器（488nm、633nm）可检测4种荧光和 2种散射光参数；
2. 样品获取速度：≥10000个细胞/秒；
3. 绝对细胞计数；
4. 操作方便，无需方案设置和仪器调节。

流式细胞仪特点

(1)外周血，骨髓，细针穿刺，洗脱液，实体组织，培养细胞

(2)**CBA技术!** 血清、血浆、培养上清、细胞裂解液



三、应用及案例分享

1. 流式细胞技术在水生动物中的应用

- ✓ 在水生动物细胞分类和分选中应用
- ✓ 在水生动物遗传育种中的应用
- ✓ 在水生动物细胞免疫功能和免疫机制中的应用

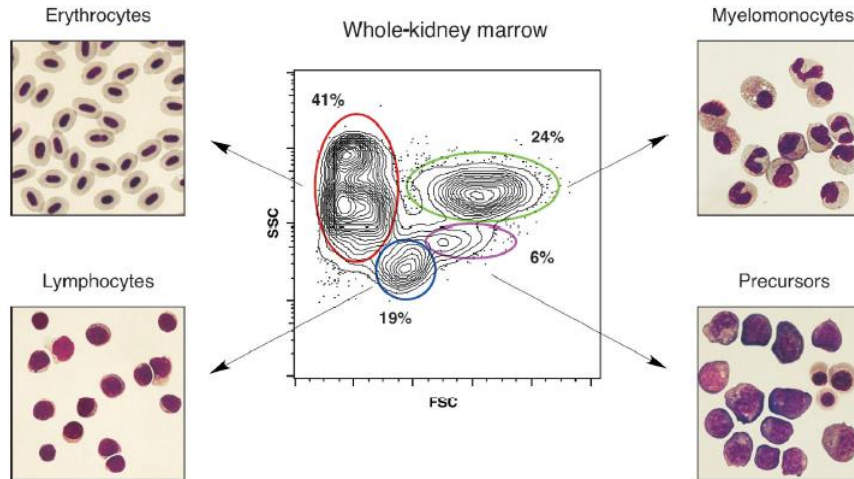
2. 流式细胞技术在水体微型生物中的应用

- ✓ 水环境保护的应用：病毒和细菌的计数、活性检测
- ✓ 水体藻类分类和多样性研究
- ✓ 水体藻类分选应用

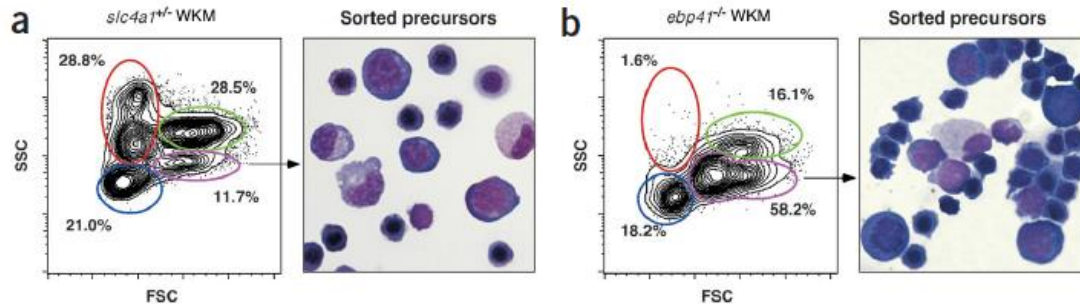
✓ 流式细胞术在水生动物细胞分类和分选中应用

——斑马鱼的血液学研究

Separation of major blood cell lineages from WKM by light-scatter characteristics



Flow cytometry profiling of zebrafish blood mutants



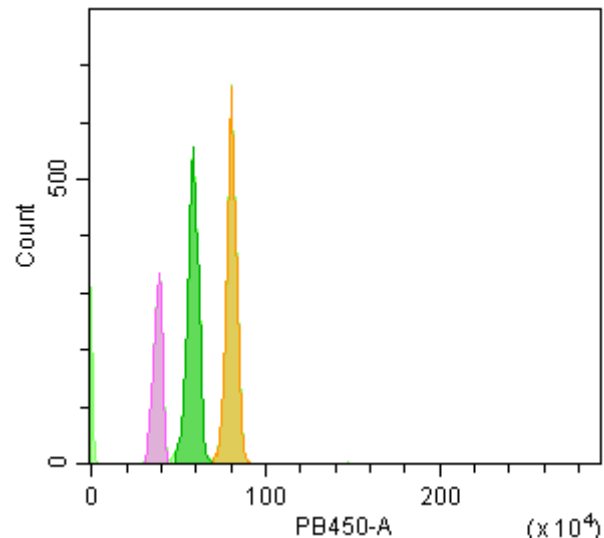
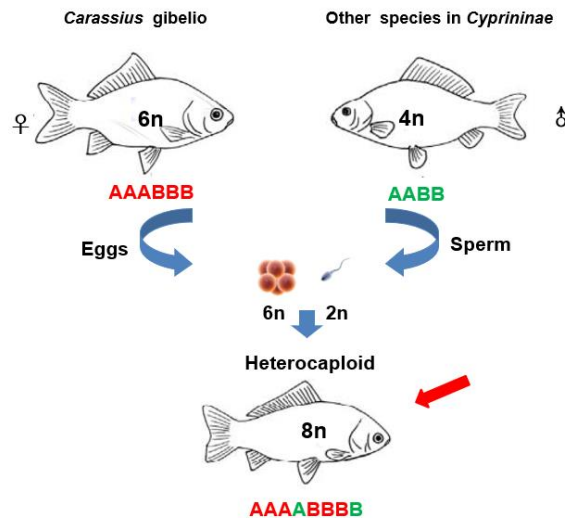
流式细胞术检测斑马鱼血液突变体：
(a) 典型*slc4a1*杂合子突变体WKM的散点分布(左)。分选的前体细胞显示未成熟红细胞元素占优势(右)。(b) 一个典型的*ebp41*纯合突变体的WKM散射谱(左)。分选前体细胞显示几乎所有的细胞都是未成熟的红细胞(右)。

✓ 鱼类遗传育种等相关基础生物学和生物技术研究

——中国科学院水生生物研究所-桂建芳院士



开展多倍体银鲫生殖发育机制研究，证实银鲫存在单性雌核生殖和有性生殖双重生殖方式，原创银鲫育种技术路线，利用银鲫特有的生殖方式，培育出由雄核发育产生的异育银鲫“中科3号”。开拓出一条X和Y染色体连锁标记辅助的全雄鱼培育技术路线。

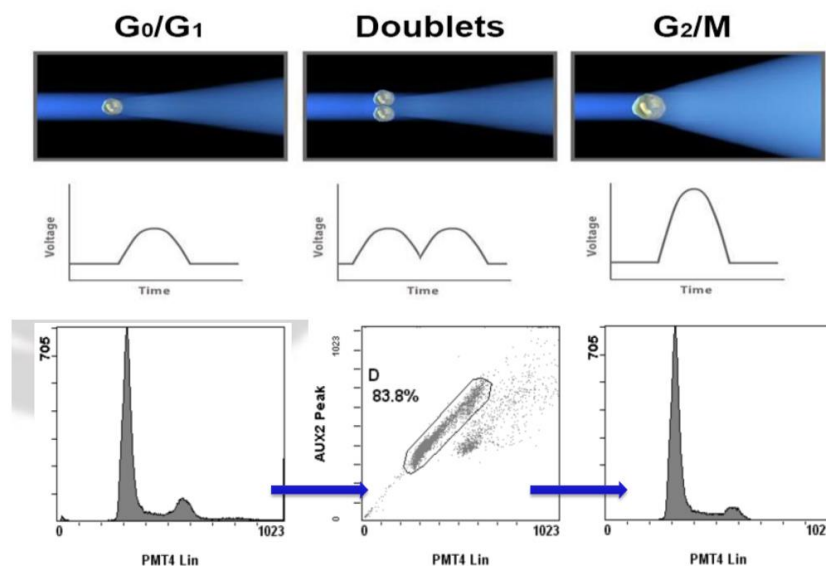
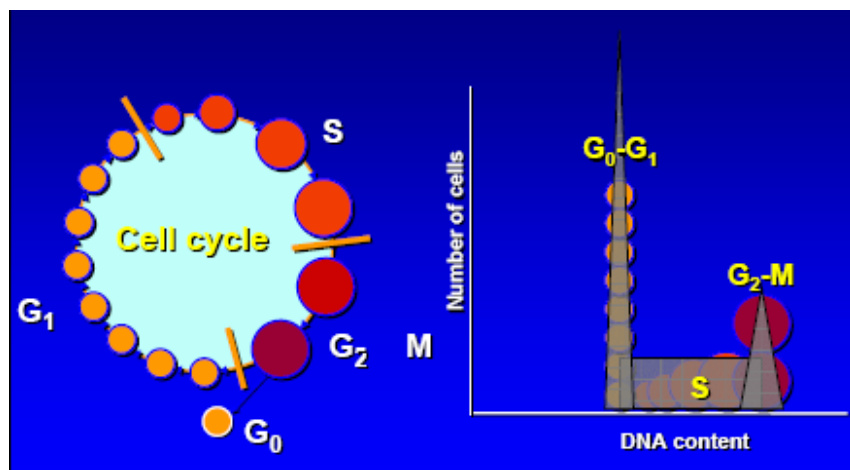


细胞周期及倍性检测

在细胞周期的不同时期，DNA含量存在差异，用DNA染料（如PI）进行染色，可根据DNA荧光强度变化判断细胞所处的细胞周期时期。

常用染料：PI、DAPI、7-AAD、Hoechst 33342...

排除粘连体细胞

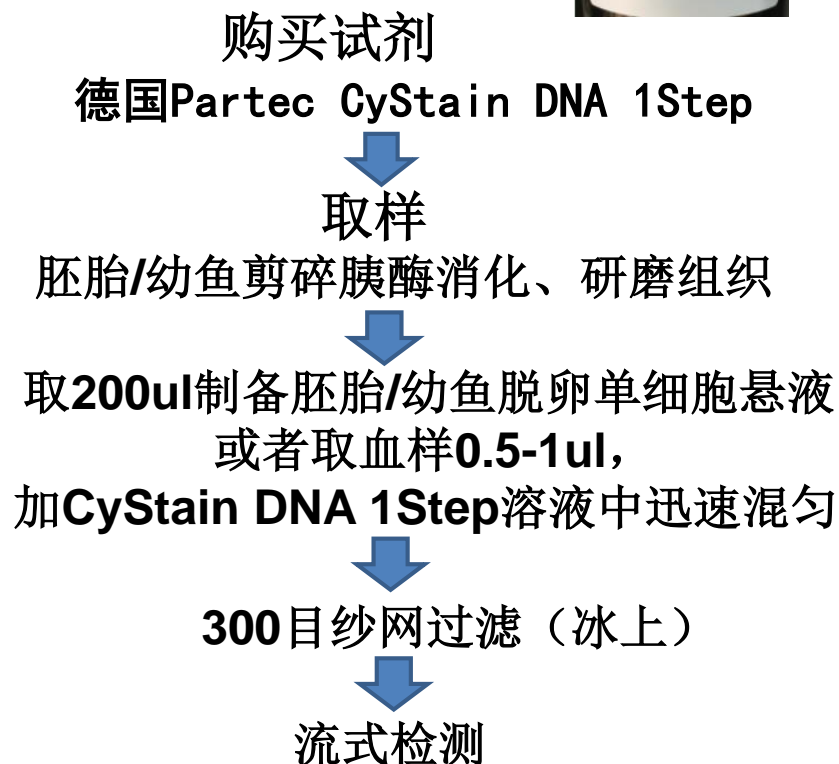


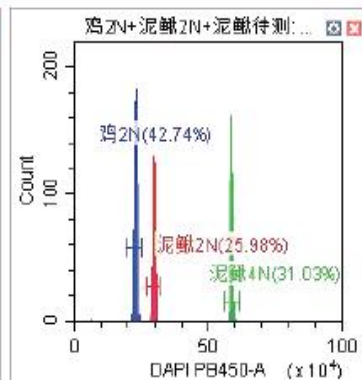
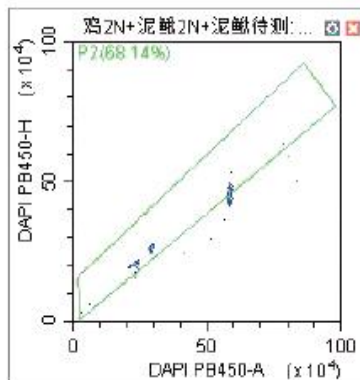
流式细胞仪高通量筛选鱼类育种、 基因突变等方面研究

传统方法



一步法





Tube Name: 鸡2N+泥鳅2N+泥鳅待测

Sample ID:

Population	% Parent	rCV DAPI PB450-A	Mean DAPI PB450-A
泥鳅4N	31.03%	0.57%	588454.4
鸡2N	42.74%	1.67%	229067.8
泥鳅2N	25.98%	0.92%	298976.2

E: 鸡 2N+ 泥鳅 2N+ 泥鳅待测

以鸡红细胞为内参，已知鸡血细胞 DNA 含量值为 2.50 pg/N (Tiersch et al., 1989, Vinogradov, 1998)。

$$1. \text{待测泥鳅 DNA 含量} = \frac{\text{待测泥鳅血细胞 Mean 值}}{\text{鸡血细胞 Mean 值}} \times 2.50 = 6.62 \text{ pg/N}$$

$$2. \text{2N 泥鳅 DNA 含量} = 3.26 \text{ pg/N}$$

$$3. \frac{\text{待测泥鳅 DNA 含量}}{\text{2N 泥鳅 DNA 含量}} = 2.03 \approx 2$$

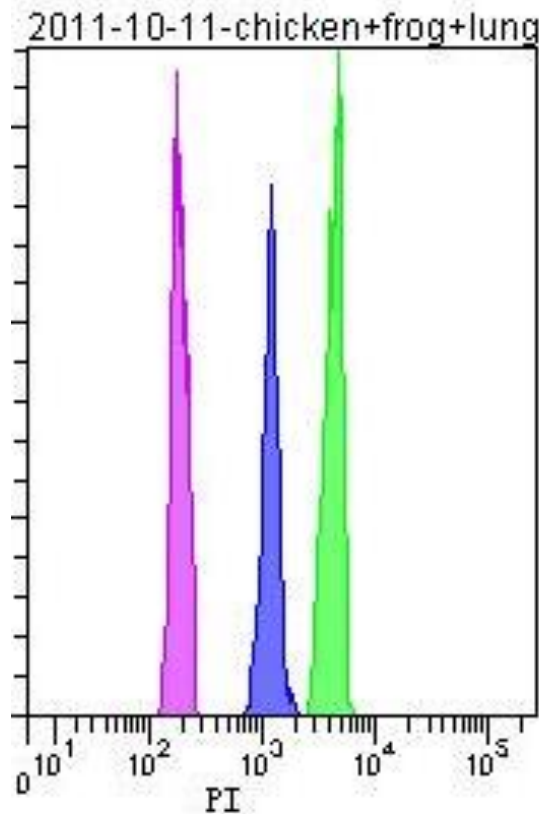
$$4. \frac{\text{待测泥鳅 DAPI Mean}}{\text{2N 泥鳅 DAPI Mean}} = 1.97 \approx 2$$

实验结果说明待测泥鳅样本 DNA 含量为二倍体泥鳅 DNA 含量的二倍，DAPI 平均荧光强度也为二倍体泥鳅的二倍，即待测泥鳅为四倍体。

本实验证明凭借 CytoFLEX 流式细胞仪高达 80 mW 功率的 405 nm 激光与最佳的检测灵敏度，能有效地对 DAPI 染料进行检测，且线性度良好。

水生动物基因组大小检测

流式细胞仪检测肺鱼基因组大小 鸡血、蛙血作为肺鱼标准内参

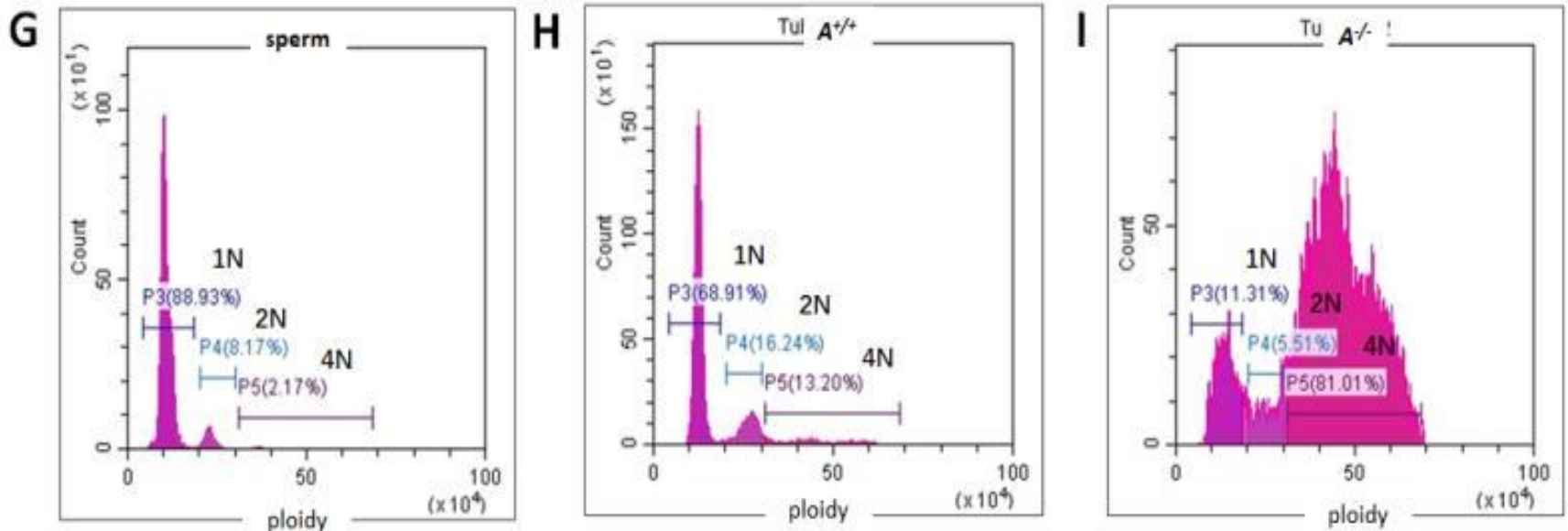


Experiment Name: Experiment_017
Specimen Name: 2011-10-11
Tube Name: chicken+frog+lungfish3
Record Date: Oct 11, 2011 1:57:00 PM
\$OP: Administrator
GUID: cac8aa27-7aaf-46b6-94d0-9afde385d69c

Population	#Events	%Parent	PI
			Mean
lungfish	1,530	9.3	4,195
frog	1,098	6.7	1,174
chicken	1,346	8.2	183

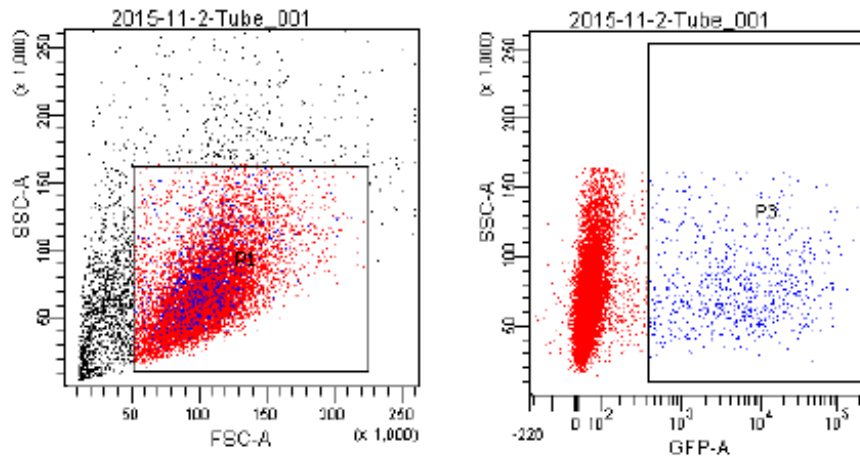
斑马鱼精巢突变体的研究

精子（几乎只有1N），野生型精巢（含精子1N，4N如初级精母，其他的2N如精原细胞等），突变体精巢（从形态学观察没有精子，可能有2N（性腺体细胞），绝大多数可能是4N）



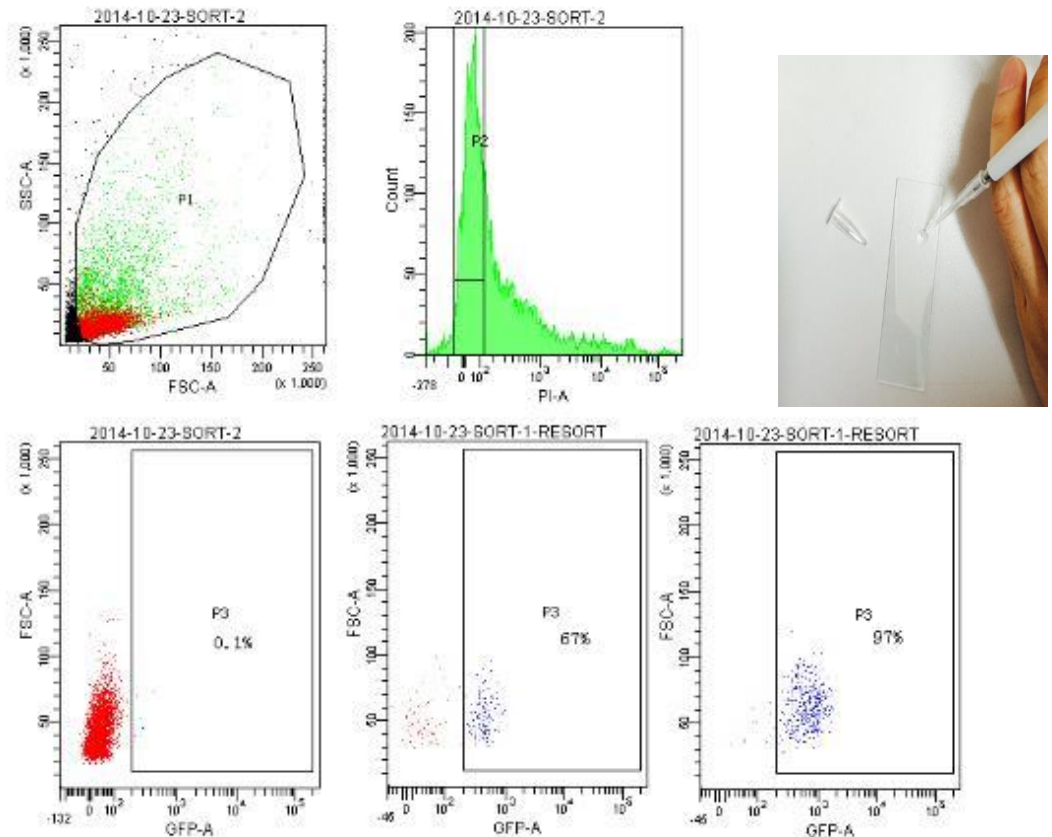
单克隆分选在青鳉精巢多能细胞系中研究（96孔板）

用GFP标记的真核表达质粒转染青鳉细胞系，用流式细胞仪单克隆分选阳性细胞培养成细胞株，鉴定细胞株基因型并开展功能基因研究。



流式细胞仪分选斑马鱼原始生殖细胞的应用

原始生殖细胞 (Primordial germ cell, PGC)：为了探索控制原始生殖细胞发育的关键基因，以斑马鱼为模型，构建在斑马鱼PGC特异表达外源基因的转基因品系，活体荧光标记的方法特异标记原始生殖细胞，利用流式细胞仪分选该类细胞，进行后续转录组测序分析。GFP原始生殖细胞比例极低，一次分选得不到理想纯度，采用二次分选后纯度达到97%，有利于后续测序分析。



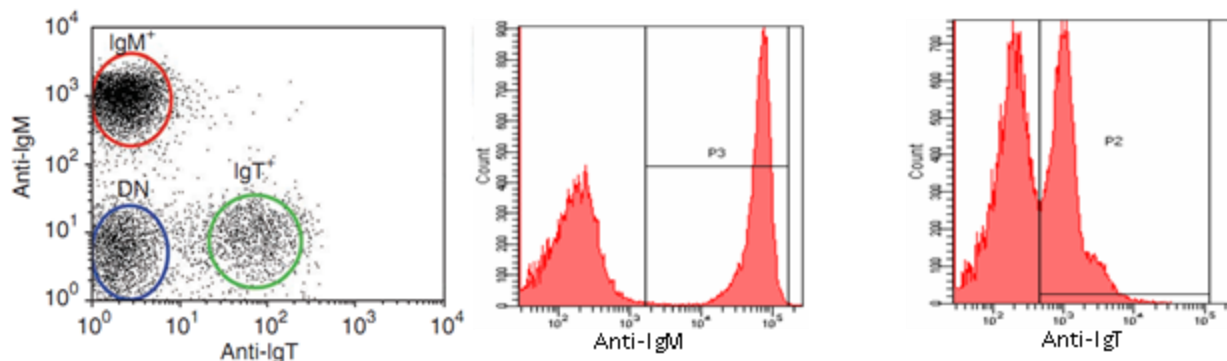
✓ 流式分选术在水生动物细胞免疫功能和免疫机制中的应用 ——在鱼类免疫球蛋白研究

在硬骨鱼中，一直以来都认为只存在IgM和IgD两类比较保守的免疫球蛋白分子，2005年一种新型的免疫球蛋白IgZ/IgT在斑马鱼和虹鳟中被发现，2010年其功能在虹鳟中被验证，与哺乳动物IgA类似在黏膜免疫中发挥主要作用。由IgM和IgT的基因组结构及抗体分选可知，虹鳟体内存在IgM⁺IgT⁻和IgM⁻IgT⁺两种类群的B淋巴细胞。



结果

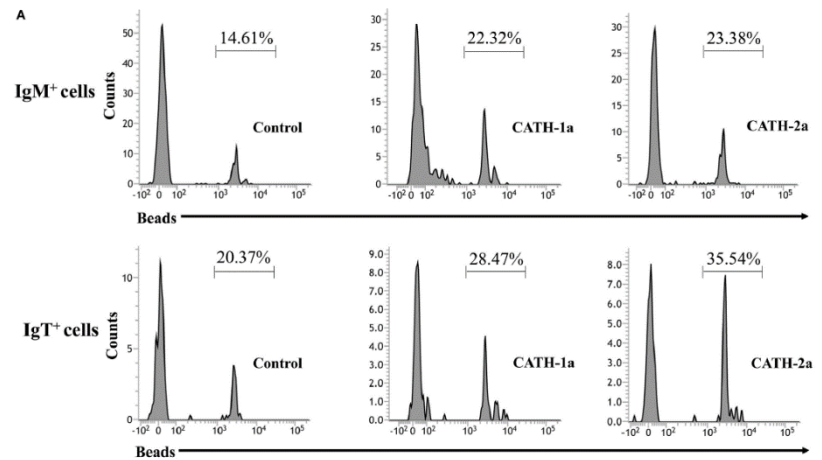
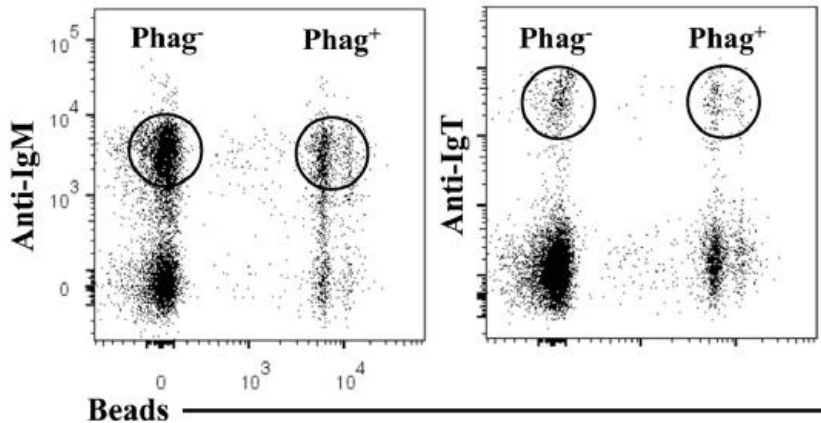
利用抗IgM和IgT的抗体可以将虹鳟PBL中的B淋巴细胞分为IgM⁺IgT⁻和IgM⁻IgT⁺两种类群。为后续研究IgT的功能奠定基础。



流式分选术在鱼类B细胞研究中的应用

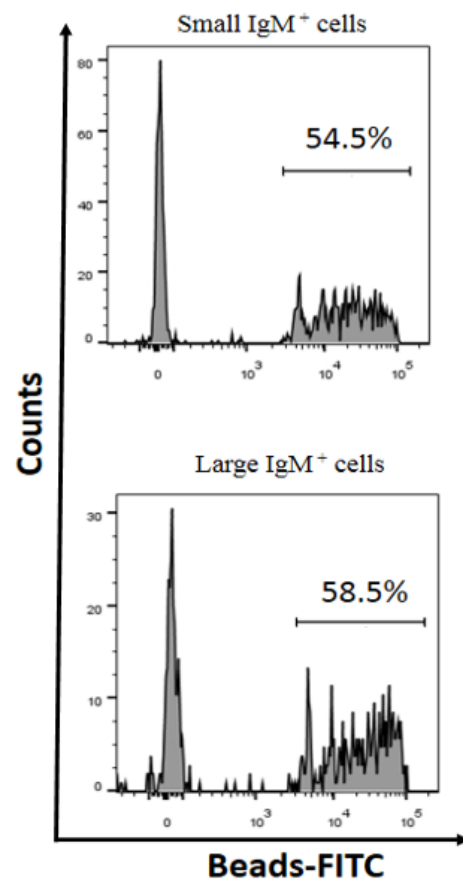
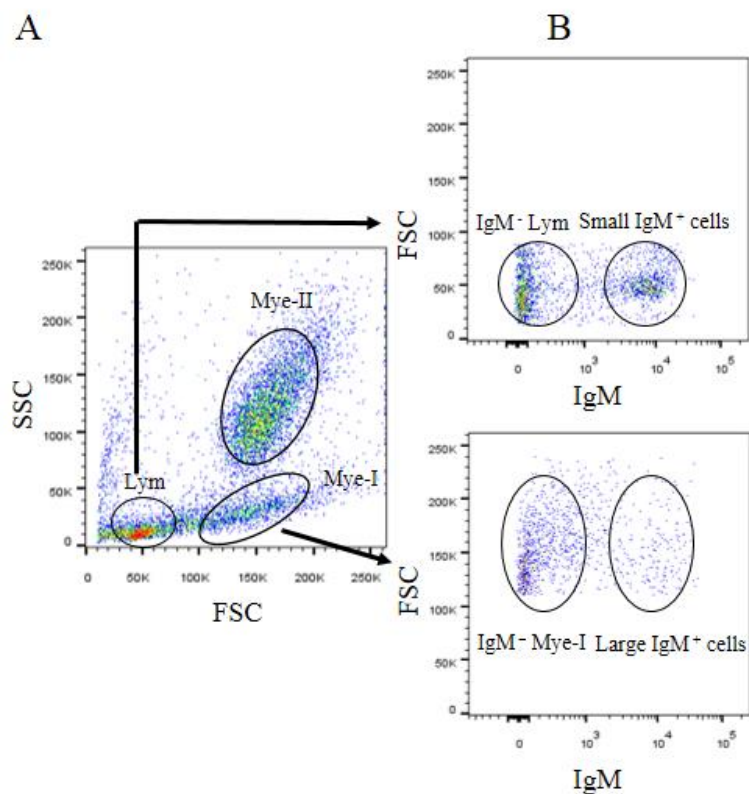
在哺乳动物中，吞噬作用主要由专职吞噬细胞（例如单核细胞和巨噬细胞）来完成，而B细胞缺乏吞噬能力；但是在硬骨鱼类中，B细胞具有吞噬能力，硬骨鱼类B细胞在先天免疫中有着某些不同于哺乳类B细胞的功能，同时也预示着B细胞和巨噬细胞之间可能存在着进化上的关系。

抗菌肽是先天免疫中的一类重要分子，可以调节巨噬细胞的功能，在虹鳟中，抗菌肽能够促进B细胞的吞噬活性，为阐明B细胞和巨噬细胞之间进化上的关系提供了新的证据。



草鱼头肾白细胞可以分为三群，淋巴细胞，髓样细胞亚群I和髓样细胞亚群II。在淋巴细胞和髓样细胞亚群I中都存在IgM⁺ B细胞。

草鱼大IgM⁺ B细胞和小IgM⁺ B细胞都具有吞噬能力，但其吞噬能力无明显差别。

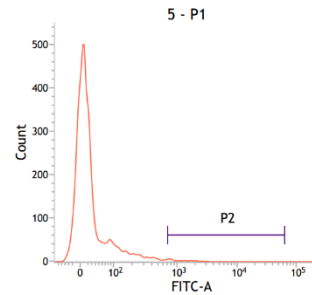
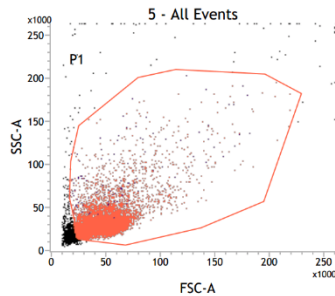
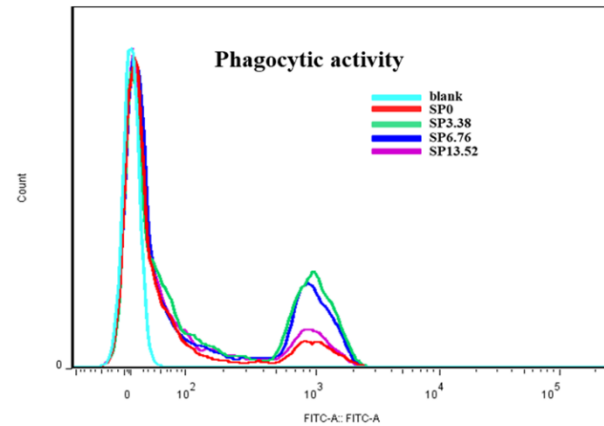
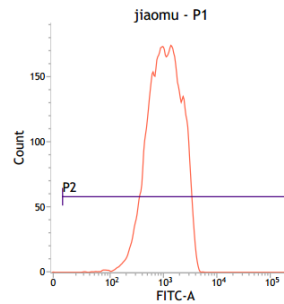
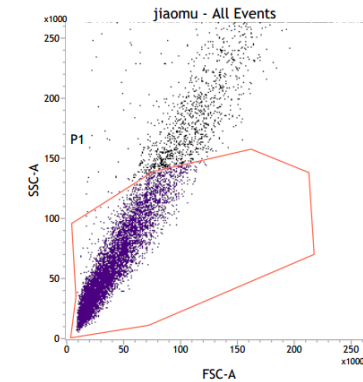


免疫毒理：活性氧簇（ROS）检测

- **呼吸爆发活力**常作为反映水生生物免疫状况的重要指标。
- **原理**：当病菌侵入机体时，具免疫功能的细胞通过吞噬和杀菌作用杀灭病原，在吞噬杀菌过程中产生大量还原性物质，如 H_2O_2 、超氧阴离子(O_2^-)等活性氧簇（ROS），这一过程称为“呼吸爆发”。
- **应用**：受外界胁迫环境的诱导，盐度、pH、温度、重金属等环境应激均会导致ROS的大量上升，因此ROS含量也是反映水生生物是否受到不良因素胁迫的重要指标，可作为环境污染物胁迫的评价指标。
- **检测手段**：ROS在生物体内的寿命很短，建立一种更加快速、灵敏的ROS检测方法尤为重要。

水生生物免疫毒理评价-呼吸爆发 (ROS)

饲料中添加不同藻粉比例对异育银鲫血液白细胞的吞噬活性的影响



采用流式细胞技术，经荧光染色，分析鱼体头肾、血液等组织中白细胞呼吸爆发（左上列）和吞噬活性（左下列）。



2. 流式细胞技术在水体微型生物中的应用

- ✓ 水环境保护的应用：病毒和细菌的计数、活性检测
- ✓ 水体藻类分类和多样性研究
- ✓ 水体藻类分选应用

流式细胞仪技术优势

以其样品制备简单、可进行快速多参数数据采集、测定精确、不易受溶解有机物的干扰等优越性而成为水生和环境微生物学研究的重要工具。

根据微粒的荧光特性反映出浮游微型生物的大小、形状、结构或者是色素类型，从而对浮游微型生物进行定量和定性研究。对单个细胞进行分选，方便对不同种浮游生物进行分离和富集培养。

水体中微生物特点：

- 个体微小
- 数量巨大
- 水中悬浮性
- 种类繁多
- 功能复杂
- 分布广泛

流式细胞仪特点：

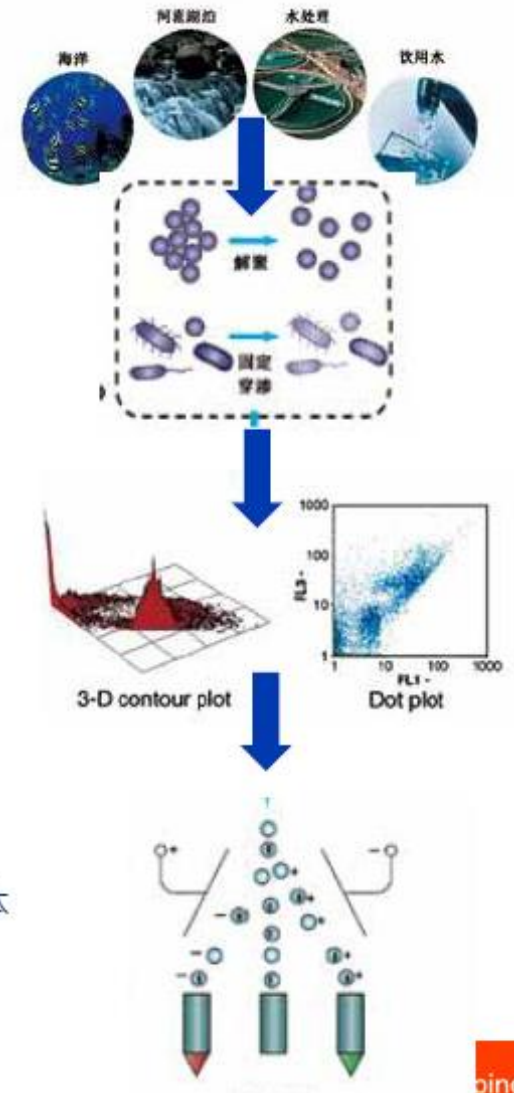
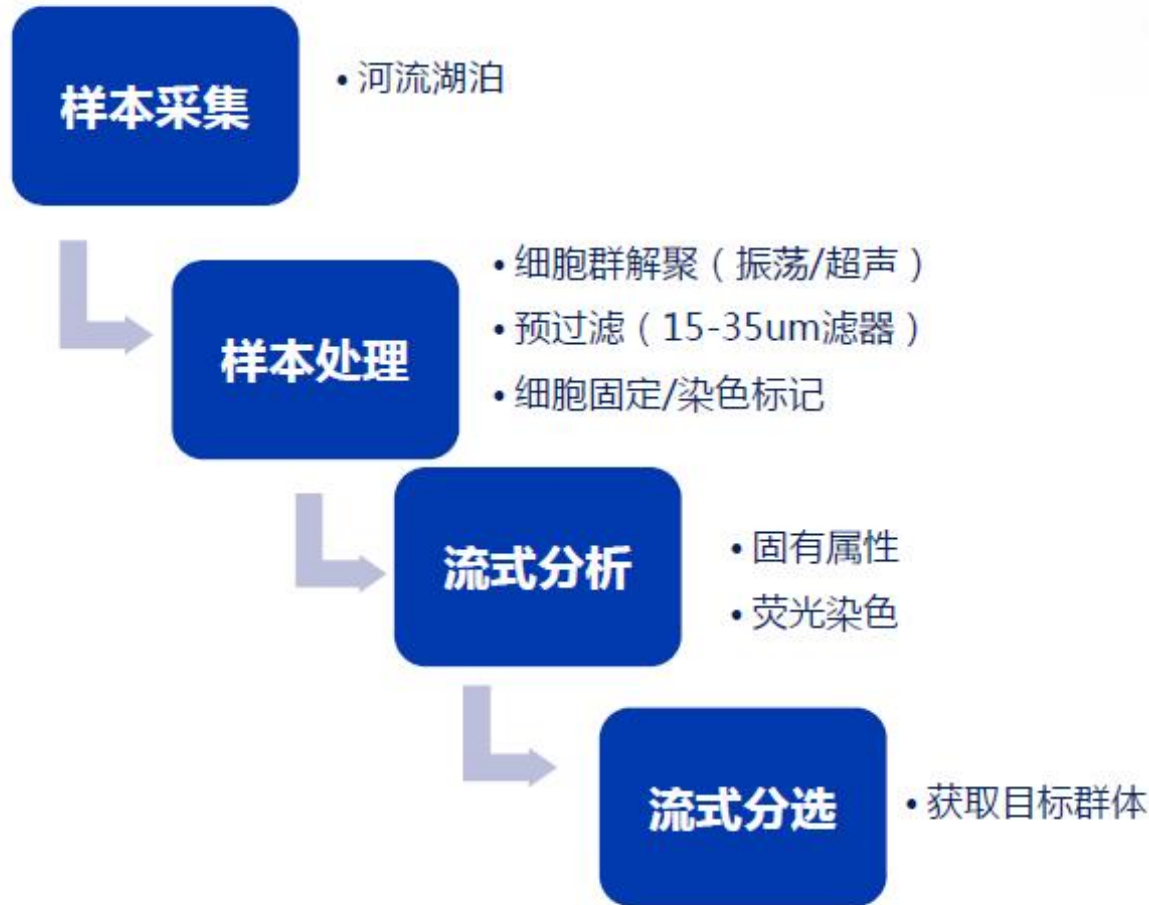
- 灵敏度高；
- 分析速度快；
- 精确度高；
- 多参数分析；
- 具有分选功能；



根据藻类自发荧光定义水体中的藻类

自发光	激发波长	发射波长
叶绿素a (Chlorophyll a)	400-600 nm 480 nm, 650 nm	680 nm
藻蓝素 (Phycocyanin)	400-620 nm 610 nm	660 nm
藻红素 (Phycoerythrin)	400-550 nm 550 nm	580 nm

流式细胞术在水体研究中的应用策略



流式细胞术研究水体微生物中常用荧光染料和探针

	探针名称	Ex. (nm)	Em. (nm)	靶点特征
生物物质组成	Autofluorescence	488	>600	叶绿素 a, 藻红蛋白等色素成分
	叶绿素 a 的自发荧光一般在流式细胞仪 FL3 通道检测, 而藻红蛋白利用 FL2 通道检测。			
	BODIPY 505/515	505	515	油脂和脂质成分
	BODIPY 505/515 是一种类近红外的短波长荧光染料, 可以特异性地作用于中性脂组成的油滴, 使得油滴可以被检测, 且其发射波长可以避免大部分藻自身叶绿素荧光的干扰。			
	Nile red	549	628	脂质 (极性, 中性) 和油脂
	Nile red 是一种脂溶性的荧光染料, 能够与活体细胞内的中性脂或其他脂类物质发生反应。Nile red 与细胞中性油脂反应后, 在激发光波长 450-500 nm, 发射光波长大于 528 nm 时, 呈现黄色荧光; 而与极性脂反应后, 在激发光波长 515-560 nm, 发射光波长大于 590 nm 时, 观测到的是红色荧光。			
核酸	DAPI	358	461	DNA 含量、细胞周期
	DAPI 是一种具有蓝色荧光的 DNA 染料, 在结合 DNA 后荧光强度可增强 20 倍以上。该染料对完整细胞膜无穿透作用, 可用于死细胞的染色。			
	Hoechst 33342	352	461	DNA 含量、细胞周期
	Hoechst 33342 是一种细胞膜通透性的核酸染料。当结合 dsDNA 时会发射蓝色荧光, 一般用于细胞周期以及细胞凋亡研究。			
	Propidium iodide (PI)	536	617	核酸含量、细胞活力、细胞周期
	PI 一种带有红色荧光的核染料, 由于不能穿透完整的细胞膜, 因此可用于鉴别死细胞群。			
	PicoGreen	480	520	DNA 含量、细胞活力、细胞周期
	Picogreen 染料是一种新型的 dsDNA 染料, 性质与 SYBR Green I 类似。			
	SYBR Green I	497	520	核酸含量、细胞周期
	SYBR Green I 是极其灵敏的核酸染料, 在结合 dsDNA 时发出明亮的绿色荧光。该染料可以通透完整的细胞膜, 因此对于活细胞也具有染色作用。			
	SYTO 9/13	483/ 488	503/ 509	核酸含量、细胞周期
	SYTO 9/13 是一种细胞膜通透性的核酸染料, 结合核酸是可以发出明亮的绿色荧光。			
	SYTO RNaselect	490	530	RNA 含量
	SYTO RNaselect 是一种细胞膜通透性的 RNA 染料。			
	SYTOX Green I/II	504	523	核酸含量、细胞活力、细胞周期
	SYTOX Green 是一种出呈绿色荧光的核染料, 该染料不能透过完整细胞膜, 因此可用于死细胞群的染色和鉴别。			
	TOTO-1	514	533	核酸含量、细胞活力、细胞周期
	TOTO-1 与 DNA 具有高度的亲和力, 但不渗透膜, 因此可用于死细胞的计数。			
膜电位	CTC	450	630	电子转移、膜活性
	CTC 是一种无色的细胞膜可渗透性物质, 可以被细菌细胞通过电子传递链还原, 在细胞内形成红色荧光物质 CTF (CTC-Formazan), 可用于活细胞的检测。			
	DHR 123	505	534	活性氧自由基
	DHR 123 是一种无电荷、无荧光的 ROS 指示剂, 可被动扩散通过细胞膜, 在细胞内被氧化成为阳离子型 Rhodamine 123, 定位于线粒体并发出绿色荧光。			
	DiOC6(3)	484	501	膜电位、呼吸速率
	DiOC6(3) 是一种细胞膜通透性的染料, 呈绿色荧光; 它是一种选择性结合活细胞线粒体的脂溶性染料。该染料在高浓度情况下, 也可以对内膜进行染色, 如内质网等。			
	DHR 123	505	534	活性氧自由基
	TMRM 是一种细胞膜通透性的阳离子染料, 呈橙红色荧光, 可以被活性线粒体摄取, 因此可用于细胞活力研究。			

酶活性

探针名称	Ex. (nm)	Em. (nm)	靶点特征
Calcein-AM	494	517	非特异性酯酶活性、细胞活力
Calcein-AM 是一种能渗透细胞的染料, 可用于测定大多数真核细胞的活力。在活细胞中, 细胞内的酯酶水解乙酰氧甲酯之后, 非荧光的 Calcein-AM 转化为绿色荧光 Calcein。			
Carboxy-H2DFFDA	478	518	活性氧自由基
Carboxy-H2DFFDA 是一种还原性的乙酰化形式的 fluorescein, 可以被用做 ROS 指示剂。在活细胞中, 无荧光的 Carboxy-H2DFFDA 会在细胞酯酶和氧化作用下转化为发绿色荧光的产物。			
CFSE	492	517	非特异性酯酶活性、细胞分裂
CFSE 是可固定、可渗透细胞的荧光素示踪剂, 可用于细胞的长时间标记。			
CMFDA	485	538	非特异性酯酶活性、细胞活力
CMFDA 试剂是可透过活细胞膜自由扩散的荧光氯甲基衍生物。进入细胞后, 这些温和的硫醇反应性探针就会与细胞内组分反应, 发出绿色荧光。			
ELF 97 – phosphate	345	530	碱性磷酸酶活性
ELF - 97 phosphate 在被磷酸酶水解后形成明亮而又稳定的黄绿色荧光产物。			
Fluorescein diacetate (FDA)	492	519	非特异性酯酶活性、细胞活力
FDA 即荧光素双醋酸酯, 是一种非极性化合物, 可以穿透完整细胞膜结构, 进入细胞后可以被酯酶催化分解, 释放荧光素 (Fluorescein); 而荧光素是一种极性化合物, 不易透过细胞膜, 在蓝色激发光下, 荧光素发出黄绿色的荧光。			
H2DCFDA	505	535	活性氧自由基、呼吸速率
H2DCFDA 为活性氧族的细胞渗透性指示剂, 细胞内的酯酶和细胞中的氧化反应将其醋酸基团去除之前, 这种指示剂不会发出荧光。			
Hydroethidine, dihydroethidium (HE)	510	595	过氧化物酶活性
HE 是一种超氧化物指示剂, 在被氧化后呈蓝色荧光, 并与细胞核内的 DNA 结合形成红色荧光。			
Rhodamine 123	507	529	线粒体膜电位、细胞活力
Rhodamine 123 是一种细胞膜通透性的、阳离子型染料, 可以被活性线粒体摄取并发出绿色荧光。该化合物可用于评价线粒体膜电位。			

✓ 水环境保护的应用：病毒和细菌的计数、活性检测

- 水源中细菌的研究：基本的需要是菌体计数；
- 常规计数方法：

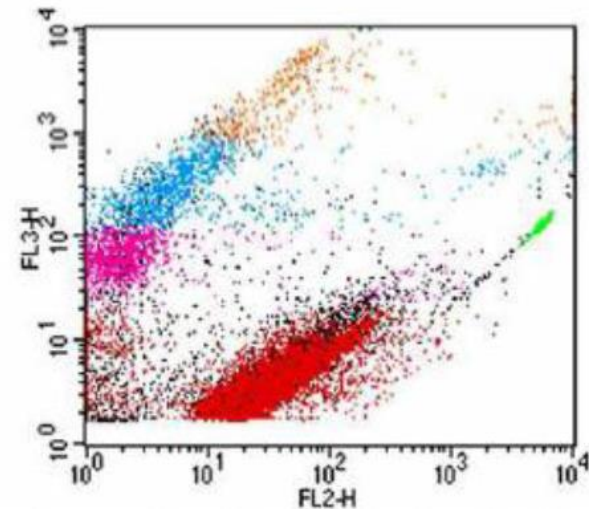
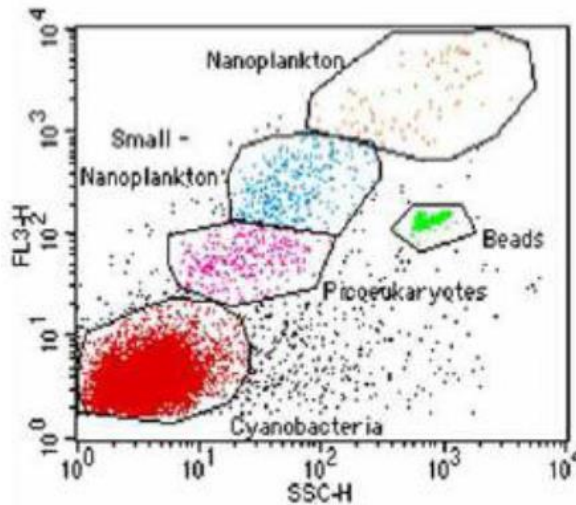
①平板法培养法；②通用的显微技术

局限性：误差大、耗时长，且平板法只能计数活菌

- 流式细胞仪用于菌体计数：
 - 1) 快速得到细菌总数；
 - 2) 若检测的是一定体积样品中的菌数，即得知菌浓度；
 - 3) 可区分活菌和死菌，获得活菌百分比。

藻类计数

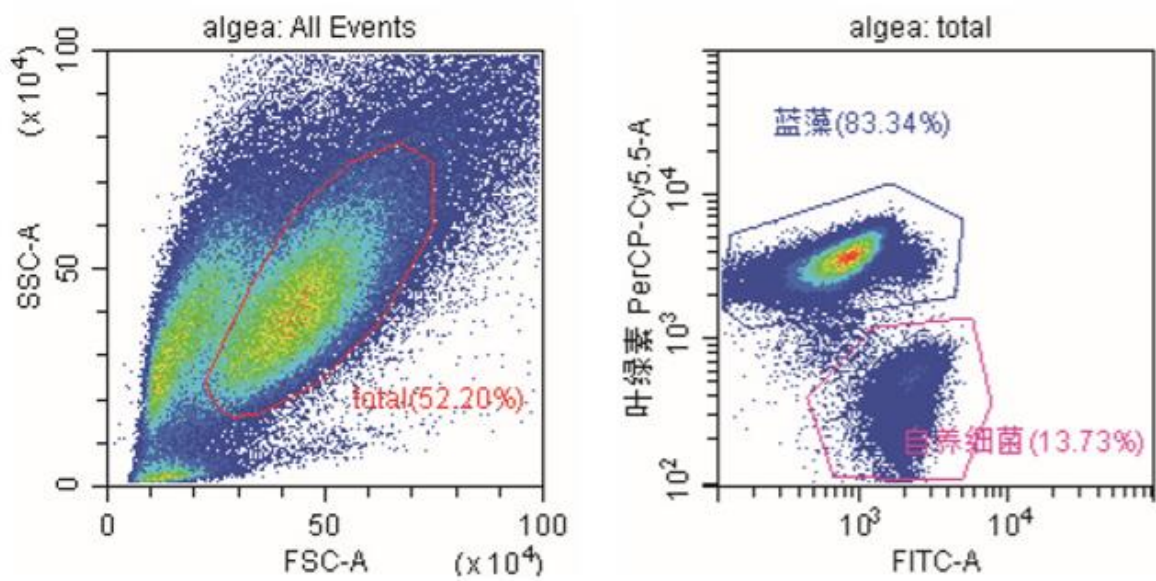
- 绝对计数：
 - A. 通过流式细胞仪直接计算出上样体积；
 - B. 根据已知浓度的计数微球进行计算；



$$\text{Number of cells} = (\text{cell events/beads events})^* \\ (\text{bead number}/\mu\text{l})^* \text{Dilution Factor}$$

蓝藻计数

蓝藻是水体中的常见藻类，在适宜的温度下会大量生长，导致“绿潮”，是水质检测中常见的检测项目。蓝藻富含叶绿素，叶绿素在蓝光激发下有红色自发荧光，流式利用这一特性将蓝藻与水中的自养细菌区分并计数。



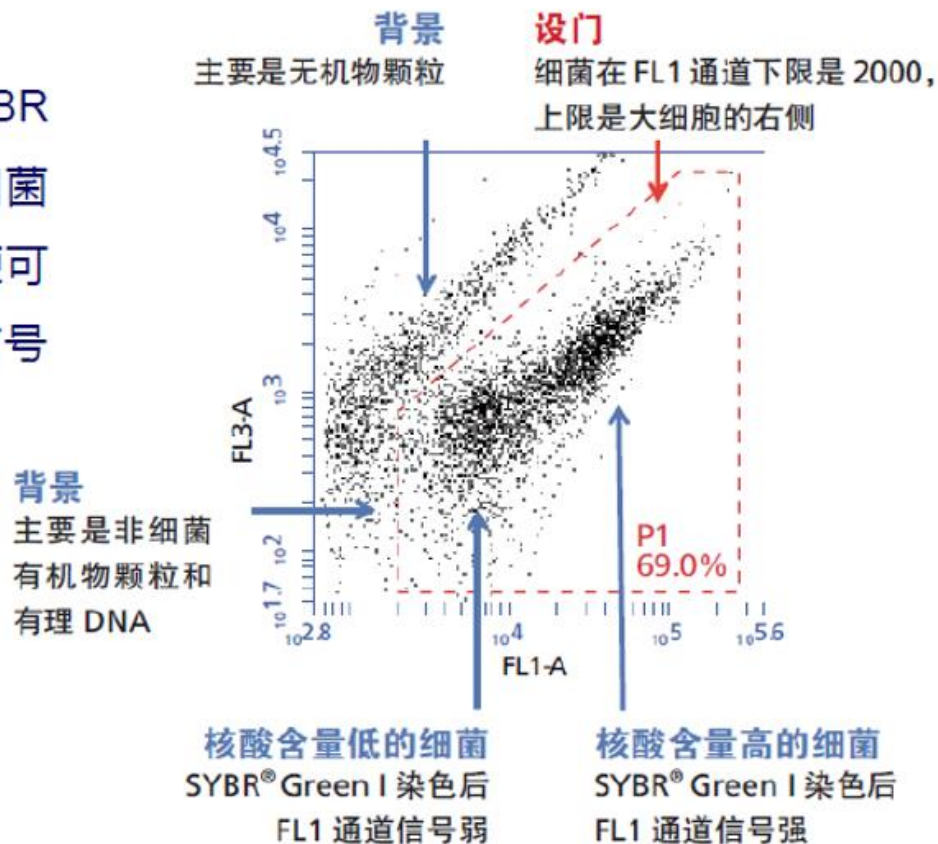
Tube Name: alga
Sample ID:
Volume(μL): 3.7

Population	Events	% Parent	Events/μL(V)
● 蓝藻	77090	83.34%	20704.57
● 自养细菌	12697	13.73%	3410.12

水环境污染的监测：细菌计数

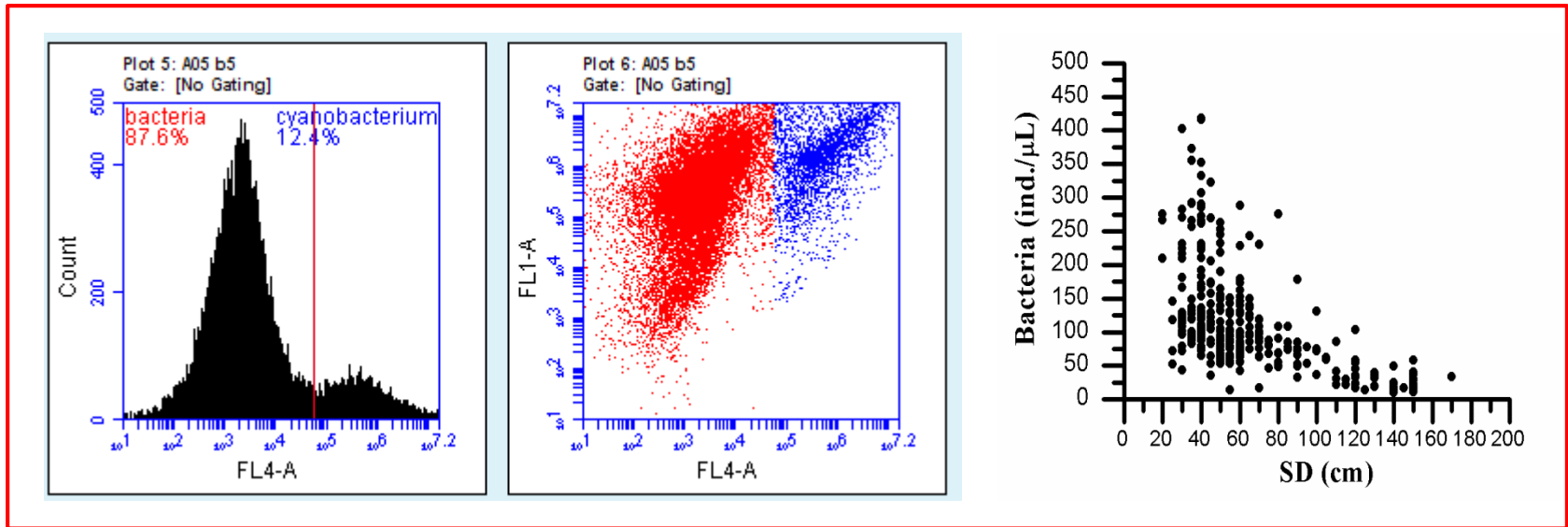
流式检测原理：

利用合适的核酸荧光染料（如SYBR Green I, SYTOX Green I 等）对细菌DNA进行染色后，使用流式细胞仪便可以对这些微小的微生物细胞从背景信号中检测出来，并进行分群。



蓝藻和浮游细菌生物量的动态变化及其对湖泊水体透明度的影响

Bacterioplankton dynamics and its relations to the transparency of Lakes Chunbo Wang, Xingqiang Wu, Bangding Xiao* (滇池)



用流式细胞仪BD Accuri C6 分析水样中浮游细菌的生物量。采集的水样用40 μ m细胞过滤器过滤之后用with SYBR Green I染色，再用流式细胞仪分析。图中红色的部分表示细菌，蓝色的部分表示小于40 μ m的蓝藻。

应用举例：研究重金属对微藻数量的影响

- 利用流式细胞仪，通过藻类自发荧光和侧向角信号，对藻类计数，绘制出微藻生长抑制曲线，分析重金属离子铜和铅对5种海洋微藻的生长抑制。

Ecotoxicology and Environmental Safety 72 (2009) 1503–1513



Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoenv



2.5. Flow cytometry analysis

Samples for analysis by flow cytometry were collected from the toxicity tests after 72 h of treatment. These were analysed using a **FACScalibur** flow cytometer equipped with a 488 nm excitation argon laser and the data were computed with CellQuest software (Beckton-Dickinson). Each culture was immediately analysed for 30–60 s (6000–10,000 events per measurement) from samples previously fixed with 3–4% formaldehyde. Counts, signals of side-angle light scatter (SSC), and autofluorescence (FL3, >630 nm) were recorded and used as indicators of the cellular size and chlorophyll fluorescence, respectively (Sobrino et al., 2004).

Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae

Bibiana Debelius^{a,*}, Jesús M. Forja^a, Ángel DelValls^a, Luis M. Lubián^b

^a Departamento de Química-Física, Universidad de Ciencias del Mar y Ambientales, Avda República Saharaui, s/n, 11510 Puerto Real, Cádiz, Spain

^b Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, Avda República Saharaui, 2, 11510 Puerto Real, Cádiz, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 September 2008

Received in revised form

2 April 2009

Accepted 4 April 2009

Available online 8 May 2009

Keywords:

Copper

Lead

Marine microalgae

Exposition toxicity tests

Toxic cellular quota

Accumulation

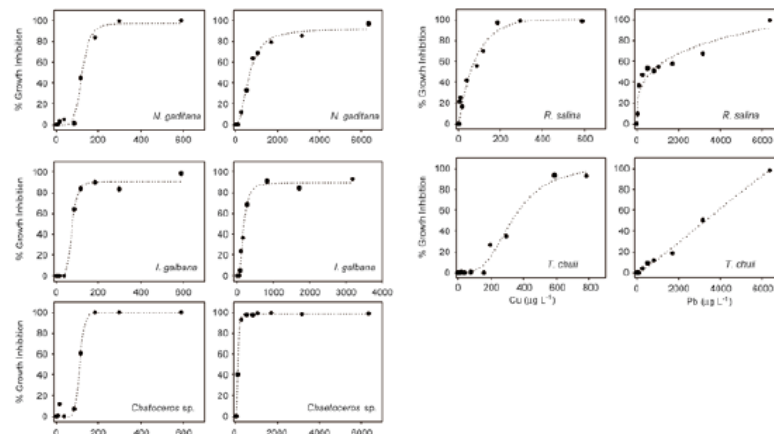
Growth inhibition

ABSTRACT

On five marine microalgae with the same biovolume quantity (*Tetraselmis chuii*, *Rhodomonas salina*, *Chaetoceros* sp., *Isochrysis galbana* (T-iso) and *Nannochloropsis gaditana*) 72-h exposure toxicity tests with copper and lead were performed. For both metals, 72-h EC₅₀s showed *T. chuii* as the most tolerant and *R. salina* as one of the most sensitive. Besides copper and lead EC₅₀ concentrations, metal concentrations in solution and accumulated on/in the cell were also analysed. *T. chuii*, the most tolerant species accumulated high copper concentrations (EC_{50(Cu)} = 330 μg L⁻¹; EC_{50(Pb)} = 2600 μg L⁻¹), and *R. salina* the most sensitive to copper, accumulated the highest amount of this metal (EC_{50(Cu)} = 50 μg L⁻¹). Results of this study show that there is no specific relationship between cell tolerance and accumulated metal on/in the cell. On the other hand, due to an established evidence of the influence of cellular density in microalgae toxicity tests, this effect was also studied. Results showed reduced EC₅₀ values when initial cellular densities decreased.

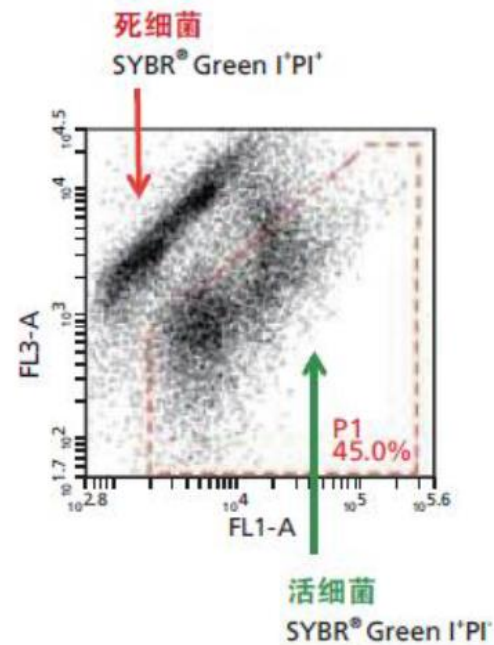
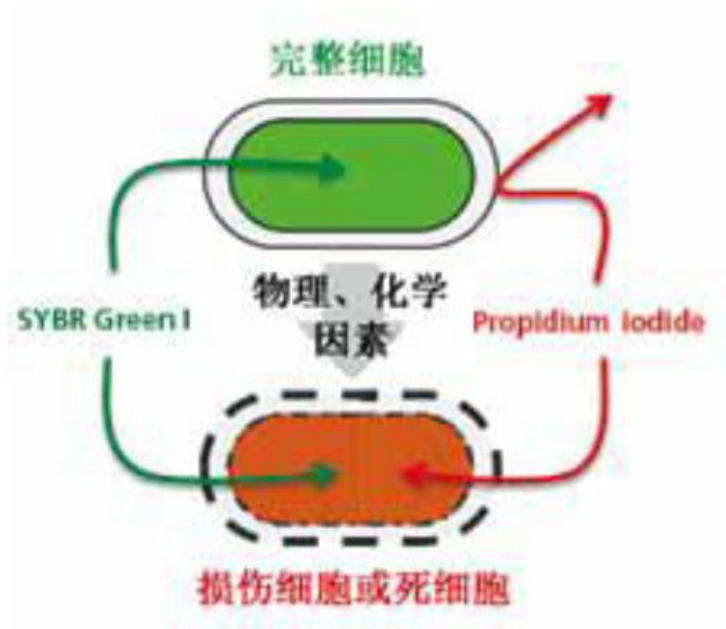
In this study, the term "toxic cellular quota" was used to express all data. This allowed, in a single expression, the combination of two parameters that clearly influence growth, cellular density and toxic concentration.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.



活力检测

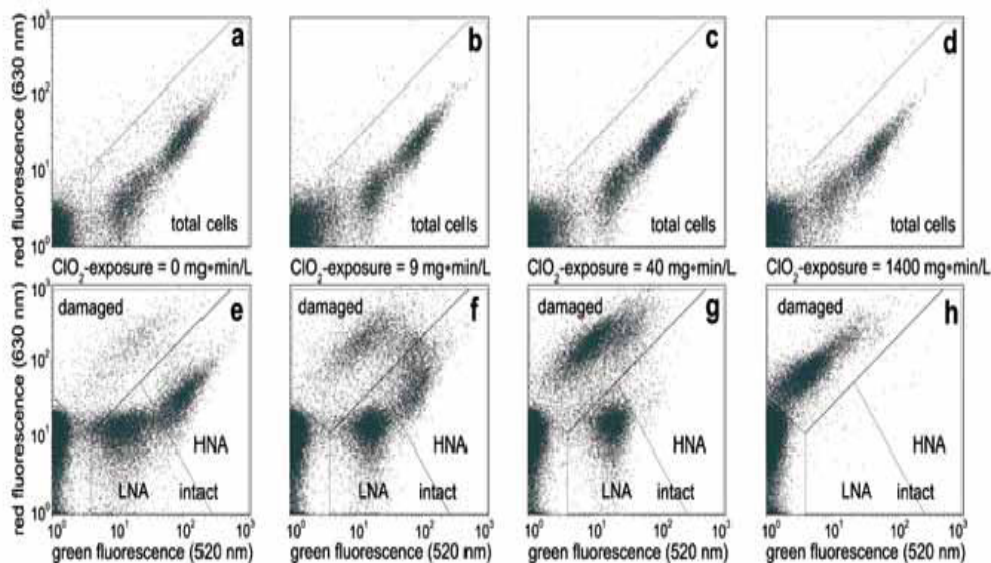
- 原理：SYBR Green I/PI 双染色检测



应用举例：快速评估物理化学作用对细菌细胞活性的影响

强氧化剂处理对水中细菌活力影响

摘自：Kinetics of membrane damage to high (HNA) and low (LNA) nucleic acid bacterial clusters in drinking water by ozone, chlorine, chlorine dioxide, monochloramine, ferrate (VI), and permanganate
Maaike K. Ramseier, Urs von Gunten, et al. Water Research (2011) Vol. 45: 1490-1500.



图释：流式细胞术分析不同浓度的二氧化氯对于水样中细菌活力的损伤作用。
(a-d). SYBR Green I (SGI)染色；
(e-h). SGI与PI双染色。总细胞=完整细胞+损伤细胞(SGI染色阳性)。
结果显示：二氧化氯处理可以增加水样中损伤细胞的比例，且呈现剂量依赖。

应用举例：纯化功能类群

Pereira et al. *Biotechnology for Biofuels* 2011, 4:61
http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/4/1/61



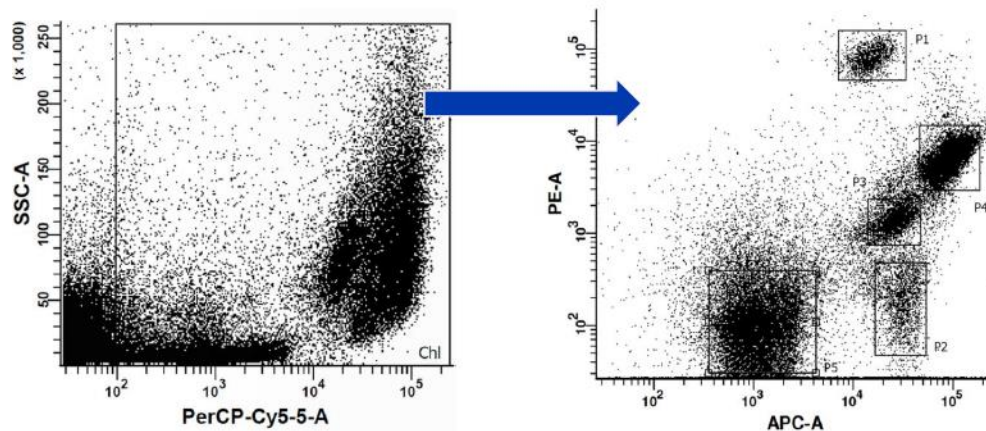
Biotechnology
for Biofuels

METHODOLOGY

Open Access

Microplate-based high throughput screening procedure for the isolation of lipid-rich marine microalgae

Hugo Pereira¹, Luisa Barreira¹, André Mozes², Cláudia Florindo², Cristina Polo¹, Catarina V Duarte¹, Luisa Custódio¹ and João Varela^{1*}



根据水体中微藻类自发荧光（APC通道为藻青蛋白荧光，PE通道为藻红蛋白荧光），将藻类分成5群，并进行分选。

FACS

The flow cytometer used in our studies was a Becton Dickinson **FACS Aria II** (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium). Fluorescence readings were performed by excitation with a blue and red laser (488 and 633 nm, respectively). The emission signal was measured in three channels upon excitation with the blue laser: FL1 channel centered at 530/30 nm; FL2 centered at 585/42 nm; and FL3 centered at 695/40 nm. A fourth channel, FL4, registered the emission at 660/20 nm after excitation with the red laser.

Samples were acquired with the software FACSDiva version 6.1.3 (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium). After the acquisition of samples, images were treated with the analysis software, Infinicyt 1.5.0 (Cytognos S.L., Santa Marta de Tormes, Spain).

The settings and compensations of all channels and lasers were the same for all sorting procedures. The flow cytometry sheath fluid used in all experiments was sterile filtered seawater. Filters (PALL) used had a pore size of 0.2 μm . Sorting was performed at 2,000 events/s flow rate using 'single cell' sort precision mode, with a 100 μm nozzle.

Cells were sorted directly into wells of 96-well plates containing 250 μl of either liquid or solid (agar) Algal growth medium. In order to assess the best number of cells needed to achieve visible culture growth in a feasible



Helping all people
live healthy lives

藻类代谢活性

检测藻的脂酶活性用FDA (Fluorescein Diacetate) 染色，代谢探针，激发波长488nm，在FLI通道处收集FDA荧光，荧光检测波长为530—560nm

F. J. Jochem

Dark survival strategies in marine phytoplankton assessed by cytometric measurement of metabolic activity with fluorescein diacetate

Received: 10 May 1999 / Accepted: 20 September 1999

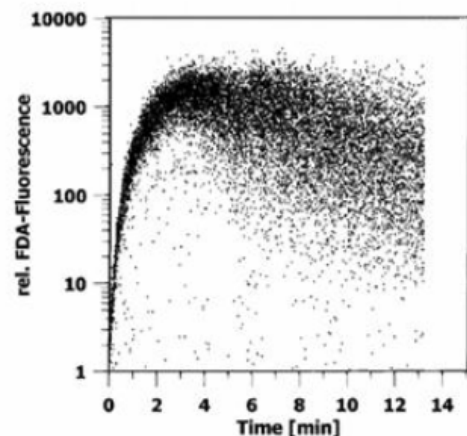
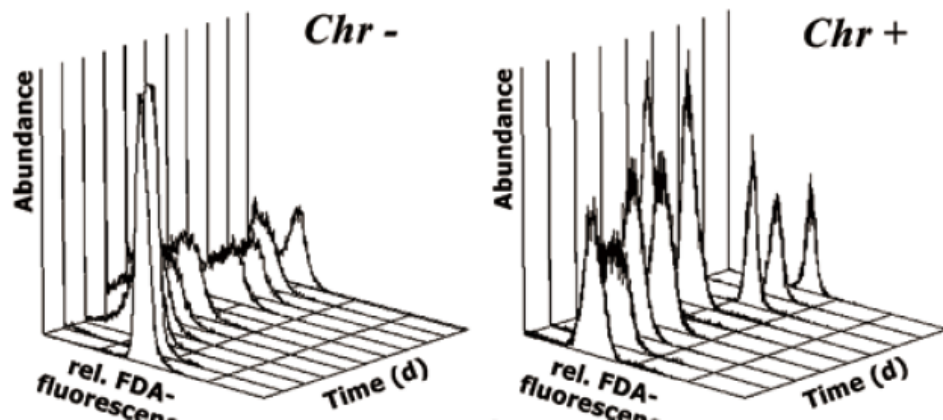


Fig. 1 Time course of fluorescence (relative units) accumulation upon FDA addition in *Brachiononas submarina* as revealed by flow cytometry

流式细胞仪分析 *Chrysochromulina hirta* 中FDA来源的荧光强度的每日的频率分布。细胞内的酯酶可以催化FDA形成荧光，流式细胞仪通过检测荧光来评价浮游植物的代谢活力。

✓ 水体藻类的分类和多样性研究

水生浮游植物种类多、数量大、分布广，是生态系统中不可或缺的一环。



水生浮游植物的群落、数量及分布信息对于了解淡水生态系统动力学具有重要意义。



对淡水生态系统保护、资源的开发利用提供理论支持。



流式细胞术可以根据浮游植物固有性质(细胞大小和颗粒度，色素自发荧光)或结合荧光染料，对其进行分群，并同步研究个类群的数量和生理生化变化。

应用举例：分析群落空间和时间的变化规律

Phytoplankton population dynamics at the Bermuda Atlantic Time-series station in the Sargasso Sea

Michele D. DuRand^{a,b,*}, Robert J. Olson^a, Sallie W. Chisholm^c

^aWoods Hole Oceanographic Institution, Biology Department MS#32, Woods Hole, MA 02543, USA

^bMemorial University of Newfoundland, Ocean Sciences Centre, St. John's, NF, A1C 5S7, Canada

^cDepartments of Civil and Environmental Engineering, and Biology, MIT 48-425, Cambridge, MA 02139, USA

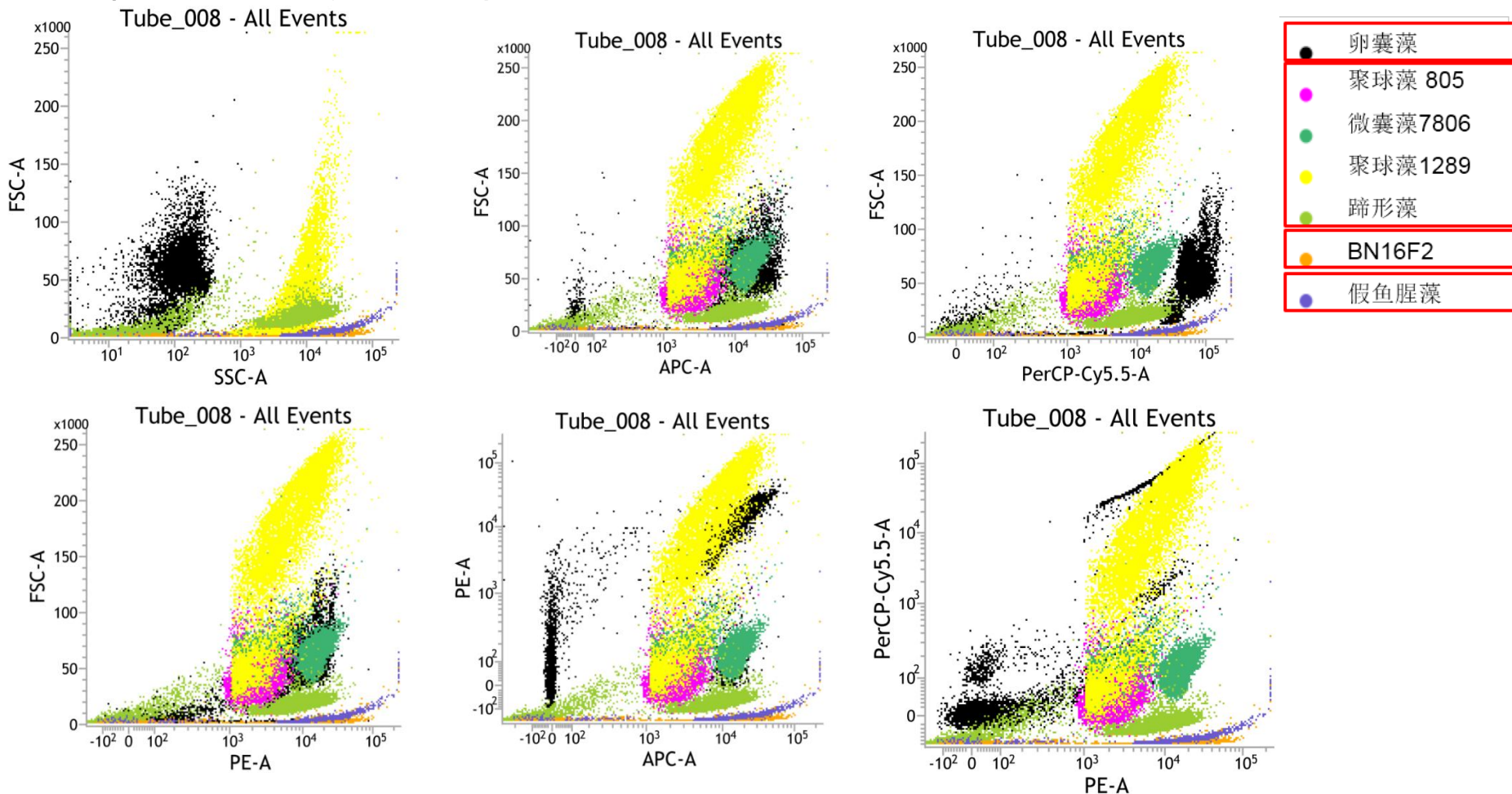
Abstract

Phytoplankton populations were analyzed using flow cytometry in monthly samples at the Bermuda Atlantic Time-series Study (BATS) station in the Sargasso Sea from 1989–1994 for picoplankton (*Synechococcus* and *Prochlorococcus*) and from 1992–1994 for eukaryotic phytoplankton in order to better understand the mechanisms that dictate seasonal and inter-annual patterns in the phytoplankton community. The eukaryotic phytoplankton were dominated by populations of small nanoplankton (mostly 2–4 μm diameter), though populations of coccolithophores and sometimes pennate diatoms also could be distinguished. Flow cytometric measurements of population abundances, individual cell light scattering (which can be related to cell size), and chlorophyll fluorescence were made. *Synechococcus* and the eukaryotic phytoplankton reached their greatest concentrations during the spring bloom each year when the water column was deeply mixed and nutrients were detectable in surface waters. The maximum cell concentration for *Prochlorococcus* was in the summer and fall of each year, with a deeper sub-surface maximum than *Synechococcus*. Picoplankton chlorophyll fluorescence and estimated cell size were greater at depth than near the surface, and were lowest in midsummer for both *Synechococcus* and *Prochlorococcus*. In the summer and fall, *Prochlorococcus* cells were often smallest at mid-depth, even when fluorescence per cell and cell concentra-

利用流式细胞仪调查了百慕大大西洋的浮游藻类的群落结构，分析了浮游植物的季节变化规律，结果表明：聚球藻以及真核浮游植物在春季的时候浓度最高，且在表层浓度达到最高值；而原绿球藻在夏季和秋季的时候浓度最高，在次表层其浓度达到最高值。

藻微标准品确定野外的物种所落的位置和数量

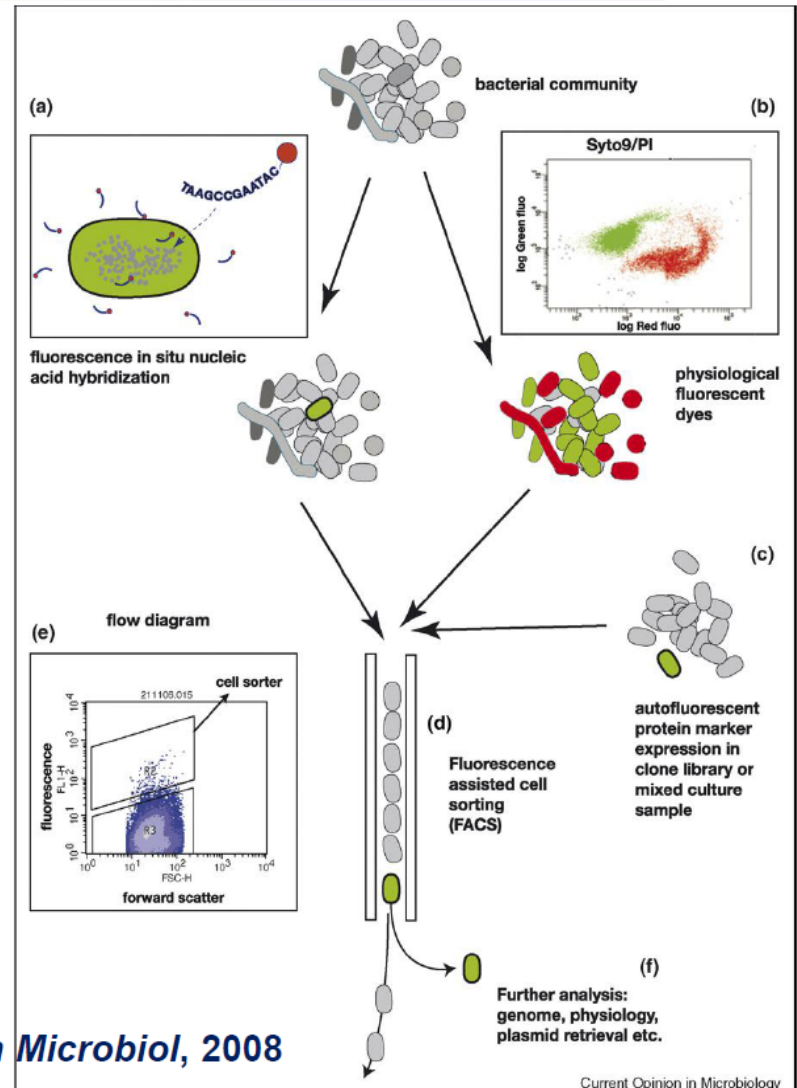
7种形状、大小以及所含色素种类不同的藻株为标准品，确定不同类群浮游植物在流式细胞仪不同荧光参数下具体位置



✓ 藻类分选应用

流式细胞仪可以通过浮游生物**固有属性**(色素自发荧光、细胞大小和颗粒性)或**特异性荧光探针**对混合样品中的特定组分进行分选，分选获得的细胞可以用于：

- 纯化功能类群
- 生理生化分析
- 分子生物学检测

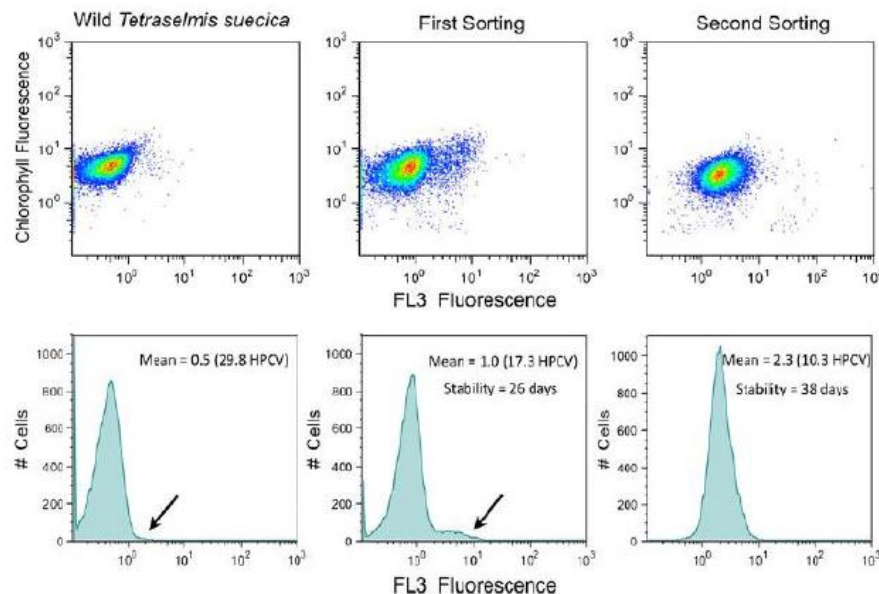


Czechowska et al., *Curr Opin Microbiol*, 2008

应用举例：高脂含量微藻分选

Isolation of high-lipid content strains of the marine microalga *Tetraselmis suecica* for biodiesel production by flow cytometry and single-cell sorting

María F. Montero • Manuela Aristizábal •
Guillermo García Reina



图释：利用流式细胞术分析高脂含量*T. suecica*细胞群，并加以两次分选。第一次分选从生长于光合生物反应器的 $15\text{--}20 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ 细胞中获得了8%的细胞群。26天后， $1.2 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ 细胞可以产生的平均 FL3为1。第二次分选38天后，可以产生的平均 FL3为2.3。细胞经过Nile Red染色处理，该染料为一种亲脂性染料。

Fig. 3 Isolation and sorting of high-lipidic strains of *T. suecica* during two consecutive steps. The first sorting (8% of the population) was obtained from a wild population ($15\text{--}20 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$) cultured in a photobioreactor under greenhouse sunlight. After 26 days from the

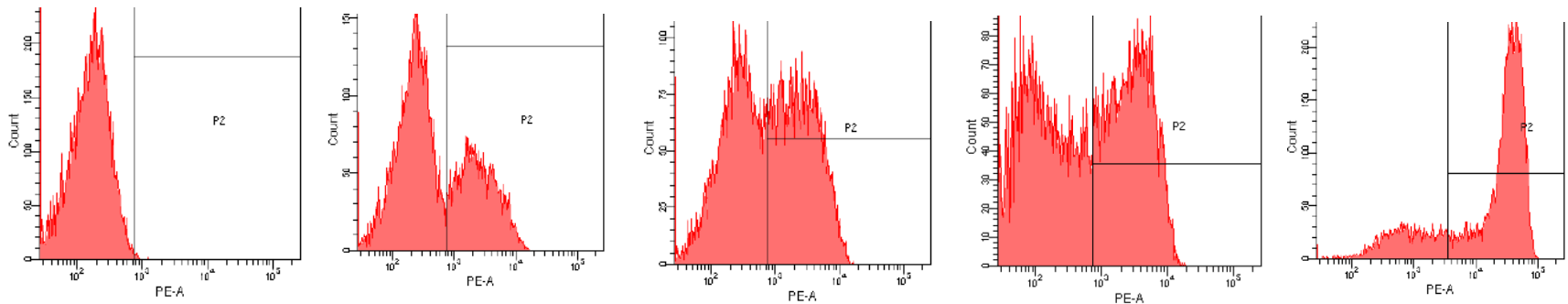
first sorting event, the algae ($1.2 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$) yielded a mean FL3 of 1.0 (17.3 HPCV). The second sorting, 38 days after, yielded a mean FL3 of 2.3 (10.3 HPCV). The arrows indicate the sorting regions.



Helping all people
live healthy lives

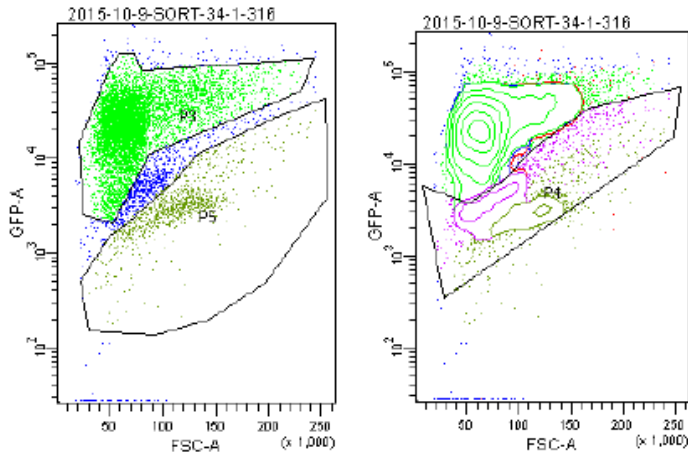
流式细胞分选技术微藻生物能源领域中的应用

利用流式细胞仪分选与检测突变体衣藻的油脂含量，在不同时间缺氮条件下，通过Nile Red染料对某个基因的突变衣藻进行染色，探索该突变体基因衣藻的油脂含量变化，再应用在有前景的能源微藻上如小球藻、硅藻等。（ Nile red 是一种脂溶性的荧光染料）



流式细胞仪分选藻类功能研究

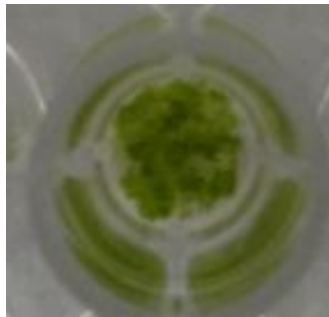
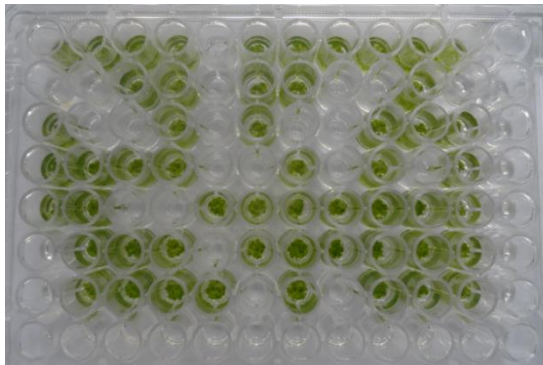
流式分选荧光标记凝集素的具有抗真菌功能的雨生红球藻



雨生红球藻细胞壁的糖类与标记荧光蛋白GFP凝集素结合，采用流式分选将不同荧光强度的细胞进行富集，研究表明低荧光强度的细胞具有抗真菌的功能。

。

鞭毛相关基因的突变体藻的单克隆筛选



流式作为藻类研究富集的重要技术手段

藻类细胞大小、内涵物、自发光进行分类和快速富集，为后续研究奠定基础。

钙离子通道检测

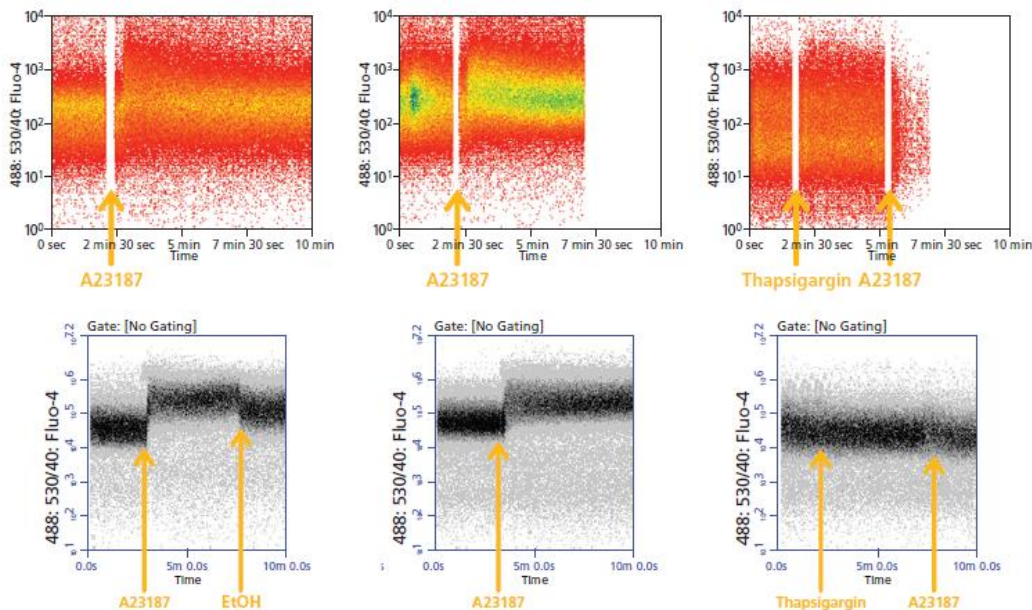
钙离子浓度检测



Fluo³-Am 是一种高度特异性 Ca²⁺ 荧光指示剂，可以灵敏地反映细胞内游离钙离子浓度的变化。Fluo³-Am 进入细胞后经非特异性酯酶脱去 Am 酯，成为脂溶的 Fluo³ 留在细胞内，当 Fluo³ 与细胞内游离钙结合

后，在 FL1 通道发出荧光，其荧光强度与游离钙离子浓度成正比。

钙离子浓度的变化非常迅速，因此，在加入刺激剂后要尽快进行上机检测。传统流式细胞仪是正压上样，测完基线后必须把样本拿下来加入刺激剂再进行检测，有可能错过钙离子浓度的变化。Accuri C6 是负压上样，可以在检测的过程中加入刺激剂，连续监测钙离子浓度变化情况。



比较中断检测法和连续检测法。

A: 用传统流式仪测钙离子检测，空白处为加刺激剂的时间间隔。

B: 用 Accuri C6 检测时，可在检测的过程中加入刺激剂，连续监测钙离子浓度变化情况。

流式细胞仪在小球藻信号通道研究的应用

小球藻的作用机制:对氮的饥饿细胞质 Ca^{2+} 水平的变化和 Ca^{2+} 的作用小球藻中中性脂质合成的信号转导研究。

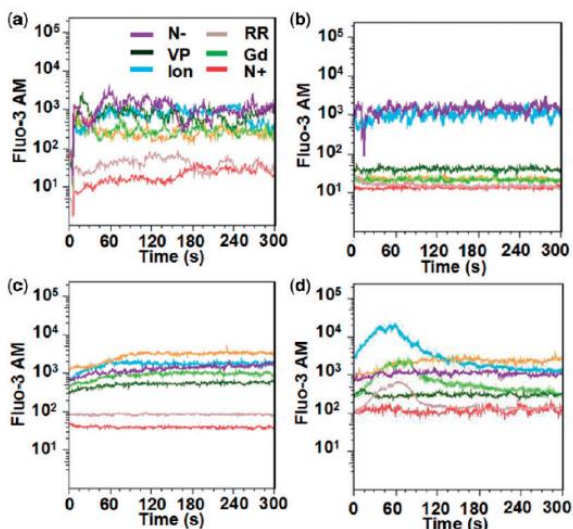


Fig. 3 FCM analysis the cytosolic Ca^{2+} levels in *Chlorella* sp. C2 under N starvation. The fluorescence of Fluo-3 AM was detected at 0 d (a), (b), 2 d (c) and 8 d (d) after N starvation. N-, N starvation; RR, ruthenium red; VP, verapamil; Gd, GdCl_3 ; Ion, ionomycin; N+, N sufficient data points at each second represent the means of 2×10^3 – 3×10^5 cells in three replicated studies with similar findings.

PCP
PLANT & CELL PHYSIOLOGY

Ca^{2+} Signal Transduction Related to Neutral Lipid Synthesis in an Oil-Producing Green Alga *Chlorella* sp. C2

Hui Chen¹, Yunming Zhang^{1,2}, Chenliu He¹ and Qiang Wang^{1,*}

¹Key Laboratory of Algal Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, Hubei, China

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100094, China

*Corresponding author: E-mail: wangqiang@ihb.ac.cn; Fax: +86-27-68780123

(Received November 12, 2013; Accepted January 14, 2014)

Regular Paper

Changes in the cytosolic Ca^{2+} levels and the role of Ca^{2+} signal transduction in neutral lipid synthesis in *Chlorella* sp. C2 under nitrogen starvation conditions were investigated. The results detected by using the scanning ion-selective electrode technique demonstrate that nitrogen starvation induced significant Ca^{2+} influx across the plasma membrane into cells. Ca^{2+} fluorescence imaging and flow cytometry were used to estimate the effect of this Ca^{2+} influx on the generation of the Ca^{2+} signal, and the results showed that the extracellular Ca^{2+} concentration increased transiently and

Introduction

Many plants are adversely affected by several environmental factors, including light, temperature, CO_2 , O_2 , water, nutrients, and stresses such as drought, low pH, salt, and pathogen or predator attacks, that negatively affect their survival and development (Plieth 2001). Ca^{2+} is a ubiquitous intracellular second messenger in the signal transduction of environmental stimuli in plants (Sun et al. 2006). When plants are forced to respond to environmental stimuli, the Ca^{2+} level rises rapidly and transi-

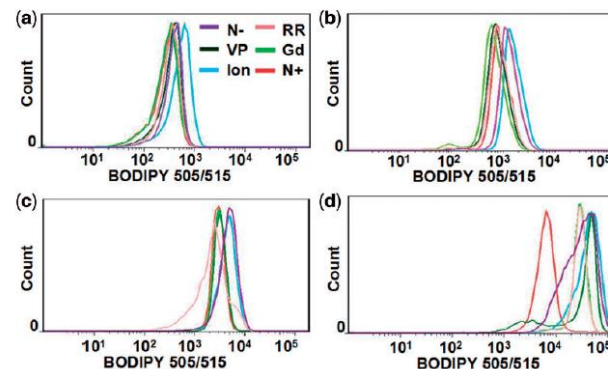


Fig. 6 FCM analysis of *Chlorella* sp. C2 cells labeled in vivo with BODIPY 505/515. The fluorescence of BODIPY 505/515 in the cells ($>10^4$) was detected at 0 d (a), 0.5 d (b), 2 d (c) and 8 d (d) after N starvation. N-, N starvation; RR, ruthenium red; VP, verapamil; Gd, GdCl_3 ; Ion, ionomycin; N+, N sufficient. All of the curves are representative of three replicated studies with similar findings.

注意:

- ✓ 细胞调整浓度 1×10^5 - 10^6 /mL
- ✓ 一定用**300-400**目过滤网过滤
- ✓ 不能使用胞内分子标记（分选后需要培养）
- ✓ 严格按照流式染料选择原则（孵育时间、避光等）
- ✓ 保证细胞活性：样本处理全程**4° C**, 离心速度不易过高，洗涤次数不易过多,吹打细胞轻柔。
- ✓ 降低细胞粘联：低温、降低悬浮液蛋白含量、应用不含**Ca++Mg++**/EDTA溶液、加入 **DNAse I**（25–50 μ g/mL plus 5mM **MgCl₂** .
- ✓ 采用染料排除死细胞

Dye	Unfixed cells	Fixed cells	Detector	Laser
DAPI	√	X	BV421	UV/Violet
Via-Probe Green	√	X	FITC	Blue
PI	√	X	PE	Blue/YG
7-AAD	√	X	PerCP-Cy™5.5	Blue/YG
DRAQ7™	√	X	APC	Red
Via-Probe Red	√	X	APC	Red

• 核酸染料非共价结合

• 免洗



帮助人类健康生活

Helping all people live healthy lives

Thanks !