



流式配色原则 及技巧详解

版本：2026.07



www.ptgcn.com



搜索一下

CONTENTS

目录

一、公司介绍	2
二、重组流式抗体介绍	4
三、多色流式实验设计基本原则	6
四、多色流式实验配色流程	7
五、荧光补偿调节与圈门策略	10
六、散射光信号分析与粘连体去除	13
七、常用免疫细胞分型配色方案	15

一、Proteintech 公司介绍

Proteintech 于 2001 年在美国芝加哥创立，是一家深度服务于生命科学研究及医学诊断领域的生物公司。其全球四大研发生产中心可提供抗体、重组蛋白、ELISA 试剂盒、实验试剂及高品质 CRO 技术服务；目前已获得 10000+ 企业及科研院所的认可，高效助力全球生命科学及医学诊断领域取得突破性成果。

免疫学研究生物试剂



抗体

- 兔多抗 / 小鼠单抗 / 羊驼纳米抗体
- 重组兔单抗 / 重组流式抗体 / 单链抗体 scFv
- 直标抗体 / 中和抗体 / 抗体组合
- 重组二抗 / 病理诊断抗体
- 抗体对 / CAR 检测抗体



试剂盒·Kits

- Speedy™ 一步法 ELISA 试剂盒
- 传统 ELISA 试剂盒 / 抗体对套装
- 抗体对 (PBS-Only)
- 多因子 CBA 检测试剂盒
- Active Motif® 表观研究试剂盒



重组蛋白

- Humankine® 天然活性蛋白
- HEK293/CHO 表达真核重组蛋白
- E.coli 表达重组蛋白
- Active Motif® 表观药物开发重组蛋白



实验试剂

- WB/IP/IHC/IF/FC 等实验全套试剂
- 血清 / 培养基 / 冻存液 / 细胞活性检测
- 小分子化合物

共享创新与数据开放



行业首发：Able 生物科研智能体

2025 年 9 月，Proteintech 在官网上线 AI 助手 Able，这是行业内首款专为生命科学领域设计的人工智能实验助手，可在短短几秒钟内，为客户提供企业研发专家级别的协助，帮助研究人员解决从海量抗体库中筛选合适产品并优化实验方案的难题。



行业首家：3D 抗原表位图谱

2025 年 3 月，Proteintech 在官网上线 3D 抗原表位图谱 (3D Epitope Mapping)，成为行业第一家提供精确抗体 - 抗原结合位点信息的抗体供应商。这些精确的表位信息，能够提高抗体选择的效率和准确性，助力从基础科学研究到临床药物开发的各个阶段。

文献口碑

产品超过 45 万次 SCI 文献引用；1800 余次荣登顶尖期刊封面文章

全球三大研发中心



美国

芝加哥研发生产中心



中国

武汉研发生产中心



德国

慕尼黑研发生产中心



CRO 技术服务

全人源抗体开发

- 人单个 B 细胞和浆 B 细胞抗体发现
- 传染疾病，自身免疫性疾病，恶性肿瘤和其他人类疾病
- 与具有资质的机构和企业合作开发

抗体药物开发

- 小鼠和兔抗体发现平台
- TCRm 抗体，抗体内化，抗体片段，抗体人源化
- 表位作图，亲和力排序，亲和力测定，EC50，IC50，交叉结合

诊断及研究抗体开发

- 兔和羊抗体发现平台
- 小分子抗体，修饰性抗体，抗独特性抗体
- 抗体对，IHC, WB, FC

抗体生产服务

- 高通量重组抗体生产
- 大规模重组抗体生产

营销网络覆盖全球快速响应

- 七大分公司及库存基地
- 提供产品定制服务
- 1-3天到货周期
- 24小时专业技术支持

全球10000+企业及院所的认可

- 生物技术公司
- 体外诊断公司
- 创新药公司
- 疫苗公司
- 生物试剂公司
- CXO公司
- 医美及化妆品公司
- 科研院所

质量管理体系认证

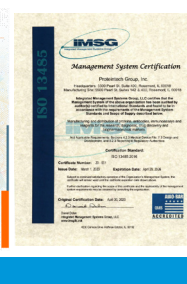
GMP 级别细胞因子及抗体：
严格执行 GMP 标准及
GMP 质量管理体系



ISO 9001



ISO 13485



重组流式抗体是基于 Proteintech 基于 ABCE™ 单个 B 细胞抗体发现平台开发出来的创新型产品，可提供 Fc 沉默和生物定点标记技术的 FcZero-rAb® 系列新型骨架以及 Uni-rAb™ 系列传统骨架重组流抗，同时可提供多种克隆类型，如高引用克隆重组化和全新克隆，覆盖更多靶点。另外，Proteintech 还提供用于纳米流式检测的单链抗体。

- ✔ 重组技术生产
- ✔ 大量稳定供应
- ✔ 靶标多样，改造灵活
- ✔ 可提供仅含 PBS 的抗体

1. 重组流式抗体产品类型丰富

1)	FcZero-rAb® 重组流式抗体	Fc沉默及生物定点定量标记双重技术
2)	Uni-rAb™ 重组流式抗体	覆盖靶标丰富，类型多样
3)	高引用克隆重组化流式抗体	高引用克隆抗原结合区与小鼠 IgG2a 骨架重组
4)	全新克隆重组化流式抗体	更多新靶点，统一免抗骨架，仅需一种同型对照
5)	非人灵长类动物重组流式抗体	经过食蟹猴样本验证
6)	稀有物种重组流式抗体	猪、犬、猫、羊等
7)	磷酸化蛋白检测流式抗体	经过内源性流式实验充分验证
8)	单链抗体scFv	适用于纳米流式检测 /in vivo CAR
9)	羊驼纳米重组流式抗体	针对肿瘤免疫靶点的荧光染料偶联纳米抗体VHH

2. 重组流式抗体已经覆盖常用免疫细胞分型标志物（持续上新）

细胞类型 / 分类	人	小鼠
白细胞	CD45	CD45
造血干细胞	CD34, Lin(-), CD38(-), CD90	Lin(-), CD48(-), CD150, Sca-1, CD117
B 细胞	CD19, CD20	CD19, CD45R(B220)
T 细胞	CD3	CD3
活化 T 细胞	CD3, CD25, CD69	CD3, CD25, CD69
辅助性 T 细胞	CD3, CD4	CD3, CD4
Th1 细胞	CD3, CD4, IFN-γ	CD3, CD4, IFN-γ
Th2 细胞	CD3, CD4, IL-4	CD3, CD4, IL-4
Th9 细胞	CD3, CD4, IL-9	CD3, CD4, IL-9
Th17 细胞	CD3, CD4, IL-17	CD3, CD4, IL-17
Th22 细胞	CD3, CD4, IL-22	CD3, CD4, IL-22
调节性 T 细胞	CD3, CD4, CD25, Foxp3, CD127(low/-)	CD3, CD4, CD25, Foxp3
细胞毒性 T 细胞	CD3, CD8	CD3, CD8
树突状细胞	CD1c, CD83, CD141, CD209, MHC class II	CD11c, MHC class II
浆细胞样树突细胞	CD123, CD303, CD304	CD11c(int), CD317
自然杀伤细胞	CD16, CD56	NKp46, NK1.1(限品系), CD49b
单核细胞	CD14, CD16, CD64	CD11b, CD115, Ly-6C, Ly-6G(-)
巨噬细胞	CD14, CD68	CD11b, F4/80, CD68
M1 型巨噬细胞	CD80, CD86	CD80, CD86
M2 型巨噬细胞	CD163, CD206	CD163, CD206
巨核细胞 / 血小板	CD42b, CD62P	CD41, CD62P
红细胞	CD235a	TER-119
中性粒细胞	CD11b, CD15, CD16	CD11b, Ly-6G, Gr-1, CD115(-), Ly-6C(low/-)
嗜碱性粒细胞	2D7 antigen, CD117(-), CD123, CD203c, FcεR1a	CD200R3, FcεR1a
嗜酸性粒细胞	CD11b, CD193, EMR1, Siglec-8	CD11b, CD193, F4/80, Siglec-F
间充质干细胞	CD44, CD73, CD90, CD105	CD29, CD44, CD73, CD90, Sca-1, CD105
	CD11b(-), CD14(-), CD19(-), CD34(-), CD45(-), HLA-DR(-)	CD11b(-), CD14(-), CD19(-), CD34(-), CD45(-)
内皮细胞	CD31, CD34, CD105, CD144	CD31, CD34, CD105, CD144

黑色字体为重组流抗，褐色字体为杂交瘤流抗，灰色字体即将上线

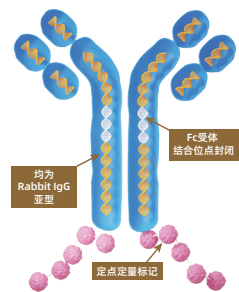
Proteintech提供20 余种荧光染料进行偶联，可完成12色的流式配色！

FcZero-rAb® 重组流式抗体 专利技术

FcZero-rAb® 重组流式抗体来自 Proteintech ABCE™ 单个 B 细胞抗体发现和 FcZero® Fc 沉默双重技术平台，在保持重组抗体一致性的同时，有效避免了传统杂交瘤细胞系表达退化的风险，具有更佳的流式检测性能。

4 大优势：

- 1) **Fc 沉默** 无需使用Fc受体封闭试剂，省时省力。
- 2) **定点定量标记** 偶联染料不影响抗体活性中心，且批间荧光强度高度均一。
- 3) **仅需一种同型对照** 抗体均为Rabbit IgG亚型，大大降低实验难度及成本。
- 4) **高批间一致性** 从DNA层面确保抗体高度一致



全面验证 Fc 沉默性能

1. FcZero-rAb® 重组流抗完全消除了与人及小鼠 FcγR 结合

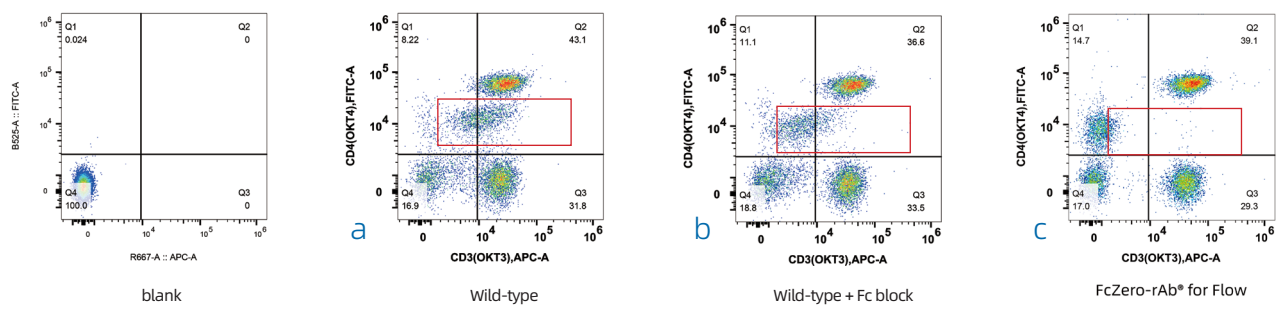
BLI 法测定亲和力和

Human Fc 受体类型	Rabbit IgG-wild type	FcZero® 沉默抗体
	是否与其结合	是否与其结合
FcγRI/CD64	√	×
FcγRIIa/32a(167R)	√	×
FcγRIIa/32a(167H)	√	×
FcγRIIb/32b	√	×
FcγRIIIa/CD16a(176F)	√	×
FcγRIIIa/CD16a(176V)	√	×
FcγRIIb/CD16b(NA1 allotype)	√	×
FcγRIIb/CD16b(NA2 allotype)	√	×

Mouse Fc 受体类型	Rabbit IgG-wild type	FcZero® 沉默抗体
	是否与其结合	是否与其结合
FcγRI/CD64	√	×
FcγRIIB	√	×
FcγRIII/CD16	√	×
FcγRIV	√	×

2.FcZero-rAb® 重组流抗 Fc 沉默性能比 Fc 受体封闭剂效果更佳

使用不同 anti-CD3 及 anti-CD4 流抗对人 PBMCs 进行染色，新型 FcZero-rAb® 重组流抗无需阻断试剂即可达到无 Fc 受体结合背景。



扫码查看产品信息

三、多色流式实验设计基本原则

流式多色实验是现代流式细胞术中的一项核心技术，它通过在单次实验中同时使用多种荧光标记的抗体，对单个细胞进行多参数分析。多色实验不仅可以通过减少样本用量和实验次数来节约珍贵的样品和试剂成本，更重要的是可以从一个细胞中同时获取多种表面或内部蛋白的表达信息，这使得研究人员能够深入解析复杂细胞群体的异质性。

多色实验的成功依赖于精心的设计和优化。抗原分析、仪器配置、荧光染料特征了解都必不可少。

1. 目标抗原选择

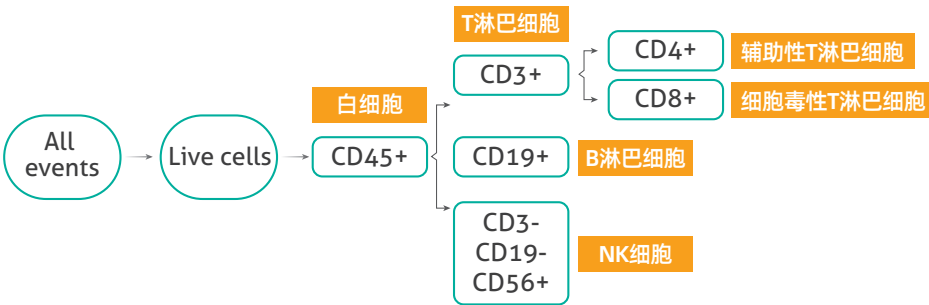
根据实验目的选择合适的靶标，推荐使用表格进行整理，使所有目标抗原可视化，便于确定圈门逻辑和共表达关系。

目标细胞	抗原名称	表达丰度 (高 / 较高 / 低)	细胞定位	是否需要破膜	荧光染料
T 细胞	CD3	高	荧光染料	无需	普通亮度：如 CL405，CL750
辅助性 T 细胞	CD4	较高	胞膜蛋白	无需	普通亮度：如 CL405，CL750
Treg 细胞	CD25	低	胞膜蛋白	无需	较高亮度：如 CL488，CL594
Treg 细胞	FoxP3	低	核蛋白	需破核膜	高荧光亮度：：如 CL647

▲ 以小鼠Treg细胞marker为例分析

2. 明确圈门逻辑

推荐使用树状图的方式展示目标细胞群的逻辑关系，便于了解细胞亚群与各抗原标志物之间的关系，同时也能确定不同细胞亚群是否共同表达同一个抗原分子。



▲ 人TBNK流式检测圈门逻辑

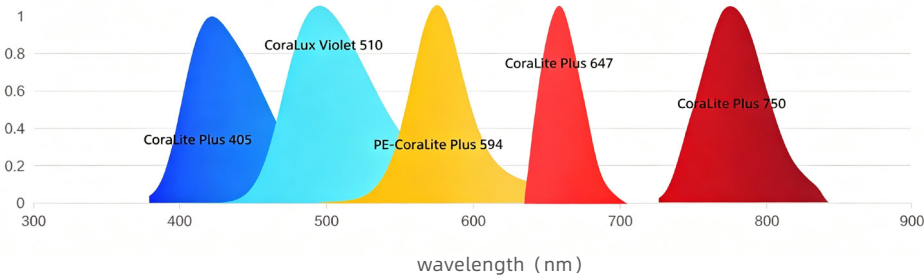
3. 了解平台仪器的配置

配色方案搭建前需了解流式细胞仪的激光器种类和荧光通道信息，根据仪器配置合理选择荧光染料，确保搭建的配色方案与仪器荧光通道相匹配，能够完成上机检测。

如了解流式细胞仪有哪几个激光器，哪几个滤光片，哪几个荧光通道，各自可对应哪些染料这些信息。

4. 选择荧光染料

荧光染料的选择首先满足仪器配置的需求，其次根据目标抗原的表达丰度不同选择合适的亮度，荧光染料的亮度可以根据染色指数或者厂家提供的亮度数据进行判断。



CoraLite®系列是Proteintech公司自有的荧光染料。它具有良好光稳定性、发光强度以及较宽的pH适应性，能完美胜任科研实验要求。

四、多色流式实验配色流程

多色流式配色实验一般先需根据目标抗原表达丰度和仪器配置，选择合适荧光染料，然后进行抗原和染料的搭配后，最终设计出包含死活染料及各种对照的完整方案。

1. 根据实验目的选择合适的细胞标志物（Marker）

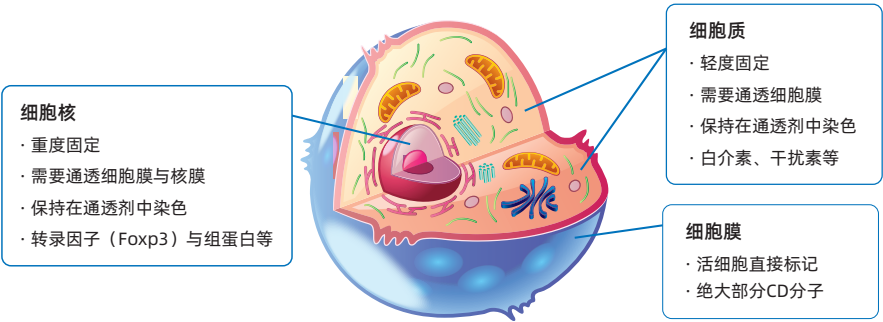
流式细胞术最常用的免疫细胞标志物是指分布在免疫细胞表面或内部的特定分子，其中最主要的是分化簇（Cluster of Differentiation, CD）分子。它们就像是细胞的“分子身份牌”，其表达模式随着细胞发育、活化和功能状态而变化，可以用来区分细胞类型和亚群，确定细胞活化、增殖、耗竭状态以及提供疾病诊断、分型与预后的分子指标。

►免疫细胞标志物的功能

标记物类型	主要回答的问题	核心代表分子
谱系分化	你是谁？（来自哪个家族）	CD3 (T 细胞)、CD19 (B 细胞)、CD11c (DC)
亚群 / 分化阶段	你在家族中的角色？成熟了吗？	CD4 (Th)、CD8 (Tc)、CD45RA (初始)、CD45RO (记忆)
活化状态	你正在战斗或被激活了吗？	CD62P (血小板活化)、CD69 (早期)、CD25 (中晚期)
归巢与趋化	你要去哪里？	CCR7 (淋巴结)、CXCR4 (骨髓)、CLA (皮肤)
功能 / 效应	你用什么武器战斗？	Perforin (杀伤)、IL-10 (抑制)
细胞增殖	你在分裂生长吗？	Ki-67、BrdU
免疫检查点	你的战斗热情（活性）被谁调节？	PD-1 (休息 / 耗竭)、CD28 (激活)
干 / 祖细胞	你是年轻的种子细胞吗？	CD34、CD133
谱系转录因子	是谁在细胞核内决定了你的身份？	FOXP3 (Treg)、T-bet (Th1)、RORyt (Th17)

常见人 / 小鼠免疫细胞标志物见 P4

►细胞标志物表达定位

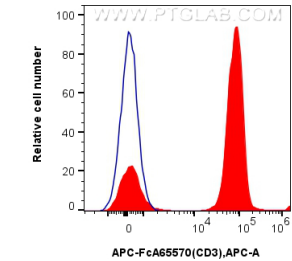


染色注意：

- A. 对于细胞质或者细胞核的 Marker，需要对细胞进行固定破膜 / 破核膜。
- B. 在做细胞质或胞核 Marker 染色实验操作时，通常需要先染细胞表面 Marker，再对细胞进行固定破膜最后对胞内或核内 Marker 染色。这一顺序保证了表面抗原在其天然状态下被识别和标记。

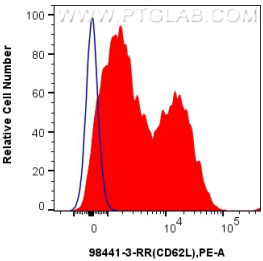
►了解细胞标志物表达量

根据在待测细胞中相应抗原的表达量，一把可以粗略的将需要检测的抗原分为三类：



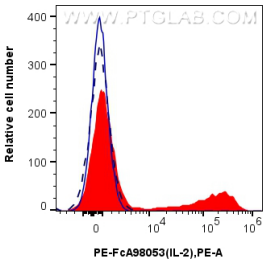
▲高表达抗原

容易区分阴性细胞群、阴阳性峰明显分开。如CD3、CD4、CD19等。



▲较高水平表达、连续表达抗原

容易区分，经常连续性表达。如CD27、CD45RA、CD62L等。

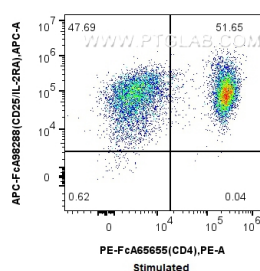


▲低表达抗原

低水平表达。如IL-2、IL-6、IL-17A等。

►了解细胞标志物相互关系

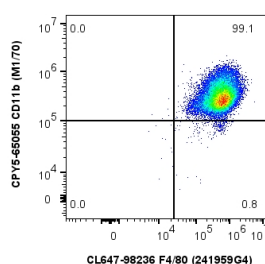
细胞标志物间的相互关系包括互相排斥、共表达、子代与亲代等。



▲互相排斥

指两种抗原不会同时表达在一种细胞上，即表达A不表达B，表达B不表达A，互相排斥的抗原允许荧光溢漏。

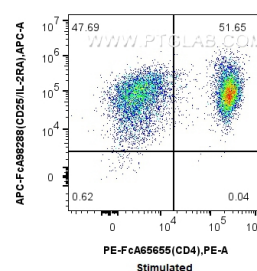
如图，T细胞分CD4+T和CD8+T两种，成熟的T细胞不会同时表达CD4和CD8。



▲共表达

指两种抗原表达在同一种细胞上。共表达但高表达的抗原允许溢漏。

如图，小鼠巨噬细胞上同时表达F4/80和CD11b。



▲子代与亲代

指抗原之间是上下级的关系，下级抗原是在上级抗原的基础上分析的。一般来说，允许子代对亲代的溢漏，反之不行。

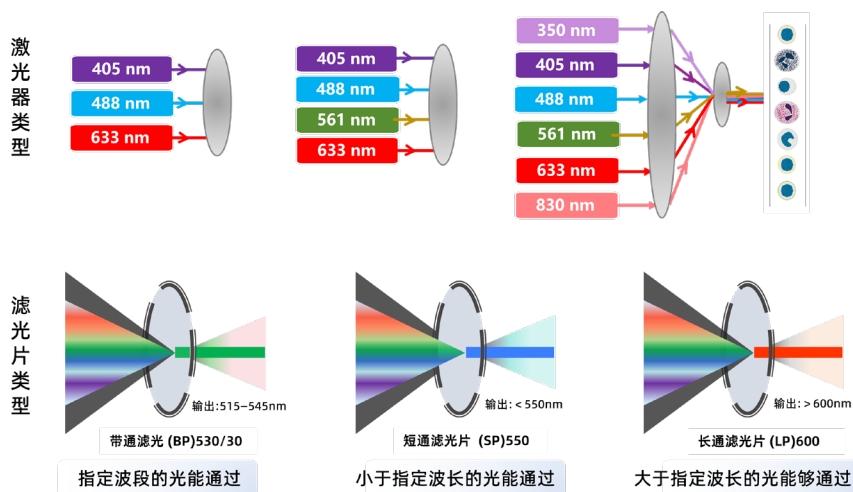
如图，小鼠T细胞激活后的检测。CD4主要是在辅助性T细胞上表达，CD25和CD69是T细胞激活过程中两个重要的表面标志物。CD4是亲代，CD25和CD69是子代。

2. 了解流式细胞仪的信息

配色方案搭建前需了解流式细胞仪的激光器种类和荧光通道信息，根据仪器配置合理选择荧光染料，确保搭建的配色方案与仪器荧光通道相匹配，能够完成上机检测。

流式细胞仪激光器及滤光片

流式细胞仪中常见的几种激光器主要有 405nm（紫色）、561nm（黄色）、633nm（红色）和 488nm（蓝色）等，不同的荧光染料可被相应的激光器激发，发出特定波长的光，从而被检测器检测。分光镜和滤光片的作用是引导光路到指定的检测通道，它通常由平面玻璃或棱镜制成，通过精密的设计，将入射的激光束按照特定的角度和波长进行分散和反射，使得不同波长的光聚焦于不同的位置上。



488nm 蓝激光 + 633nm 红激光 → 覆盖 FITC/PE/APC 全系列；

405nm 紫激光、561nm 黄激光以及 355 紫外激光 → 支持 10+ 色

荧光素≠通道，两者是适配关系：一个通道可适配多个荧光，但同一时间只能用一個。

3. 选择合适的荧光染料

荧光染料的选择首先满足仪器配置的需求，其次根据目标抗原的表达丰度不同选择合适的亮度，荧光染料的亮度可以根据染色指数或者厂家提供的亮度数据进行判断。

►以下5大配色原则可供参考：

- 1) 分析蛋白表达强弱：高表达抗原搭配低亮度的荧光染料；低表达或未知表达量的抗原搭配中高亮度的荧光染料。部分荧光染料例如串联染料受固定/通透剂甲醛等的影响较大，尽量为需要固定破膜处理的抗原选择相容染料。
- 2) 合理分配荧光通道：将各抗原指标分配到更多激光器下，以减少荧光基团在同种激光不同通道之间的溢漏。如弱表达抗原放在被干扰最小的检测通道，强表达抗原放在对其它通道干扰较小的检测通道。
- 3) 尤其注意胞内抗原：针对细胞内抗原（如细胞因子、转录因子）检测，优先选择分子量小、穿透力强的荧光染料，确保抗体能高效穿透细胞膜，实现胞内靶点的有效染色。
- 4) 共表达 / 互斥抗原：共表达抗原避免放在相互干扰的通道，互斥抗原的染料搭配则更为灵活。
- 5) 上下级抗原：实验中“上级抗原”（如谱系标记CD45）的信号，要避免对“下级抗原”（如功能标记CD3）造成光谱干扰，防止假阳性或信号偏移。

►Proteintech可提供20余种荧光染料，同时完成20余色的多色流式方案。（持续上新中）

激光器	检测通道	通道别名	Proteintech 荧光染料	亮度
Violet 405 nm	445/45	Pacific Blue	CoraLite® Plus 405	++
	525/45	AmCyan	CoraLux™ Violet 510	+++
Blue 488 nm	525/45	FITC	CoraLite® Plus 488	+++
			FITC Plus	++
	586/20	PE	PE	++
	615/20	PE-Texas Red	PE-CoraLite® Plus 594	++
	667/30	PE-Cy5	PE-Cyanine5	++
		PerCP	PerCP	++
	695/40	PE-Cy5.5	PE-Cyanine5.5	++
		PerCP-Cy5.5	PerCP-Cyanine5.5	++
Yellow 561 nm	586/20	PE	PE	+++++
			CoraLite® Plus 555	++
	615/20	PE-Texas Red	CoraLite® 594	+++
			PE-CoraLite® Plus 594	+++
	667/30	PE-Cy5	PE-Cyanine5	++++
	695/40	PE-Cy5.5	PE-Cyanine5.5	++++
	780/60	PE-Cy7	PE-Cyanine7	++++
			PE-Cyanine7	++++
Red 633 nm	667/30	APC	CoraLite® Plus 647	++++
			APC	++++
	725/40	Alexa Fluor 700	CoraLite® 700	++
	780/60	APC-Cy7	CoraLite® Plus 750	++
			APC-Cyanine7	+++

注意：

- ① 根据仪器选择荧光染料，要能被仪器上的激发光激发，发射光在滤光片的接收范围内，每个通道只能选一种荧光染料；
- ② 搭配的荧光染料之间发射光谱重叠尽量小，如FITC/PE-Cy7；
- ③ 选择不同激光激发的荧光素或荧光蛋白，如FITC/APC， PE/APC；
- ④ 避免反复冻融，避光保存，防止荧光衰退。
- ⑤ 单一荧光素染料（如FITC、PE、APC、CL系列）通常对醛类（1%-4%PFA）固定剂耐受性较好，但长时间固定（超过4小时）可能因荧光淬灭导致信号减弱。串联染料（如PE-Cy7、APC-Cy7、PerCP-Cy5.5）对PFA固定剂敏感，固定时间超过4小时或固定后长时间保存，易发生串联染料断裂导致信号丢失或补偿漂移。

五、荧光补偿调节与圈门策略

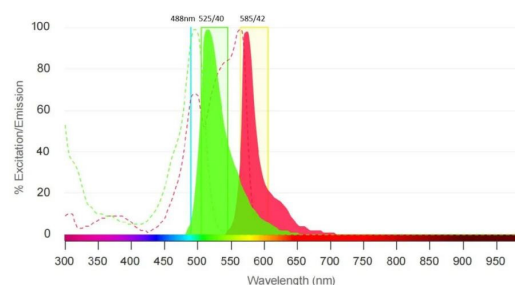
1. 荧光补偿调节定义

荧光补偿是为了避免荧光溢漏造成的假阳性结果。流式实验通常使用偶联了荧光基团的抗体，荧光基团被激发后所发出来的光，其波长不是一个特定的值而是一个范围，当一种荧光基团的信号能在另外一种荧光基团对应的通道检测到时，就说明发生了荧光溢漏，溢出的这一部分信号就称之为补偿。在结果分析之前需要将这部分信号扣除，避免“假阳性”。

2. 产生荧光补偿的原因

① 由同一激发光激发的荧光基团之间涉及补偿

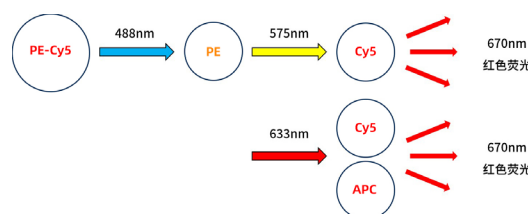
荧光基团的发射光谱较宽，会出现光谱重叠的现象。例如下图中 FITC 和 PE 均可由 488nm 激光器激发，FITC 的发射光经过 525/40BP 滤光片后被接收（绿色框），PE 的发射光经过 585/42BP 滤光片后被接收（黄色框），可见黄色框内除了有 PE 的信号外还有少部分 FITC 的信号，这部分 FITC 通道溢漏到 PE 通道的信号就为“补偿”。



▲ FITC和PE光谱示意图（虚线为激发光谱、实线为发射光谱）

② 一些单体荧光素和偶联荧光素涉及补偿

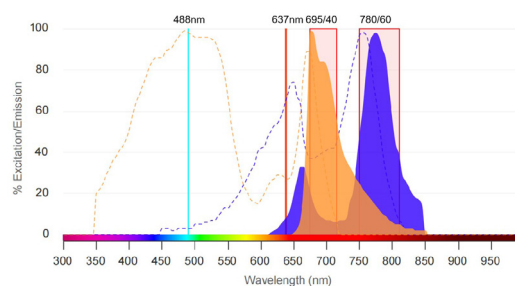
这种补偿通常与偶联荧光素的激发原理相关。如 PE-Cy5 和 APC 是由不同的激发光激发，但是两者之间却存在比较大的补偿。PE-Cy5 这种偶联荧光基团的激发过程是 488nm 的激发光先激发 PE，PE 发出 575nm 的荧光再激发 Cy5，最终发射出 670nm 的荧光。但是 PE-Cy5 在一些条件下会解偶联成 PE 和 Cy5（部分偶联荧光基团在甲醛固定和热刺激后容易解偶联），Cy5 可以直接被 633nm 的激发光激发，其发射波长也是 670nm。APC 也可被 633nm 的激发光激发，发出 670nm 的荧光，因此会导致 PE-Cy5 和 APC 无法区分，因此这两种染料无法同时使用。另外，PE-Cy5 会发生荧光共振能量转移，导致部分荧光溢漏到 PE 通道。



▲ PE-Cy5偶联荧光素的激发机制

③ 发射光谱相近的荧光素涉及补偿

一些荧光素虽然由不同的激发光激发，但是也存在补偿问题。这是因为很多荧光素的发射光谱范围很宽。例如下图中的 APC-Cy7 和 Percp-Cy5.5，这两种荧光素分别由 633nm 和 488nm 的激光器激发，但是存在较大的补偿。Percp-Cy5.5 被激发后经过 695/40BP 滤光片后被接收（左框），APC-Cy7 被激发后经过 780/60BP 滤光片后被接收（右框）。从图中可以看出两者的接收通道中都存在部分对方通道的信号，互有补偿。



▲ APC-Cy7和PerCP-Cy5.5光谱示意图（虚线为激发光谱、实线为发射光谱）

在进行多色流式实验之前，需要了解所用荧光基团的激发光谱和发射光谱（可登录 [Proteintech 中文官网使用 Spectra Viewer 光谱查看器](#) 了解），以及流式细胞仪激光器和检测通道的参数信息。因为不同的流式细胞仪其配置以及光路设计会有所差异，这种差异会使荧光素之间的补偿问题发生一些改变。

3. 荧光补偿的调节

在实验中设置单染管是关键。单染管是只加一种荧光抗体的样本管。如在一个实验中需要用到三种荧光抗体分别是 APC、PE 和 FITC，那么需要设置 6 个样本管：

序号	样本管设置	目的
1	无染色的空白细胞管	确定目的细胞的主细胞群 / 调电压
2	同型对照管（所有抗体对应的同型对照）	阴性细胞群对照
3	APC 阳性染色单染管	补偿调节
4	PE 阳性染色单染管	补偿调节
5	FITC 阳性染色单染管	补偿调节
6	APC、PE 和 FITC 染色检测管	圈门分析



扫码可查看
FlowJo软件用补偿矩阵
进行补偿调节的方法

在制备单染管时需要注意：

- 1) 单染管和检测管的样本类型保持一致。如检测管用小鼠脾脏细胞，则单染管也需要用小鼠脾脏细胞。
- 2) 制备单染管的抗体所偶联的荧光素必须与检测管的荧光素保持一致，且要确定有明显阳性信号。
- 3) 单染管和检测管的操作方式保持一致。如操作管进行了固定通透，则单染管也需要固定通透。
- 4) 单染管上机时各个荧光通道的电压需要与检测管保持一致。

在上机中，可直接在仪器上进行补偿调节，但是不同仪器的补偿调节模块不同。

4. 圈门策略

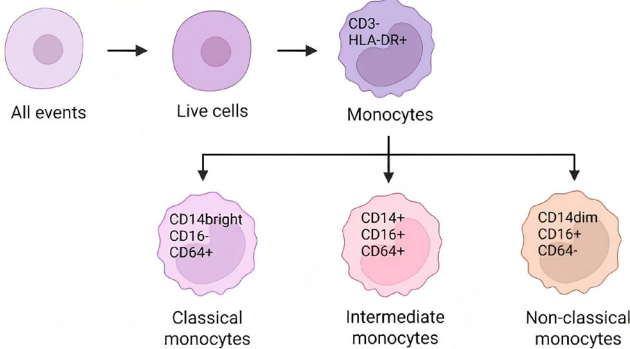
在补偿调节结束后，流式数据的分析需要进行一系列的圈门操作，即“圈门”。圈门的基本流程是圈出主细胞群（FSC-A & SSC-A）；圈出单细胞群（FSC-A & FSC-H）；圈出活细胞群；根据目的细胞上表达的泛标志物圈出目的细胞群；根据目的细胞分型标志物将其不同亚型区分开来。

以人 PBMCs 中单核细胞的基础流式分析为例：

1) 了解细胞各标志物的共表达、互斥表达、以及上下游关系。

单核细胞是体积最大的白细胞，是机体防御系统的一个重要组成成分。HLA-DR 是人 II 类主要组织复合物抗原，在抗原递呈细胞如 B 淋巴细胞、单核细胞和巨噬细胞上广泛表达。单核细胞高表达 HLA-DR，但不表达 T 淋巴细胞的标志物 CD3。单核细胞的固有标志物是 CD14，因此可以通过 CD14 和 CD16 这两种标志物将单核细胞分为三个不同的亚群：经典型（CD14^{bright}CD16⁻）、中间型（CD14⁺CD16⁺）、非经典型（CD14^{dim}CD16⁺）。在正常的人外周血中，CD64 在经典型单核细胞上高表达，这是一种高亲和力的 Fc gamma I 型受体，是感染性疾病的感染指标。

不同类型的单核细胞具有不同的功能，经典型单核细胞具有更高水平的吞噬活性，中间型单核细胞具有炎症特性，非经典型单核细胞具有抗炎特性，因此通过单核细胞的基础亚群分析，可以大致了解机体的免疫状态。



▲ 单核细胞的流式分析策略

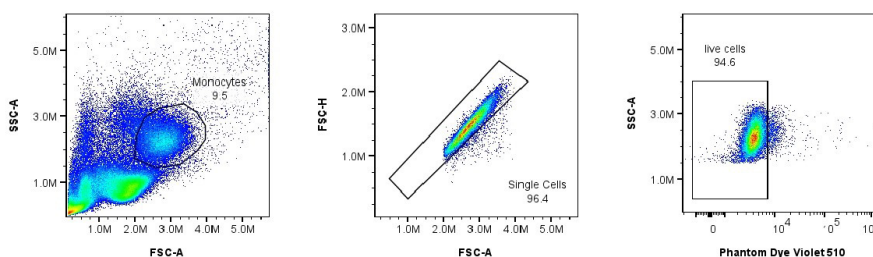
2) 了解了单核细胞的表型特点后，具体圈门操作如下：

① 根据 FSC-A 和 SSC-A 将单核细胞群圈出。单核细胞的细胞大小以及细胞内复杂程度都要高于淋巴细胞，因此单核细胞群位于淋巴细胞群上方（下图左）。

② 根据 FSC-H 和 FSC-A 排除粘连体，正常单个细胞的 H 和 A 成比例增大，粘连体通过时，H 不变，A 增大（下图中）。

③ 通过死活细胞染料区分死活细胞。死细胞容易非特异性结合抗体或染料，会影响实验结果准确性，此时需使用一些染

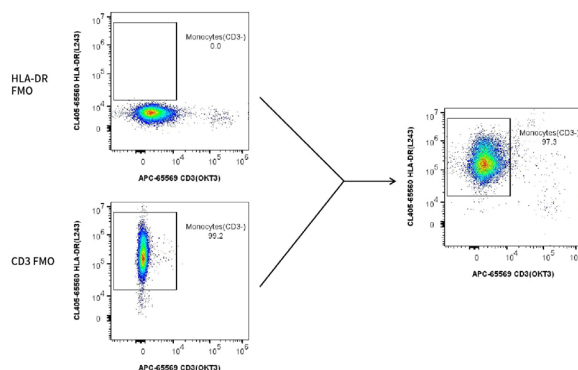
料来标记并排除死细胞。死细胞的细胞膜是不完整的，核酸类染料可以直接穿过细胞膜，结合核酸后发出荧光或者胺基类染料可以与细胞内更多的蛋白质结合，从而产生更高的荧光，所以圈门时要选择阴性细胞群，即为活细胞群（下图右）。



▲主细胞群、单个细胞以及活细胞圈门

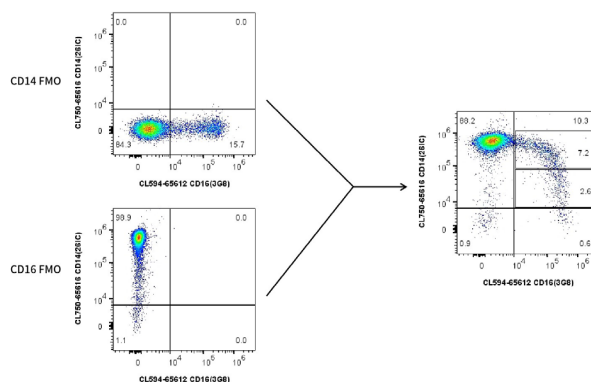
④ 在主细胞群中圈出非粘连体状态的活细胞之后，需根据 HLA-DR 和 CD3 来初步确定单核细胞。先分别用 HLA-DR FMO 样本管和 CD3 FMO 样本管确定 HLA-DR 和 CD3 阴阳性细胞的分界线，再应用到检测管，得到 HLA-DR 和 CD3 双参数散点图。圈出 HLA-DR+CD3⁻ 细胞群进行下一步圈门。

FMO 对照（Fluorescence Minus One，荧光扣除一）是在流式染色时减少一个通道的荧光抗体。如此例中 HLA-DR FMO 样本管就是里面加入了 CD3、CD14、CD16、CD64 以及死活染料却没有加 HLA-DR 抗体的样本管。一般在多色实验中会设置 FMO 对照样本管，有助于精确的设置细胞阴阳群的界限，防止其他通道的干扰，使实验结果更精确。



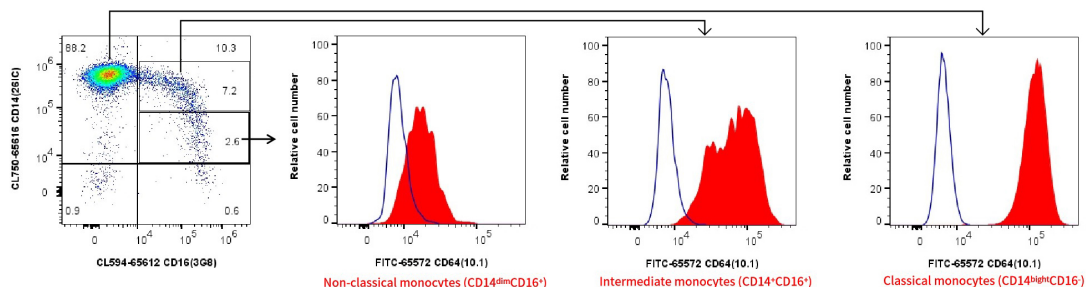
▲HLA-DR+CD3⁻细胞群圈门

⑤ 圈出 HLA-DR+CD3⁻ 细胞群之后，进一步确定经典单核、中间型单核和非经典单核细胞群。先分别用 CD14 FMO 样本管和 CD16 FMO 样本管画十字门确定 CD14 和 CD16 阴阳性细胞的分界线，再应用到检测管，得到 CD14 和 CD16 双参数散点图。左上为经典单核细胞（CD14^{bright}CD16⁻）、右上的上部分为中间型单核细胞（CD14^{dim}CD16⁺），右上下部分为非经典单核细胞（CD14^{dim}CD16⁺）。



▲CD14和CD16圈门区分经典、中间型及非经典单核细胞

⑥ 通过 CD14 和 CD16 圈门区分三种类型的单核细胞之后，我们还可以进一步观察三种类型单核细胞上 CD64 的表达情况，从直方图中可见，经典单核细胞群中高表达 CD64。



▲三种单核细胞上CD64的表达情况

六、散射光信号分析与粘连体去除

1. 流式数据图

流式实验的结果图通常有三种：直方图、散点图（也称为密度图）和等高线图。

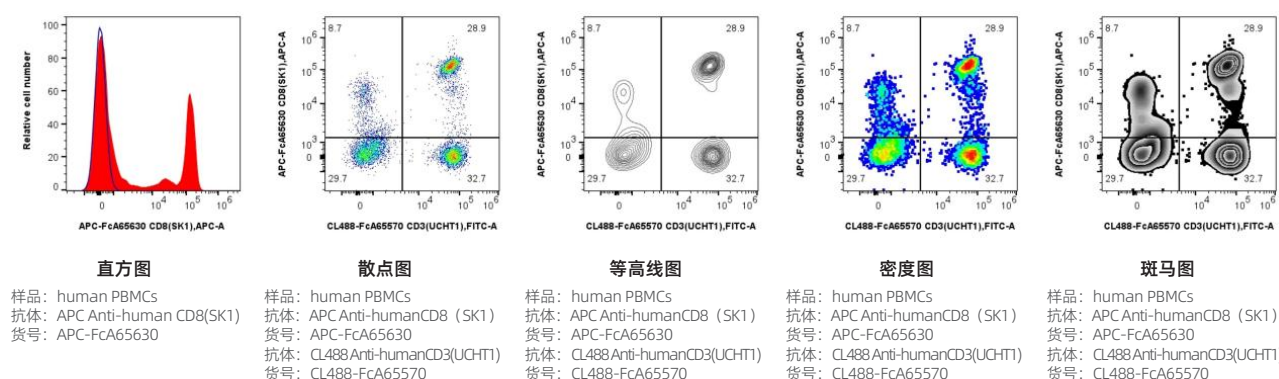
直方图：显示一个通道的信息，y轴表示细胞数，x轴表示该通道的荧光信号值。

散点图：能够同时表示两个荧光通道的信息，图中每一个点代表一个细胞（有时也会称散点图为密度图）。

等高线图：与散点图相似，也能同时显示两个荧光通道的信息，不同的是它借地理等高线图的形式来表现细胞群。其中的环线代表细胞密度相同的区域，越密集的地方表示此区域细胞密度变化越快，环线的中央区域代表细胞聚集的中心。相比之下，散点图更加直观，但是当细胞分群不够明显时等高线图的优势就显现出来，因为一个等密度环线的中央区域代表一个细胞群的集中点，也就是一个细胞群，这样能够准确判断细胞的群数。

密度图：与散点图所传达的信息一致，能够同时显示两个荧光通道的信息，图中每个点也表示一个细胞，只是密度图中点的大小比散点图中的点较大，可以较明显的显示出细胞的分群情况。

斑马图：是密度图和等高线图的组合形式，其优势是可以将一些分群不清晰的细胞群更明显的展示出来。

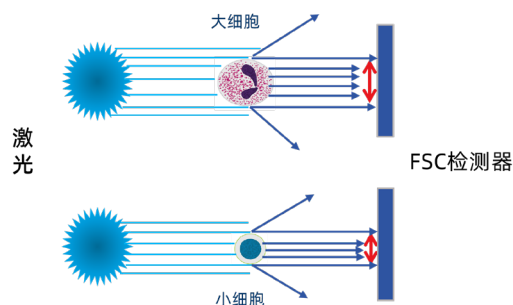


2. 散射光信号分析

散射光信号是流式细胞术中初步区分细胞大小和复杂性的关键参数。前向散射光（Forward scatter, FSC）主要反映细胞的大小，FSC 信号强代表细胞较大，反之则细胞较小。而侧向散射光（Side scatter, SSC）则与细胞内部结构的复杂性相关，通常一个细胞内部细胞器和颗粒越多，SSC 信号就越强。

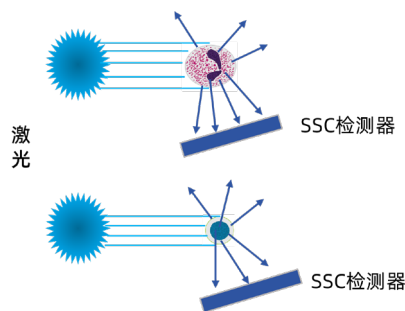
前向散射光(FSC,Forward Scatter):

- ▶光学检测器在入射光的**正前方**收集的低角度散射光信号。
- ▶FSC的信号强弱与细胞（颗粒）大小有关，**细胞体积越大，其FSC信号值越强**。
- ▶初步比较细胞的大小进行分类，常用FSC设定阈值排除碎片。

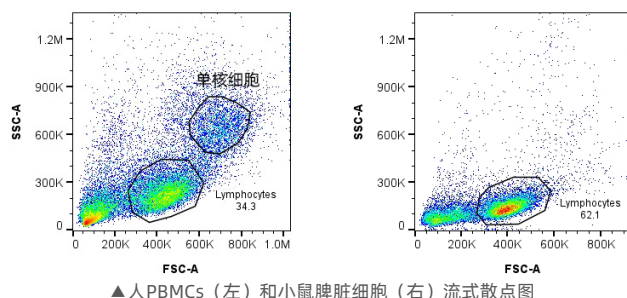


侧向散射光(SSC,Side scatter):

- ▶光学检测器在入射光的**直角处**收集的细胞散射的光信号。
- ▶SSC对于细胞膜、胞质、核膜的折射率更为敏感，**SSC信号强弱与结构复杂程度有关**。
- ▶细胞（颗粒）越不规则，细胞表面的突起越多，细胞内能够引起散射的细胞器或颗粒物质越多，SSC信号就越强。



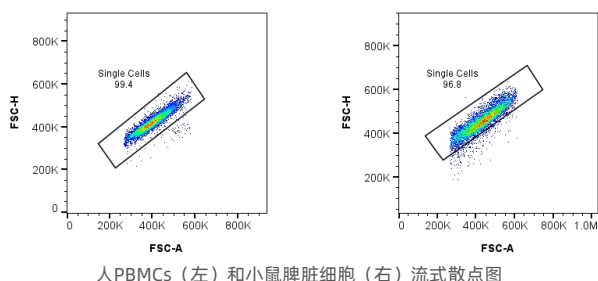
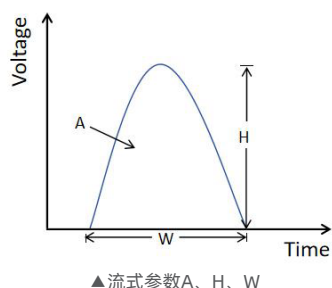
散点图中横轴代表 FSC 信号强度，纵轴代表 SSC 信号强度，颜色越红表示聚集在此地方的细胞越多。人外周血单个核细胞（Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs）包含多种不同类型的细胞（左图），小鼠脾脏细胞主要是淋巴细胞（右图），通过 FSC 和 SSC 即可初步将淋巴细胞、单核细胞、死细胞和细胞碎片区分开来。死细胞和细胞碎片通常表现出较低的 FSC 信号，一般位于散点图的左下角区域，可以通过调整 FSC 的阈值来排除这些细胞；淋巴细胞胞体较小，胞内复杂程度较低，为黑色框标示区域；单核细胞胞体较大，细胞内部较为复杂，因此位于淋巴细胞群的上方。



3. 去除粘连体

流式细胞术的分析对象是单个细胞，在实验过程中可能会存在双细胞或多细胞复合物的影响。这些粘连体在通过激光检测点时，检测装置仍然认为它们是一个信号，所以在圈定所需要的细胞群后需要进行一个去除粘连体的操作。

这个过程涉及到流式细胞仪的三个参数 A (Area, 即横纵轴标题 FSC-A 和 SSC-A 中的 A)、H (Height) 和 W (Width)。当细胞从进入激光检测点到离开，电脉冲信号由 0 到达峰值再降为 0，被记录成一个峰值。



不同样本如何去除粘连体？

H 代表电脉冲信号的高度，表示信号的强度，W 代表电脉冲信号的宽度，也就是细胞通过激光检测点的时间，A 表示电脉冲信号的面积，是通过 H 和 W 的数值计算得来，因此在仪器上分辨率会更高。粘连体的脉冲信号通常是两个或多个单个细胞的合并，H 相等，但是 W 和 A 会大于单个细胞，所以我们可以利用这种差异将二者区分开来。有以下两种方法：

H 和 W：由于粘连体的 W 大于单个细胞的 W，因此可以使用 FCS-H 和 FCS-W 来去除粘连细胞。但是如果检测样本中各种细胞大小差异较大，那么这种方法就不太适用，不能确定是粘连体还是细胞差异问题。

A 和 H：正常单个细胞的 H 和 A 是成比例增大的，以 FSC-A 和 FSC-H 为坐标的散点图中单个细胞群应该是大约呈 45°角分布（如上图中黑色框标示的细胞）。但是当粘连体通过时，H 不变，A 增大，因此也可以通过 FSC-A 和 FSC-H 或 SSC-A 和 SSC-H 来排除粘连体。

如果粘连体太多，即使在分析数据时排除，对实验结果的影响依然很大，也容易造成流式细胞仪的管路堵塞。因此，我们需要在样本制备阶段尽可能的减少粘连体的产生。整个实验过程都应该在冰上操作，组织样本需要充分消化并吹散混匀。上机前用 200 目的滤网过滤，并且吹打均匀，切勿长时间静置。

七、常用免疫细胞分型配色方案

Proteintech 可提供人 / 小鼠 / 非灵长类动物（如食蟹猴）TBNK、T 细胞、B 细胞、单核细胞、间充质干细胞以及巨噬细胞等即用型染色方案。

✓ 重组技术
✓ 稳定供应
✓ 提供FcZero-rAb®系列panel*
✓ 持续上新

* FcZero-rAb® 系列重组流抗为 Fc 沉默及生物定点标记双重技术开发的重组流式抗体，流式实验无需使用 Fc 受体封闭剂，且荧光强度高度均一和重复。

1. FcZero-rAb®人 T 细胞染色方案

激光(nm)	荧光染料	靶点	克隆	流抗货号	抗体亚型	应用	Panel套装
561	PE	CD45	241670E10	PE-FcA98117	Rabbit IgG	白细胞标志物	货号： PK30051
633	Coralite® Plus 750	CD3	UCHT1	CL750-FcA65570	Rabbit IgG	T细胞标志物	
633	APC	CD19	4G7	APC-FcA65562	Rabbit IgG	B细胞标志物	
488	Coralite® Plus 488	CD4	240427E12	CL488-FcA98042	Rabbit IgG	辅助性T细胞标志物	
405	Coralite® Plus 405	CD8	SK1	CL405-FcA65630	Rabbit IgG	细胞毒性T细胞标志物	
—	同一抗相同亚型及染料	Rabbit IgG	240953C9	裸抗：FcA98136		同型对照	
405	Phantom Dye Violet 540	活细胞	货号：PD00006			死活细胞鉴定染料	

2. FcZero-rAb®人 B 细胞染色方案

激光(nm)	荧光染料	靶点	克隆	流抗货号	抗体亚型	应用	Panel套装
488	CoraLite® Plus 488	CD45	241670E10	CL488-FcA98117	Rabbit IgG	白细胞标志物	货号： PK30052
633	CoraLite® Plus 750	CD3	UCHT1	CL750-FcA65570	Rabbit IgG	T细胞标志物	
633	APC	CD19	4G7	APC-FcA65562	Rabbit IgG	B细胞标志物	
561	PE	CD20	2H7	PE-FcA65575	Rabbit IgG	B细胞标志物	
405	CoraLite® Plus 405	CD21	BU32	CL405-FcA65591	Rabbit IgG	表达随B细胞发育阶段变化	
—	同一抗相同亚型及染料	Rabbit IgG	240953C9	裸抗：FcA98136		同型对照	
405	Phantom Dye Violet 540	活细胞	货号：PD00006			死活细胞鉴定染料	

3. FcZero-rAb®人自然杀伤细胞染色方案

激光(nm)	荧光染料	靶点	克隆	流抗货号	抗体亚型	应用	Panel套装
633	CoraLite® Plus 750	CD3	UCHT1	CL750-FcA65570	Rabbit IgG	阴性标志物	货号： PK30053
633	APC	CD226	11A8	APC-FcA65573	Rabbit IgG	阴性标志物	
488	CoraLite® Plus 488	CD56	240078A7	CL488-FcA98033	Rabbit IgG	区分 NK 细胞亚群	
405	CoraLite® Plus 405	CD16	3G8	CL405-FcA65612	Rabbit IgG	区分 NK 细胞亚群	
561	PE	CD7	242402H8	PE-FcA98204	Rabbit IgG	成熟 NK 细胞标志物	
—	同一抗相同亚型及染料	Rabbit IgG	240953C9	裸抗：FcA98136		同型对照	
405	Phantom Dye Violet 510	活细胞	货号：PD00005			死活细胞鉴定染料	

4. FcZero-rAb®人 TBNK 染色方案

激光(nm)	荧光染料	靶点	克隆	流抗货号	抗体亚型	应用	Panel套装
633	Coralite® Plus 750	CD3	UCHT1	CL750-FcA65570	Rabbit IgG	T细胞标志物	货号： PK30050
633	APC	CD19	4G7	APC-FcA65562	Rabbit IgG	B细胞标志物	
488	Coralite® Plus 488	CD4	240427E12	CL488-FcA98042	Rabbit IgG	辅助性T细胞标志物	
405	Coralite® Plus 405	CD8	SK1	CL405-FcA65630	Rabbit IgG	细胞毒性T细胞标志物	
561	PE	CD56	240078A7	PE-FcA98033	Rabbit IgG	NK 细胞标志物	
—	同一抗相同亚型及染料	Rabbit IgG	240953C9	裸抗：FcA98136		同型对照	
405	Phantom Dye Violet 540	活细胞	货号：PD00006			死活细胞鉴定染料	

5. 食蟹猴TBNK染色方案

激光(nm)	荧光染料	靶点	克隆	流抗货号	抗体亚型	应用	Panel套装
405	Coralite® Plus 405	CD45	251964B9	CL405-98117-5	Rabbit IgG	白细胞标志物	货号： PK30057
488	Coralite® Plus 488	CD20	2H7	CL488-65575	Mouse IgG2a	B细胞标记物	
633	APC	CD3	SP34	APC-FcA98319-2	Rabbit IgG	T细胞标记物	
488	PerCP	CD4	240427E12	CP-98042	Rabbit IgG	辅助性T细胞标志物	
561	Coralite® Plus 594	CD8	243018F10	CL594-98470-2	Rabbit IgG	细胞毒性T细胞标志物	
561	PE	CD16	3G8	PE-FcA65612	Mouse IgG2a	NK 细胞标志物	
633	Coralite® Plus 750	CD11b	M1/70	CL750-65672	Rat IgG2a	髓系细胞标志物	
—	同一抗相同亚型及染料	Rabbit IgG	240953C9	裸抗：FcA98136		同型对照	
		Mouse IgG2a	MOPC-173	裸抗：65571-1-MR			
		Rat IgG2a	250862A1	裸抗：98427-1-TR			
405	Phantom Dye Red 540	活细胞	货号：PD00006			死活细胞鉴定染料	

6. FcZero-rAb®人初始/记忆T细胞染色方案

激光(nm)	荧光染料	靶点	克隆	流抗货号	抗体亚型	应用	Panel套装
633	CoraLite® Plus 750	CD3	UCHT1	CL750-FcA65570	Rabbit IgG	T细胞标志物	货号： PK30058
633	APC	CD4	240427E12	APC-FcA98042	Rabbit IgG	辅助性T细胞标志物	
405	CoraLite® Plus 405	CD8	SK1	CL405-FcA65630	Rabbit IgG	细胞毒性T细胞标志物	
488	CoraLite® Plus 488	CD45RA	F8-11-13	CL488-FcA65590	Rabbit IgG	初始T细胞标志物	
561	PE	CD45RO	UCHL1	PE-FcA65613	Rabbit IgG	记忆T细胞标志物	
同一抗相同亚型及染料		Rabbit IgG	240953C9	裸抗：FcA98136		同型对照	
405	Phantom Dye Violet 510	活细胞	货号：PD00005			死活细胞鉴定染料	

7. FcZero-rAb®小鼠活化T细胞染色方案

激光(nm)	荧光染料	靶点	克隆	流抗货号	抗体亚型	应用	Panel套装
633	APC-Cyanine7	CD3	17A2	AY7-FcA65659	Rabbit IgG	T细胞标志物	货号： PK30059
405	CoralLite® Plus 405	CD4	RM4-4	CL405-FcA65655	Rabbit IgG	辅助性T细胞标志物	
561	PE	CD8	242879C10	PE-FcA98472-2	Rabbit IgG	细胞毒性T细胞标志物	
633	CoralLite® Plus 647	CD25	242494H5	CL647-FcA98288	Rabbit IgG	T细胞活化标志物	
488	CoralLite® Plus 488	CD69	250269C11	CL488-FcA98440	Rabbit IgG	T细胞活化标志物	
—	同一抗相同亚型及染料	Rabbit IgG	240953C9	裸抗：FcA98136		同型对照	
405	Phantom Dye Violet 510	活细胞	货号：PD00005			死活细胞鉴定染料	

8. FcZero-rAb®人单核细胞染色方案

激光(nm)	荧光染料	靶点	克隆	流抗货号	抗体亚型	应用	Panel套装
633	CoraLite® Plus 750	CD3	UCHT1	CL750-FcA65570	Rabbit IgG	单核细胞阴性标志物	货号： PK30054
561	PE	HLA-DR	L243	PE-FcA65560	Rabbit IgG	单核细胞标志物	
488	CoraLite® Plus 488	CD14	230332D7	CL488-FcA98040	Rabbit IgG	单核细胞标志物	
405	CoraLite® Plus 405	CD16	3G8	CL405-FcA65612	Rabbit IgG	用于区分经典及非经典单核细胞	
633	APC	CD64	10.1	APC-FcA65572	Rabbit IgG	经典单核细胞高表达	
—	同一抗相同亚型及染料	Rabbit IgG	240953C9	裸抗：FcA98136		同型对照	
405	Phantom Dye Violet 540	活细胞	货号：PD00006			死活细胞鉴定染料	

9. FcZero-rAb®小鼠巨噬细胞染色方案

激光(nm)	荧光染料	靶点	克隆	流抗货号	抗体亚型	应用	Panel套装
405	Coralite® Plus 405	CD45	240356D1	CL405-FcA98035	Rabbit IgG	小鼠白细胞标志物	货号： PK30055
561	Coralite® Plus 594	CD11b	M1/70	CL594-FcA65672	Rabbit IgG	小鼠巨噬细胞标志物	
488	Coralite® Plus 488	F4/80	241959G4	CL488-FcA98236	Rabbit IgG	小鼠巨噬细胞标志物	
561	PE	CD86	230476B8	PE-FcA98025	Rabbit IgG	小鼠M1巨噬细胞标志物	
633	APC	CD206	240344D12	APC-FcA98031	Rabbit IgG	小鼠M2巨噬细胞标志物	
—	同一抗相同亚型及染料	Rabbit IgG	240953C9	裸抗：FcA98136		同型对照	
633	Phantom Dye Red 780	活细胞	货号：PD00002			死活细胞鉴定染料	

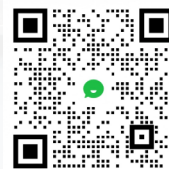
10. 人间充质干细胞染色方案

激光(nm)	荧光染料	靶点	克隆	流抗货号	抗体亚型	应用	Panel套装
561	CoralLite® Plus 594	CD44	F10-44-2	CL594-65608	Mouse IgG2a	阳性标志物	货号： PK30056
488	CoralLite® Plus 488	CD90	241290B2	CL488-98126	Rabbit IgG	阳性标志物	
633	CoralLite® Plus 647	Endoglin/ CD105	241196D9	CL647-98013-2	Rabbit IgG	阳性标志物	
561	PE-Cyanine7	CD73	AD2	PY7-65564	Mouse IgG2a	阳性标志物	
405	CoralLite® Plus 405	CD45	241670E10	CL405-98117	Rabbit IgG	阴性标志物	
		CD34	242069A6	CL405-98145-4	Rabbit IgG	阴性标志物	
		CD14	230332D7	CL405-98040	Rabbit IgG	阴性标志物	
		CD11b	ICRF44	CL405-65582	Rabbit IgG	阴性标志物	
		CD19	4G7	CL405-65562	Rabbit IgG	阴性标志物	
		HLA-DR	L243	CL405-65560	Rabbit IgG	阴性标志物	
—	同一抗相同亚型及染料	Mouse IgG2a	MOPC-173	裸抗：65571-1-MR		同型对照	
		Rabbit IgG	240953C9	裸抗：FcA98136		同型对照	
405	Phantom Dye Violet 540	活细胞	货号：PD00006			死活细胞鉴定染料	



Proteintech 可提供专业的流式配色和数据分析服务

欢迎联系 Proteintech 流式技术咨询相关服务



扫码咨询流式技术支持



READING THE BOOK OF LIFE



WeChat Official Account

Proteintech Group, USA,
5400 Pearl Street, Suite 300,
Rosemont, IL 60018, USA
t. 1-888-478-4522
e. proteintech@ptglab.com

Proteintech Europe,
Manchester Science Park, Kilburn House,
Lloyd Street North, Manchester, M15 6SE
t. (+44)-161-22-66-144
e. europe@ptglab.com

武汉三鹰生物技术有限公司
武汉市东湖开发区高新大道 666 号 D3-3
t. 027-87531633
e. Proteintech-CN@ptgcn.com