

福建医科大学公共技术中心
——流式细胞分选服务预约注意事项

一、服务项目

- 1.无菌细胞分选：各种细胞系、原代细胞、肿瘤组织单细胞悬液等；
- 2.特殊细胞分选或其他项目：请联系管理员；
- 3.本仪器以分选为主，不承接流式分析实验，建议事先使用其它流式细胞仪确认细胞阳性染色比例。如特殊情况确需本仪器分析的，请联系管理员。

二、特别注意

- 1、**安全性问题：由于在分选过程中，样本可能通过液滴震荡产生气溶胶，所以不接受会传播人类病原菌的生物有害样本，也不接受含放射性生物样品。**
- 2、应知道细胞的大小与形态，以便选择分选用喷嘴。所分选细胞的直径最好小于喷嘴直径的1/5，至少小于1/3。细胞的形态也会影响了分选的结果，理论上越接近于球形的细胞，分选过程中的剪切力对细胞造成的伤害就越小。形态特殊的细胞应选择较大的喷嘴，以减轻分选过程对细胞造成的伤害。
- 3、各种细胞的建议浓度和所用喷嘴如下表。

Table 1 细胞种类和浓度、喷嘴的选择

细胞种类	浓度	喷嘴
Lymphocytes, thymocytes or splenocytes (直径8-12 μm)	8 - 12 × 10 ⁶ /ml	70μm
Activated lymphocytes, smaller cell lines (直径12-20 μm)	7- 9 × 10 ⁶ /ml	85 μm
Large adherent cell line (直径>20 μm)	5 - 8 × 10 ⁶ /ml	100μm

三、样本制备

1. 样本制备基本流程：

获取细胞悬液→荧光抗体染色→调整细胞浓度（参考Table 1）→**过滤细胞**→移入流式管→避光置冰上运至分选室→上机检测并设定分选条件→分选细胞→上机回测，检测纯度。

注：分选前的细胞一定要过滤过（一般用300目滤网），否则会堵机器的。

- 2. 分选所用的细胞染色方法与分析所用方法基本相同，但需要注意以下几点：
 - a）保证样本的无菌状态，因为分选得到的细胞还要继续培养；
 - b）不能使用固定剂固定细胞，因为活细胞经固定剂处理后即死亡；

- c) 保证上机样品为单细胞悬液;
- d) 准备充足的细胞, 详见Table 1;
- e) **上样缓冲液一般建议使用PBS**。若细胞活性较差, 可分选上样管中的缓冲液使用含2% FBS的PBS, 普通培养基中的酚红可能会干扰分选; 若用培养基的话, 颜色不能太深, 血清浓度不能超过2%, 否则粘性太大影响分选。
- f) 如细胞分选后需再次培养, 请准备含血清的收集管, 在分选前交操作员。建议在 5ml 离心管中加入1-2ml 血清及其它必需组分, 保证分选完毕时血清浓度大于5%;
- g) 如要分选 GFP 等转染的样品, 请提供未经转染的相同细胞为阴性对照;
- h) 如要做多重荧光染色标本的分选, 请提供各种单一荧光染色的标本;
- i) 如要去除死细胞, 在不影响后续实验前提下, 可以加入 7-AAD 或是PI 或是DAPI;
- j) 快速简便的样本处理有利于分选: 处理好的样本尽快上机, 分选好的细胞尽快下一步实验, 如果要分选多个样本, 建议一次处理一个, 估计可能的上机时间后, 再处理第二个样本。

四.常见问题

Q1. 上机样品需要溶在何种溶液中? 是否可以就直接放在原本培养的培养基中?

Ans: 建议不要放培养基中, 因为Phenol Red (酚红) 可能会影响分选的结果, 可先尝试使用含2% FBS 或BSA 的PBS 作为分选缓冲液。如要求更好的细胞存活率, 按分选细胞的不同, 选择不同的分选缓冲液。

1. 淋巴细胞 (HBSS 配方中的阳离子可增进细胞的生存力。如果这些细胞并非易于群集细胞, 可以选用没有EDTA 的缓冲液)。
 - a) 1 mM EDTA, 25mM Hepes (pH7.0) and 0.5% - 2% BSA in 1×PBS (without Ca^{2+} and Mg^{2+})
 - b) 1×HBSS (without phenol red) with 1% BSA
 - c) 0.5% - 2% BSA in PBS(without Ca^{2+} and Mg^{2+})
2. 贴壁细胞 (以Trypsin 处理后去准备单细胞悬浮液时, 待细胞变圆(切记不可过度作用), 以适量含5% 血清培养液收取细胞, 并均匀地打散细胞悬浮液。离心后, 用分选缓冲液调整细胞浓度。如果需要的话可以提高EDTA 的浓度(至5mM)以避免细胞重新黏聚)。
 - a) 5 mM EDTA, 25mM Hepes (pH7.0) and 0.5% - 2% BSA in 1×PBS (without Ca^{2+} and Mg^{2+})
 - b) 0.5-2% BSA in PBS(without Ca^{2+} and Mg^{2+})
3. 含有高比例死细胞的样本 (这些配方可减少因死细胞释放出来的 DNA 所造成的细胞黏聚现象。) 5mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 25mM Hepes (pH7.0), 25-50 $\mu\text{g/mL}$ DNAase I and 0.5% - 2% BSA in 1×PBS (without Ca^{2+} and Mg^{2+})
4. 建议询问有经验者 (使用相同细胞进行过分选) 的分选缓冲液配方

Q2. 如果细胞要再培养，会污染吗？

Ans: 分选所用的所有溶液都经高温高压灭菌，流式分选仪管路使用70%乙醇定期清洗，仪器所在房间在每次分选前紫外灭菌，最后在细胞培养基中加入抗生素，可将污染机率降至很低。

Q3. 如果我想在分选后拿到 1×10^6 的细胞我应该一开始准备多少细胞去做分选？

Ans: 假设你要的细胞只占总数的10%，则你所需准备的细胞数如下公式： $1 \times 10^6 = 10\% \times 50\% \text{回收率} \times 20 \times 10^6$ (起始细胞数)，所以你需要准备 2×10^7 细胞。高速分选、纯度模式(purity vs. yield mode)、部分细胞黏附于上样管壁、部分细胞用于样本分析、长时间分选过程中细胞的死亡等等，都会降低回收率。50% 回收率是一个一般的参考值。

Q4. 通常做一次细胞分选需要多久时间？

Ans: 分选的过程有三个步骤，分别为设定分选区域、分选及分选后的分析。设定分选区域约需15-20分钟。分选的时间决定于细胞数目，虽然机器的分选速度最高可达70,000 细胞/sec，但为得到最佳分选结果，我们通常设定分选速度为10,000-20,000 细胞/秒。因此，如欲分选 2×10^7 细胞，其所需分选时间约为17-34 分钟。分选后约需15-20 分钟去回测及分析结果。所以，总共约需1-1.2 小时去分选 2×10^7 细胞。

Q5. 一个样品可以同时分选出几种细胞？

Ans: FACS Aria III 可以从一个样品中最多同时分选出四种不同的细胞。

Q6. 可以同时使用多少参数进行细胞分选？

Ans: FACS Aria III 最多可以根据9个参数去定义及分选一群细胞 (检测488 nm 激光对应的5 种荧光信号及SSC和FSC，检测633 nm 激光对应的2 种荧光信号，检测355nm 激光对应的2 种荧光信号)。

Q7. 分选后细胞的纯度有多少？

Ans: 通常可以达到95%以上的纯度，如果所分选细胞可以和其他细胞群较好的区分。

Q8. 如果阳性的细胞占总数的1%以下，还可以做分选吗？

Ans: 可以，但是低含量细胞的分选会导致低纯度及低回收率。因此，我们建议使用者事先富集你感兴趣的细胞。细胞富集的方式可以是正选：如用磁珠法富集你感兴趣的细胞；也可以是负选，如利用nylon wool 去除B 细胞，或磁珠法去除不要的细胞。

Q9. 分选时所使用的管子有哪些？

Ans: 上样一般使用5ml 带盖流式管(BD Falcon tube #352003); 收集可以使用下面这2 种管，14ml 圆底离心管(BD Falcon tube #352059) (最多双路分选), 5ml 带盖流式管(Falcon tube #352003) (最多四路分选)。

五.预约方式与收费标准

1. 服务时间： 周一至周五9:00—17:00，节假日除外。
2. 上机地点：福州市大学新区学府北路1号福建医科大学2号楼北区305室
3. 预约流程：
 - (a) 在“福建医科大学公共技术中心”网站进行预约申请，至少提前 3 个工作日预约；
 - (b) 联系管理员，下载预约申请表；
 - (c) 填写样本信息和分选要求，课题负责人签字；
 - (d) 至管理员老师处登记，交预约申请表（需比实际实验提前 3 个工作日完成此步骤）
 - (e) 按预约时间上机完成分选；
 - (f) 至平台老师处结算费用，去财务处转账，交回转账凭单。
4. 取消预约：最迟于预约时段前一天电话取消预约。
5. 收费标准：开机费 300 元，校内：150 元/半小时，校外：300 元/半小时。收费由预约时间起，以半小时为时间单位累加。请谨慎预估时间，在预约上机时间 30 分钟内将样品准备好，如未能在此时间内则视同弃权。若实验失败不能按期来分选，但又未提前一天取消预约，需按原预约时间进行收费。