

## 流式细胞术常见注意事项

### 一、死活染料

死活染料类型	核酸类死活染料	胺基类死活染料
染色原理	为细胞膜不通透性核酸荧光染料 死细胞出现膜不完整情况, 进入核内与 DNA/RNA 结合 产生可逆性的结合	为细胞膜不通透性氨基荧光染料 死细胞出现膜不完整情况, 进入胞内与蛋白游离胺结合 不可逆结合
原理示意图		
使用阶段	在表面染色, 结束后, 最后一步加	在所有染色开始前, 第一步加
是否可用于表面染色 Panel	√	√
是否可用于含胞内染色 Panel	×	√
常用染料	PI, 7-AAD, DAPI	如 BD 旗下的 Fixable Viability Stain (FVS) 系列染料

染料名称	激发波长 /nm	发射波长 /nm	荧光通道	仅染色死细胞	染色DNA/胺基	是否兼容胞内染色
DAPI	358	461	BV421	√	DNA	×
Hoechst 33342	350	461	BV421	×	DNA	×
PI	535	617	PE	√	DNA	×
7-AAD	546	647	percp-cy5.5	√	DNA	×
SYTOX Green	504	523	FITC	√	DNA	×
Via-Probe Green	488	525	FITC	√	DNA	×
DRAQ5	647	697	APC	×	DNA	×
DRAQ7™	599	678	APC	√	DNA	×
Via-Probe Red	631	651	APC	√	DNA	×
Fixable Viability Stain 440UV	338	436	DAPI(有的仪器BUV激发)	√	胺基	√
Fixable Viability Dye 448	350	338	DAPI(有的仪器BUV激发)	√	胺基	√
Fixable Viability Stain 450	406	450	BV421	√	胺基	√
Fixable Viability Dye 452	405	450	BV421	√	胺基	√
Fixable Viability Dye 545	405	545	BV510	√	胺基	√
Fixable Viability Stain 510	408	512	BV510	√	胺基	√
Fixable Viability Stain 575V	396	572	BV605	√	胺基	√
Fixable Viability Dye 515	488	515	FITC	√	胺基	√
Fixable Viability Stain 520	498	521	FITC	√	胺基	√
Fixable Viability Stain 570	547	573	PE	√	胺基	√
Fixable Viability Dye 583	568	583	PE-CF595	√	胺基	√
Fixable Viability Stain 620	523	617	PE-CF594	√	胺基	√
Fixable Viability Dye 662	640	662	APC	√	胺基	√
Fixable Viability Stain 660	649	660	APC	√	胺基	√
Fixable Viability Stain 700	657	700	AF700	√	胺基	√
Fixable Viability Stain 780	759	780	APC-CY7	√	胺基	√
Fixable Viability Dye 777	750	777	APC-CY7	√	胺基	√

1. FVS 胺基类死活染料: (1) 收到时为粉末状, 于-80℃长期保存; 工作液需用 DMSO 充分涡旋溶解, 分装成小份, 保存于-20℃, 避免反复冻融 (溶解前建议先将试剂管, 放于离心离心机离心, 以确保试剂聚集在管底); 溶解后理论保存期限为 90 天。(2) 染色前细胞染色缓冲液中不能含有血清, 避免中和掉死活染料导致假阴性; 染色后的洗涤液中需包含有血清, 中和掉未结合的死活染料。

2. 核酸类死活染料: (1) 4℃保存, 不能冻存。(2) 染色后, 避免洗涤, 剧烈涡旋或过度用力吹打, 避免核酸类死活染料染料的脱落, 导致假阳性。(3) 染色后, 需及时上机 (1h 内), 避免染料的毒副作用导致额外的死细胞产生。

## 二、细胞凋亡

1. 样本取材尽可能避免 EDTA 干扰，例如：外周血不要用紫头管（EDTA 抗凝管），使用不含 EDTA 胰酶消化。

### 2. 转染后细胞检测凋亡

（1）以实验室最常见质粒转染 GFP 为例，一定要避开 FITC（GFP 重叠）

- 转染率<30%，APC-AnnexinV（胞膜）和 PI/7-AAD（胞核）
- 转染率>30%，APC-AnnexinV（胞膜）和 7-AAD（胞核），避免 FITC 与

PI 产生的荧光补偿（虽然它还是会有）

（2）补偿管设置，**该实验实际为三通道检测**

- 阴性管：**未转染质粒的原始细胞**
- 单阳管
  - FITC 管：转染 GFP 质粒的稳转株细胞
  - APC 管：未转染质粒的原始细胞+ APC-AnnexinV 染色
  - PI/7AAD 管：未转染质粒的原始细胞+ PI/7AAD 染色
- 全阳管：即稳转株细胞进行 APC-AnnexinV 和 PI/7AAD 双染的实验样

本管

（3）凋亡顾名思义要有凋亡的细胞，因此**调补偿预实验模板**时可以人为处理。个人经验可将细胞平均分为两部分，一部分直接用 65~100℃ 开水煮沸 3~5min 让它们全部死亡，再把另一部分细胞加入，创造 50% 的细胞凋亡率。

3. 因为诱导药物的剂量有差异或者其它实验因素影响，都可能使得凋亡率出现波动，因此凋亡实验一定是重复多次的结果。

4. 凋亡双参数数据分析：

（1）样本处理后 P1 门（FSC、SSC）若出现 2 群细胞（细胞大小、状态等会发生变化），在确认排除其他细胞污染的情况下，那么 P1 门这 2 群都圈。

（2）分析时发现不能用同一个十字象限门去比较（而发文章十字象限门又得一致）的情况时，因为处理的因素不同，背景荧光肯定是变化的，这个是允许存在的变异点，投稿可以这样解释。

## 三、细胞周期

## 细胞周期检测注意事项

- 1、检测时需低速上样，保证检测结果CV值<5%
- 2、PI染色结束后，尽快上机检测，样本需避光保存。
- 3、样本用300目筛网过滤后再上机检测。
- 4、使用PI-W，PI-A散点图去除双粘体。
- 5、FSC，SSC，PI都是用线性坐标（Linear）。
- 6、如有必要，可将阈值设为FL2。
- 7、结果使用BD Modfit自动软件分析，更加准确可靠。

