

流式细胞分选技术介绍

——流式中文网技术交流



郭陈智

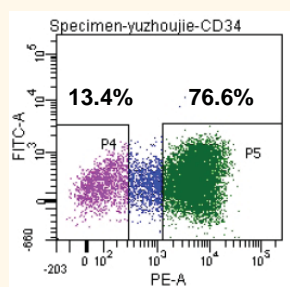
chenzhig@miltenyibiotec.com.cn

2013-9-6

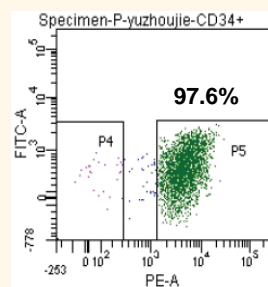


流式分选与FACS

- FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) 流式分选
- MACS (Magnetic-Activated Cell Sorting) 磁珠分选
- ✓ FACS和MACS各有特点，不能相互替代；
- ✓ 推荐MACS和FACS相结合的方法：如脐血先磁珠分选富集CD34⁺细胞，然后标记CD34-PE进一步流式分选。



分选前



分选后测纯



流式分析仪 VS 流式分选仪

- **分析型**流式细胞仪

- ✓ 细胞样本分析后最终进入废液桶，不能回收利用。

- **分选型**流式细胞仪

- ✓ 既能流式分析，还能对分析的目的细胞进行分选；
- ✓ 进样管道较长，还需要保持无菌状态，所以分选型流式细胞仪一般只用于分选。



流式分选仪分类：

- Electrostatic Sorting 电荷式分选

- ✓ Stream-in-air/Jet-in-air system 空气中激发
- ✓ Flow-cell/Cuvette system 流动室中激发

- Mechanical Sorting 机械式分选

- ✓ Calibur 捕获管式分选
- ✓ Owl/MACSQuant Tyto 微芯片控制的机械式分选



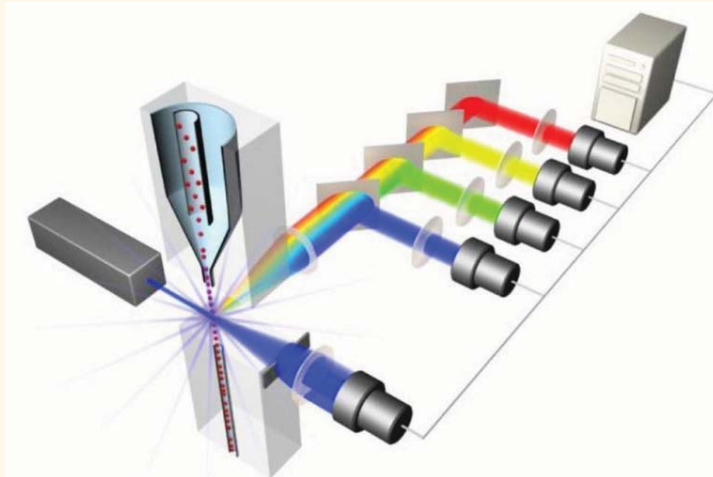
1、电荷式分选

- 准确的分析

- ✓ 液流系统
- ✓ 光学系统
- ✓ 电子系统

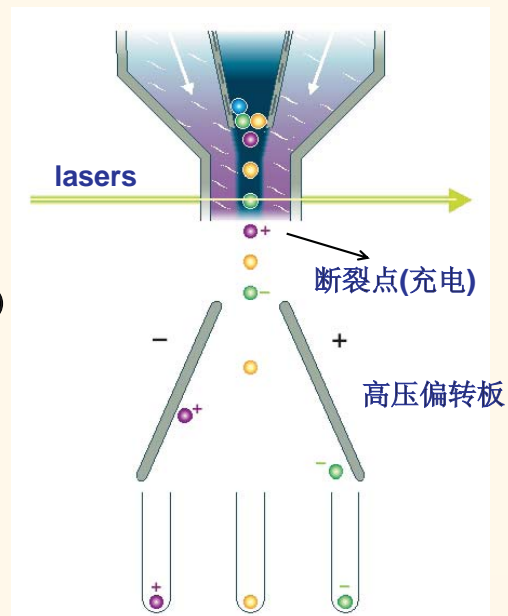
- 精确的分选

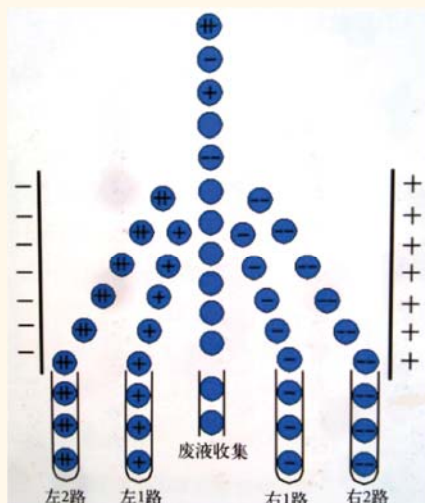
- ✓ 分选系统
 - 喷嘴
 - 电偏转板
 - 样本收集器



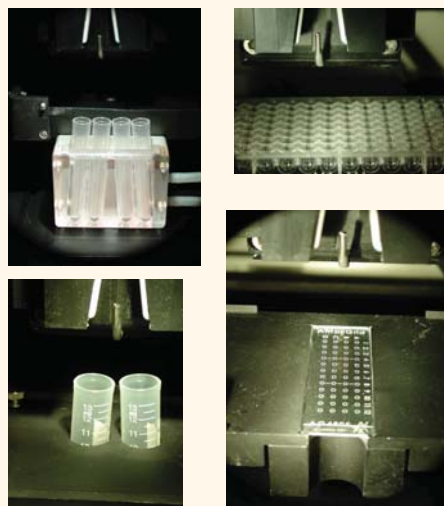
电荷式分选原理

- 超声振动器 (4-200kHz)
- 液流充电系统
- 高压偏转板
- 收集装置 (流式管、培养板)

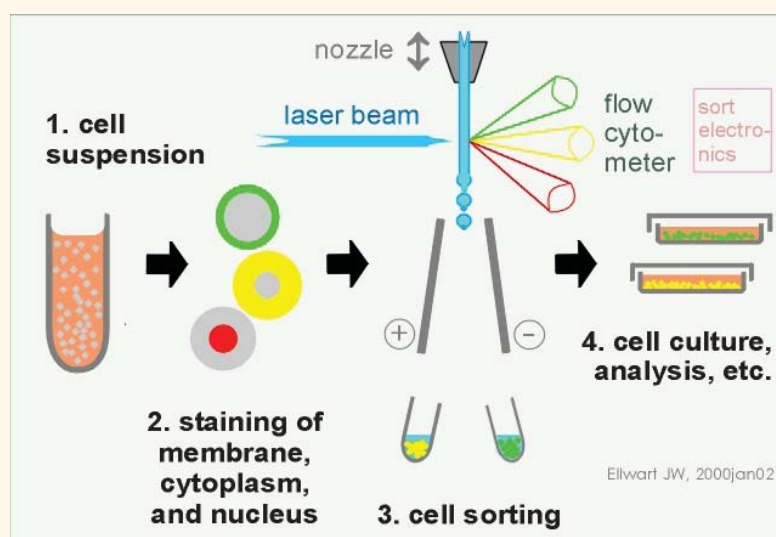




四路分选原理



电荷式分选接受装置



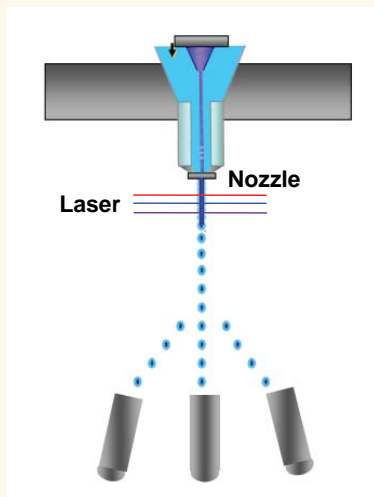
电荷式分选过程

直接分选的是液滴

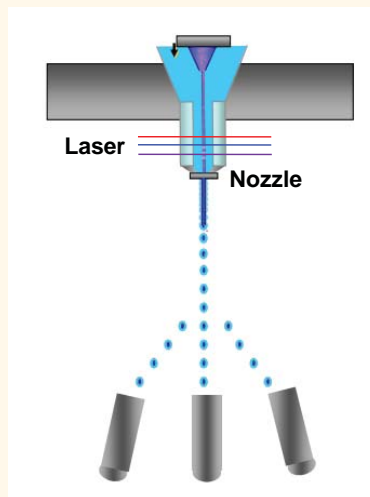


空气中激发 VS 流动室中激发

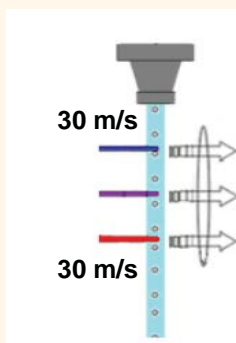
空气中激发(大部分分选仪)



流动室中激发(分析仪及Aria系列)

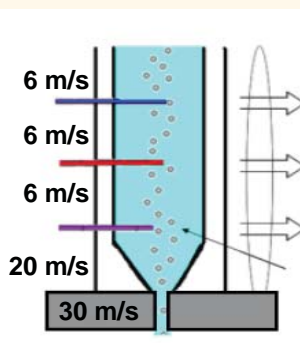


空气中激发



- 分选速度快;
- 操作比较复杂;
- 细胞损伤小, 活性好;
- 速度快, 灵敏度低。

流动室中激发



- 分选速度稍慢;
- 固定结构, 操作简单;
- 易碎或大细胞容易产生碎片, 得率低;
- 灵敏度高。



常见的流式分选仪



FACSAria III

最高6激光18色，流动室中激发分选仪，市场占有率高。



FACSJazz

个人化分选仪，最高3激光6色，固定100 μ m喷嘴，两路分选。



Influx: 最高10激光22色，高端分选仪，六路分选。



流式中文网

flowcyto.cn



MoFlo XDP 高端分选型
最高9激光18色，四路分选



MoFlo Astrios 高端分选型
最高7激光49色，六路分选



Bio-Rad S3 Cell Sorter
个人化流式分选仪，最多2激光（488/561）4色，100 μ m喷嘴，两路分选。



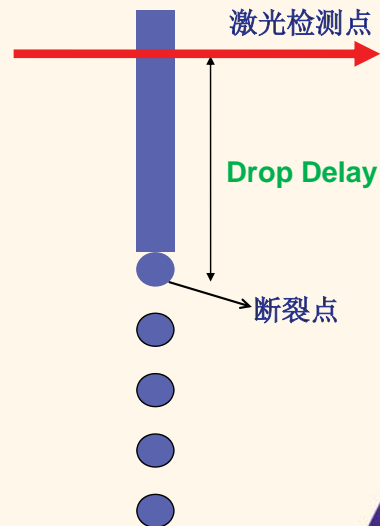
Sony-SH800晶片式全自动分选仪，最高4激光8参数。



Miltenyi MACSQuant Tyto
微芯片控制的机械式分选仪。

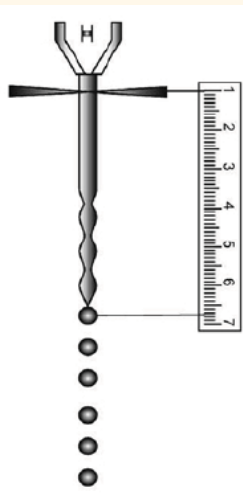
液滴延迟(drop delay)

- 定义：Drop Delay指细胞从激光检测点到液滴断裂点之间的时间差。
- 准确的液滴延迟时间才能保证充电偏转的细胞是感兴趣的细胞。
- 分选前必须测量延迟时间，准确的drop delay是高纯度、高得率分选的前提。

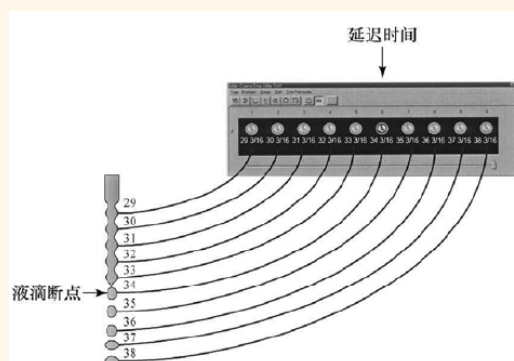


液滴延迟时间的测量

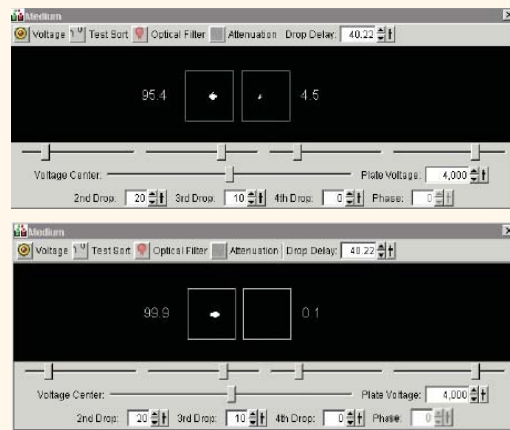
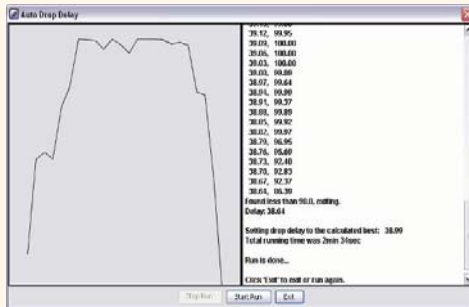
距离测量法



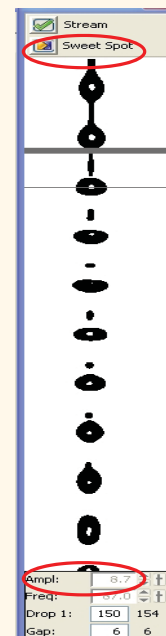
荧光微球分选法



- Accudrop微球模拟分选；
- 照相系统检测偏转百分比；
- 自动调节延迟时间。



- 断裂点位置稳定：
 - ✓ 气泡；
 - ✓ 喷嘴堵塞；
 - ✓ 温度变化；
 - ✓ 溶液介质改变；
 - ✓ ...
- 自动调节振幅Amp1，维持断裂点稳定；
- 自动监控系统：液流不稳时中断分选，避免影响分选纯度。



分选指标

- 纯度 (purity)
 - ✓ 分选后所得到的细胞是否是想要的?
- 得率 (recovery)
 - ✓ 分选后得到的细胞数量是否够用?
- 活性 (viability)
 - ✓ 分选后有多少细胞是活的?
- 分选速度 (high speed)
- 如何才能快速分选到**高纯度**、**高得率**、**高活性**的细胞?



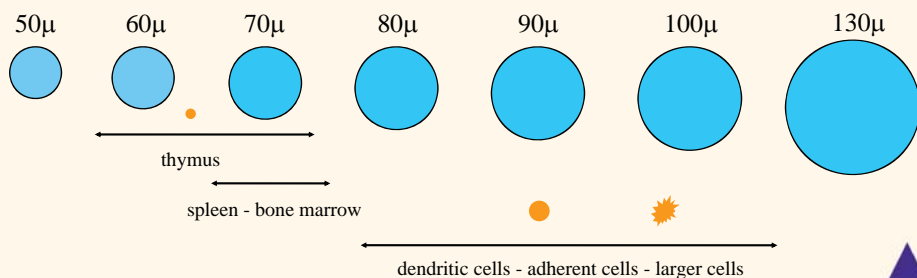
电荷式分选的影响因素

- **喷嘴大小** (Nozzle)
 - ✓ 常见70 μm , 85 μm , 100 μm , 120 μm 可更换。
- **鞘液压力** (Pressure)
 - ✓ MoFlo XDP/Astrios 4-100 psi, Influx 1-90 psi。
- **振荡频率** (Drop Frequency)
 - ✓ MoFlo XDP/Astrios 0~200 kHz, Influx 9~180 kHz。
- **上样速度** (Sample Flow Rate) events/sec
 - ✓ 上样速度=最大分选速度。



喷嘴大小很关键

- Drop stability and Recovery are best when the cell size \leq nozzle parameter/6, usually poor if the cell size $>$ nozzle parameter/4.
- 小喷嘴对应大的鞘液压力，对细胞有物理损伤。



喷嘴大小、鞘液压力和振荡频率

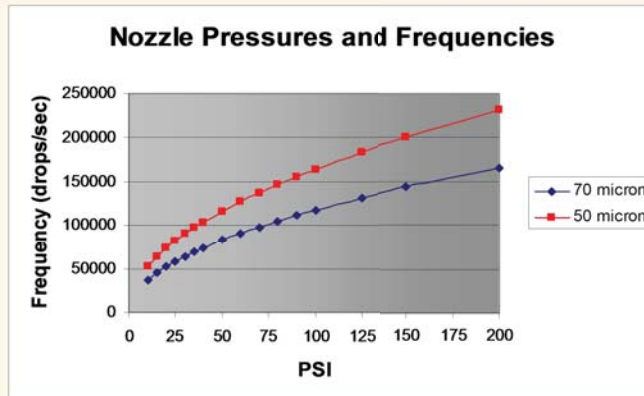
- 最佳的液滴振荡频率: $f = v / (4.5 d)$;
f为振荡频率, v为流速, d为喷嘴直径
如: 液体流速V=20 m/sec ; 喷嘴直径d=70μm $20 / (4.5 * 70) = 63.5 \text{ kHz}$
- 喷嘴一定时, 鞘液压力相对固定, 对应相应的振荡频率。

| Nozzle diameter | Sheath pressure | Frequency |
|-----------------|-----------------|-------------|
| 50 μm | 60-80 psi | 120-160 KHz |
| 70 μm | 45-60 psi | 65-100 KHz |
| 80 μm | 35-50 psi | 45-80 KHz |
| 100 μm | 16-30 psi | 28-45 KHz |
| 130 μm | 10-15 psi | 16-25 KHz |
| 150 μm | 6-10 psi | 7-12 KHz |



振荡频率与上样速度

- Rule: 为获得更好的纯度和得率, 4个以上液滴里面1个细胞。
分选仪振荡频率为200 kHz, 最大上样速度为 $200000/4=50000$ events/s
- 振荡频率越大, 分选速度越快。越快越好?

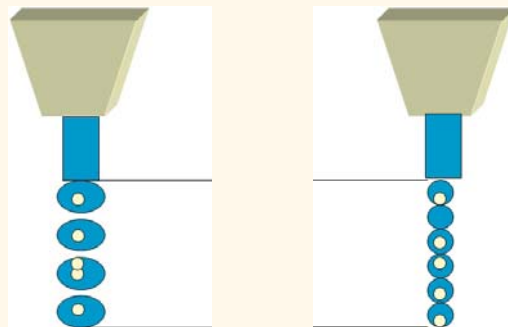


振荡频率越大;
鞘液压力越大;
细胞损伤越大;



上样速度、纯度、得率





- 冲突事件(conflict/coincidence): 两个细胞离的太近, 可能进入同一个液滴。
- 对冲突事件的不同处理, 影响分选纯度和得率。
- 如何减少冲突事件: 增大振荡频率; 减小进样速率。

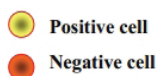


冲突事件的处理：分选模式

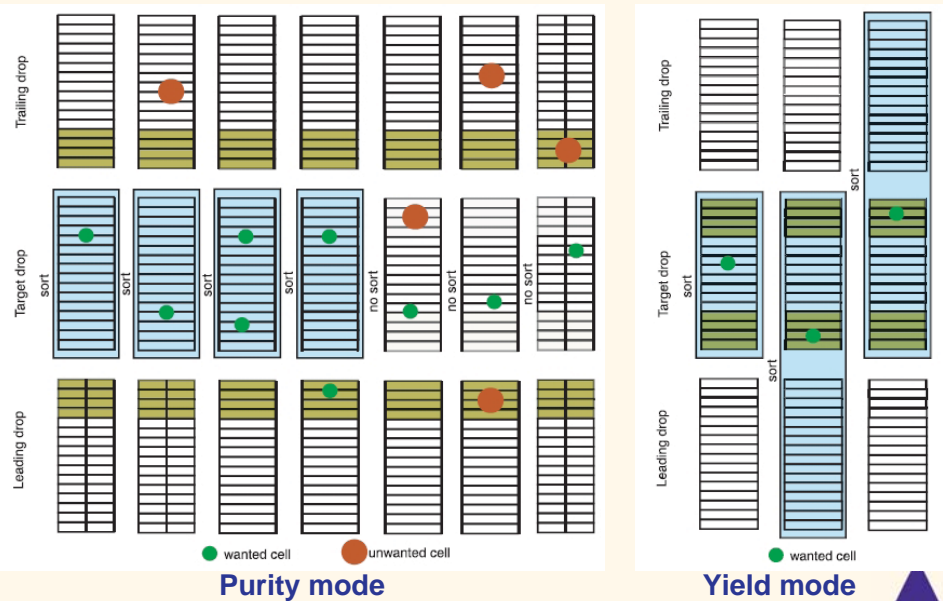
- **Purity mode**: 以纯度为主，冲突事件中非目标细胞和目标细胞可能进入同一液滴，目标细胞也一起被舍弃。
- **Yield/Enrich mode**: 以得率为主，只要含有目标细胞的液滴都被分选，如果目标细胞位于两个液滴的边缘，为保证得率，两个液滴都被分选，不管有没有非目标细胞。
- **Single cell mode**: 确定细胞位于液滴中间时才被分选，细胞位于两液滴边缘时被舍弃。
- 小技巧：实际操作中可以组合运用，如：先yield mode分选粗筛节约时间，再用purity mode分选保证纯度。



| | Purity mode | Yield/Enrich mode | Single cell mode |
|---|-------------|-------------------|------------------|
|  | sort | sort | sort |
|  | no sort | no sort | no sort |
|  | no sort | sort | no sort |
|  | sort | sort | no sort |



Practical issues in high-speed cell sorting. Curr Protoc Cytom, 2010 Chapter 1: Unit 1.24.1-1.30.



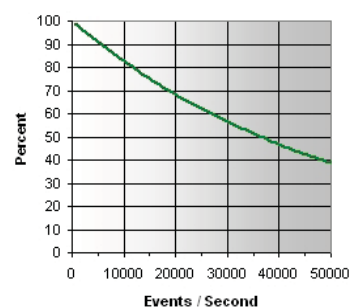
高速分选的代价-速度越快，得率越低（Poisson分布原则）

TSRI Sort Recovery Page
Version 6.1 Recovery = $e^{-(1-S)^r \cdot T \cdot r^t}$
For BD FACSaria and FACS/Vantage/Diva Cell Sorters

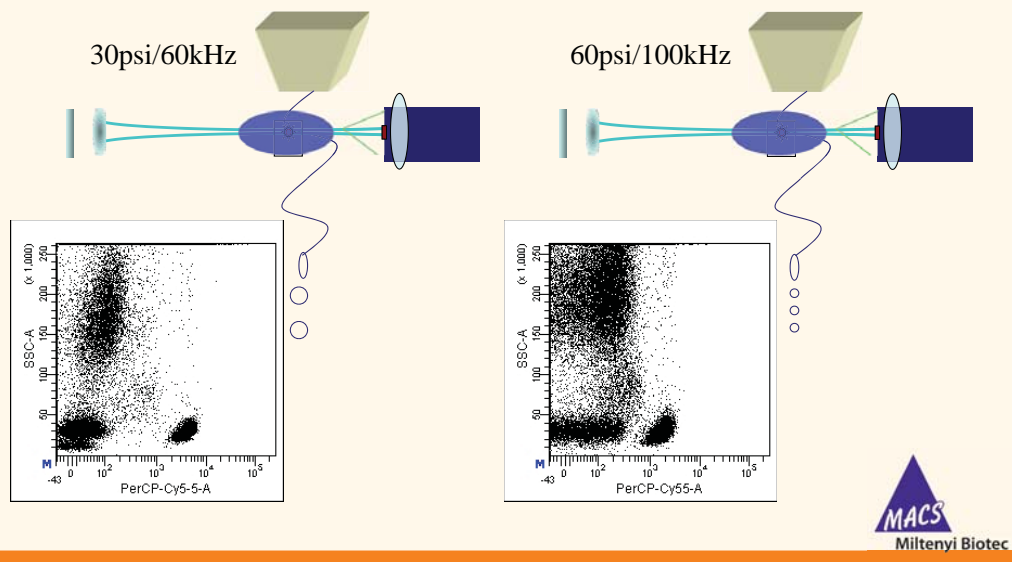
| Input Parameters | | Output Parameters | |
|---|--|--|--|
| Sorter Type: <input type="radio"/> Vantage SE <input checked="" type="radio"/> Digital <input type="radio"/> Vantage/Plus | Mode: <input checked="" type="radio"/> Normal-R1 <input type="radio"/> Count | Deadtime Loss: <input type="text"/> % | Throughput: <input type="text"/> /hr |
| Sort Envelope: <input type="text"/> drops <input type="text"/> purity mask | Sample Flow Rate: <input type="text"/> events/sec | Sort Left | |
| Drop Frequency: <input type="text"/> Hz | Dead Time: <input type="text"/> μ s | Rate: <input type="text"/> /hr <input type="text"/> /sec | Yield: <input type="text"/> hr <input type="text"/> min <input type="text"/> % |
| Sort fractions: Left: <input type="text"/> % Right: <input type="text"/> % | Desired Yield: Left: <input type="text"/> Right: <input type="text"/> % | Sort Right | |
| Max Sample Loss: <input type="text"/> % of sort left subset | Action: <input type="button"/> Sort <input type="button"/> Reset | Rate: <input type="text"/> /hr <input type="text"/> /sec | Yield: <input type="text"/> hr <input type="text"/> min <input type="text"/> % |
| | | Max: / sec <input type="text"/> 3.5 drops/event | |

<http://facs.scripps.edu/recovery.html>

Sheath psi = 70
Drop Fre = 87 kHz
Purity mask=32



高速分选的代价-速度越快，灵敏度下降

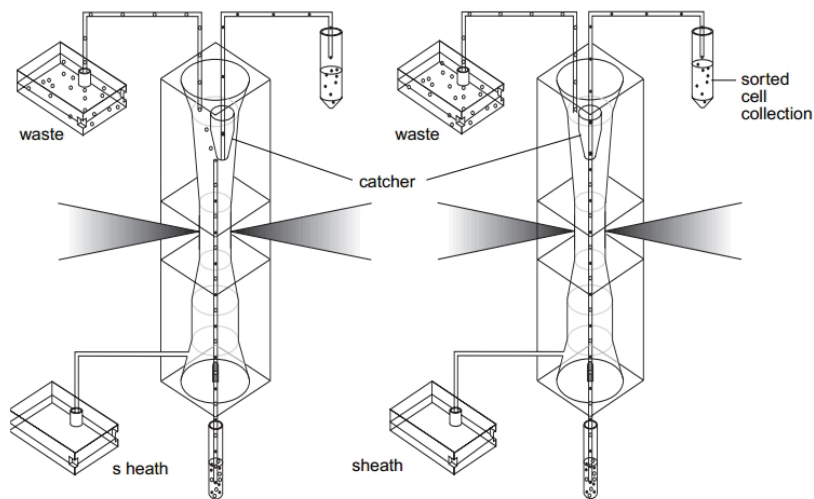


总结:

- 大的喷嘴，细胞活性越好，分选速度慢；
- 振荡频率越大，分选速度越快，鞘液压力太大；
- 分选速度越快，冲突事件越多，得率和纯度下降；
- 不同的分选模式，得率和纯度相互矛盾。
- 安全性问题！—气溶胶 (Aerosols)
 - ✓ 你分选的样本安全吗？病人的，感染病毒的？
 - ✓ 你的机器有气溶胶去除装置吗？有效期内吗？



2. 机械式分选



(Left) catcher tube in sheath stream; (right) catcher tube in sample stream



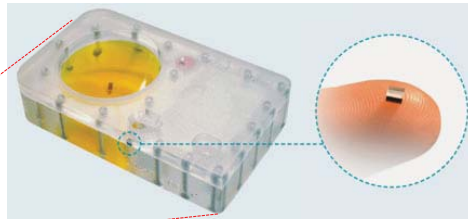
电荷式分选局限：

- 高压高速高电荷对细胞活性的影响；
 - ✓ 低活性、碎片多，分选得率低。
- 很难达到临床应用的级别；
 - ✓ 鞘液、样本很难达到全封闭；
 - ✓ 管路不易更换。
- 分选操作复杂；
 - ✓ 液流的稳定性，电荷大小、延迟时间；
- 液滴气溶胶导致安全隐患；
 - ✓ 病毒、病人等样本。

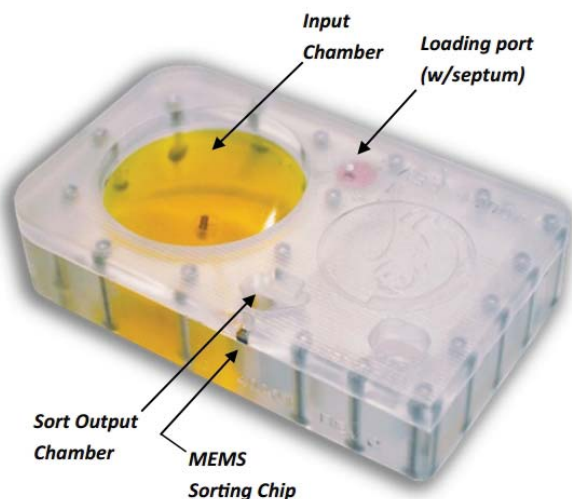
Owl/MACSQuant Tyto 微芯片控制的流式分选仪



Microchip-Based Cell Sorter



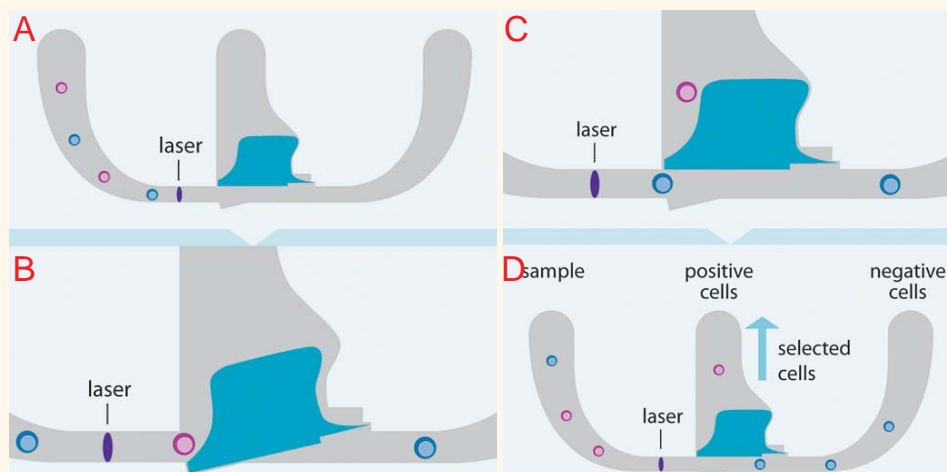
Microchip-based sorting cartridge



Microchip
控制的世界最快的
阀(15 μ sec/次)
，使高速
的机械式
分选成为
现实。

MEMS(microelectronmechanical system) and Microfluidics

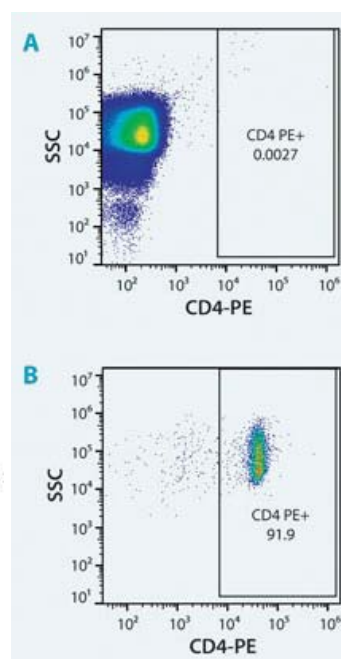
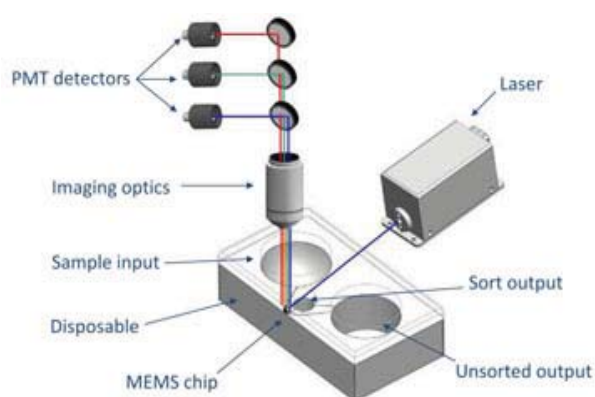




Mechanism of microchip-based sorting



Experiment Application:



Easy-to-use Disposable Cartridge

通过无菌注射器将细胞样本加入样本盒中。

1



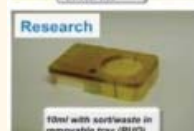
将样本盒插入分选机器中，完成高速分选。

2



从回收孔中吸出分选后的细胞，用于后续试验。

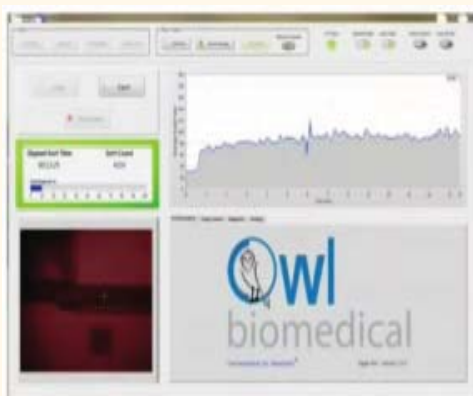
3



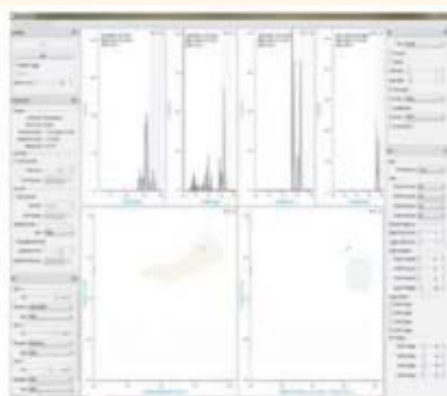
Miltenyi Biotec



Easy-to-use Software



For novice users



For Expert users



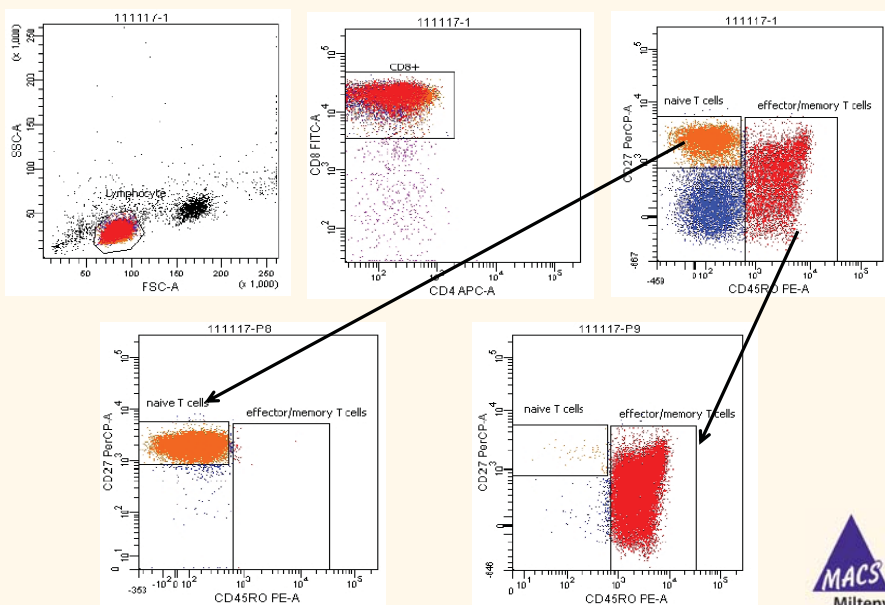
Miltenyi Biotec

总结:

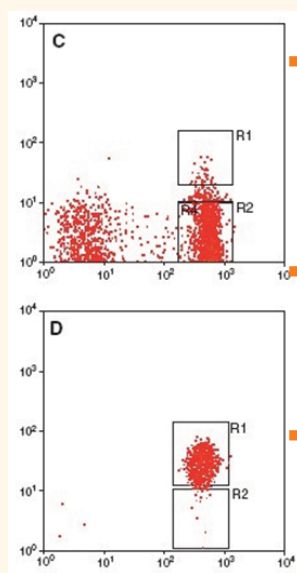
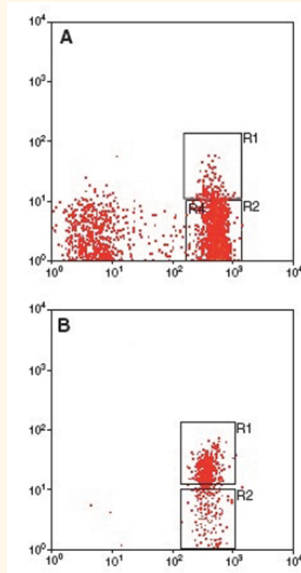
- 可获得高活性、高得率、高纯度的细胞;
- 无鞘液的封闭液流设计, 保证无菌;
- 可更换的样本槽设计, 避免样本间交叉污染;
- 不会产生气溶胶, 杜绝生物危害;
- 操作简单, 适合临床应用;
- 单路分选 (sequential sorting) ;
- 样本盒, 耗材成本;
- 无鞘液设计, 复杂的科研样本?



3.1 分选设门的影响-独立群体的分选



3.1 分选设门的影响-非独立群体的分选



■ 弱阳性的非独立群体的分选，中间可能有一个阴阳性细胞混合区。

■ R1和R2靠的近点，较高的得率，但牺牲了纯度。

■ R1和R2离的远点，较高的纯度，牺牲了得率。

