

# BD FACSAria 流式细胞仪单细胞分选、 培养的经验总结

管强东, 刘艳青, 熊建平, 钟义红, 沈链链

(南京医科大学公共卫生学院, 江苏南京 211166)

**摘要:** 阐述了利用 BD FACSAria 流式细胞仪进行单细胞分选的关键点, 包括良好的细胞状态、合适的细胞浓度、喷嘴尺寸的选择、液体延迟(drop delay)值的确定以及调整自动化细胞沉积单元(ACDU)的位置。经单细胞分选后再培养获得的细胞的平均荧光强度和纯度优于管式分选后培养的细胞。为了获得平均荧光强度和纯度良好的细胞, 应尽量多保留仅含单细胞的孔且每孔单独培养, 待细胞数足够时再用流式细胞术挑选出平均荧光强度和纯度好的细胞。详细介绍了整个过程, 为该领域的研究人员提供参考借鉴。

**关键词:** 流式细胞术; 单细胞分选; 细胞培养

中图分类号: O6; Q2

文献标志码: B

文章编号: 1006-3757(2025)02-0116-05

DOI: 10.16495/j.1006-3757.2025.02.005

CSTR: 32263.14.j.1006-3757.2025.02.005

## Experience with Single Cell Sorting on a BD FACSAria Flow Cytometer and Subsequent Single Cell Culture

GUAN Qiangdong, LIU Yanqing, XIONG Jianping, ZHONG Yihong, SHEN Lianlian

(School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China)

**Abstract:** The key points of single cell sorting on a BD FACSAria flow cytometer were elucidated, including a good state of cells, an appropriate cell concentration, the selection of nozzle size, drop delay determination and adjustment of the home location of ACDU (automatic cell deposition unit). The mean fluorescence intensity and purity of cells obtained by single cell sorting and subsequent cell culture were better than cells that were sorted into a tube and cultured. In order to obtain cells with both high mean fluorescence intensity and purity, more wells containing only one single cell should be selected and cells in these wells should be cultured individually. When the number of cells was sufficient, cells with high mean fluorescence intensity and purity should be selected by flow cytometry. The whole process was introduced in detail, offering valuable references for researchers in this field.

**Key words:** flow cytometry; single cell sorting; cell culture

目前, 纯化细胞的方法主要有密度梯度离心法<sup>[1]</sup>、免疫磁珠分选法<sup>[2]</sup>及流式细胞分选法<sup>[3]</sup>等, 相对来说, 后两种方法较第一种方法应用更广泛。免疫磁珠分选法与流式细胞分选法各有优缺点, 相比之下, 流式细胞分选法具有可同时进行多色标记、多路分

选等优点, 且在一些试验中, 其效率较免疫磁珠分选法更高, 能获得更高活性的细胞<sup>[4]</sup>, 因此, 在生物学、医学研究中应用广泛<sup>[5]</sup>。

流式细胞术是一种快速、准确、客观的检测直线流动状态中单个细胞或颗粒的多项物理及生物

收稿日期: 2024-10-11; 修订日期: 2025-03-28

基金项目: 江苏省高校优势学科建设工程项目资助项目; 南京医科大学科技发展基金资助项目(NMUB 2019010)

作者简介: 管强东(1992—), 男, 实验师, 研究方向: 流式细胞术、质谱技术在医学研究中的应用, E-mail: gqd@njmu.edu.cn

通信作者: 沈链链(1984—), 女, 实验师, 研究方向: 流式细胞术在医学研究中的应用, E-mail: lianlianshen@njmu.edu.cn

学特性,且进行分析定量的技术.在流式分析的基础上,对目的细胞进行捕获,使其落入特定装置,就是流式细胞分选.流式细胞分选具有快速便捷、可同时进行多路分选(分选不同类型细胞)及单细胞分选的特点,在获得高纯度目的细胞、分离低含量细胞和多孔板分选中具有显著优势<sup>[6]</sup>,因此广泛应用于基础研究、临床研究、生物制药等领域.单细胞分选是将单个目的细胞分选至微孔板(通常是 96 孔板)中,流式单细胞分选技术凭借有高通量、多参数等特性,较人工稀释法更省时、省力<sup>[7]</sup>,因而适用于单细胞分离<sup>[8]</sup>.但由于细胞需要经历分选以及单细胞不断分裂的漫长过程,导致成功率相对较低.因此,单细胞分选对样本准备、仪器调试以及后续的细胞培养要求较高.医学研究中,常使用慢病毒介导绿色荧光蛋白(GFP)标记细胞进行研究,但当细胞传代到一定代数时,常出现 GFP 表达减弱,细胞间荧光信号差异大等问题,需要进行单细胞分选获取 GFP 强阳的细胞.本文以慢病毒稳转的 GFP 标记的肿瘤细胞为例,总结了使用 BD FACSAria 分选 GFP 强阳单细胞至 96 孔板中的流程以及后续观察、培养的经验.

## 1 仪器与试剂

分选型流式细胞仪 FACSAria、Accudrop 小球购自美国 BD 公司.

## 2 样本制备

### 2.1 细胞状态

由于瞬时转染的细胞系 GFP 表达不稳定,即使经过分选,待细胞由一个细胞分裂至足够数量时已经历较长时间,转染的效果已微乎其微,分选也就没有意义,因此,必须使用稳定转染的细胞.由于流式细胞分选过程中含细胞的液滴在生成、掉落过程中会对细胞产生一定的损伤,因此所采用的细胞样本必须状态较好,否则即使分选了单细胞入孔,单个细胞无法长成克隆团,结果也是失败的.因此,必须待细胞状态较好(处于指数增长期)时,再进行单细胞分选.

### 2.2 细胞消化、重悬

细胞消化、离心去上清后,使用 PBS(phosphate buffer saline,磷酸缓冲盐溶液)将细胞重悬<sup>[9]</sup>.有学

者建议,使用不含钙镁离子的 1×PBS(pH 7.2~7.4)重悬细胞,且为了更好地保证细胞状态,可加入 1% 胎牛血清提供营养支持<sup>[10]</sup>.选择 single cell 模式分选时,细胞团数量一定,加入的重悬细胞的液体越少,则细胞越浓,分选耗时越短,但冲突事件概率大,浪费(流入废液)的目的细胞多;反之,细胞越稀,分选耗时越长,但冲突事件概率小,浪费的目的细胞少.因此,需综合考虑待分选细胞总数、待分选细胞中目的细胞的百分比、分选时长对细胞状态的影响等因素,决定重悬细胞液体的体积.

上机前观察样本,若出现絮状物,必须过滤,若细胞过滤完后短时间内容易再次成团,可将样本分为几份,每份样本都在上机前过滤,过滤后立刻上机,减少细胞成团.部分贴壁细胞,在消化时释放出粘性 DNA,导致细胞因结团无法打散,可在重悬液体中加入适量 DNA 酶<sup>[10]</sup>.

## 3 单细胞分选及培养流程及操作

### 3.1 预加培养基至 96 孔板及分选前仪器调试

由于单个细胞难以培养,可预先将加入 96 孔板中培养基的血清浓度适当提高.为了防止污染,也可适当提高培养基中抗生素的浓度.

分选所用的喷嘴尺寸越小,则压力越大、液流越稳定、分选越快,但对细胞的损伤越大;反之,喷嘴尺寸越大,则压力越小、液流越不易稳定、分选越慢,但对细胞的损伤越小.因此,应根据细胞的特性、状态、大小等选择不同的喷嘴.就细胞大小而言,一般要求喷嘴尺寸是细胞直径的 3~5 倍.因此,大多数肿瘤细胞可使用 85  $\mu\text{m}$  的喷嘴.有学者通过比较发现,综合考虑得率、纯度、细胞活性等因素, FACSAria II 流式细胞仪分选 GFP+ MCF-7 乳腺癌细胞株用 85  $\mu\text{m}$  的喷嘴最合适<sup>[11]</sup>.但较大的喷嘴尺寸对应的压力小,因此对于活性略差或较脆弱的细胞而言,为保证分选后的单细胞活性,应选择较大尺寸的喷嘴.

分选前仪器调试步骤:

(1)仪器按照常规程序进行无菌清洗,确保无菌.

(2)打开液流,确定液体延迟(drop delay)值.打开液流,排出鞘液过滤器中的气泡,调整频率和振幅,使得液流稳定(若正式分选时液流不稳,仪器会自动停止分选,造成样本、时间的浪费).用水作为

样本上样一段时间,待液流非常稳定后用 Accudrop 小球确定最佳的 drop delay 值。

(3)调整侧液流电压.调整 far left 侧液流电压,使得侧液流正好穿过防溅板孔的中心,该电压数值确定后不再改变。

(4)调整微孔板位置.放置 96 孔板(保留微孔板的盖板)在自动细胞定位装置(ACDU)上,打开 far left 侧液流,使得侧液流打在微孔板盖板上,必要时微调 ACDU 的位置,使得侧液流正好打在 96 孔板 A1 孔的中心位置.但在实际分选时,仪器侧液流打的位置可能稍有偏差,为了保险起见,可先保留微孔板盖板进行预分选测试,在不同区域选取若干孔位(如 A、D、H 行各选择第 1、6、12 孔)分选,分选 50 个细胞(50 个细胞形成的液滴落在盖板,其液滴大小正好有利于观察,为了节约样本,可以分选 P1 门的细胞,而非目的细胞)至盖板上,观察分选至盖板的液滴是否位于孔中心或存在可接受的轻微偏差.若位置偏差不可接受,可再次微调 ACDU 的位置并再次分选至盖板进行测试,直至所有液滴打至各孔的位置偏差均可接受,再进行正式分选。

### 3.2 上机及分选

设置分选的门逻辑关系:圈中细胞群、去粘连、圈中阳性细胞群.先运行仪器 1 min 左右让液流稳定,每孔设定 1 个细胞进行分选.记录分选 1 个孔所需的时间,若时间过长,可考虑适当调大阳性细胞的门或者适当提高软件中的流速(flow rate).但需注意的是,提高 flow rate 不利于分选,更建议在样本准备阶段减少加入的重悬细胞沉淀的液体体积,以提高细胞浓度<sup>[12]</sup>.由于 1 个孔内只打入 1 个细胞,分选后在显微镜下观察时不容易对焦.因此,建议在最后 1 个孔(按照仪器正常分选顺序,一般是 H1 孔)分选约 50 个细胞,以便通过该孔迅速完成对焦,并用此焦距确认其余孔内的细胞。

### 3.3 分选后确认每孔细胞数量及荧光强度

虽然软件中设置了每个孔内只打入 1 个细胞,但实际情况很难做到每孔都理想化,存在一个孔内打入 2 个或多个细胞的可能性,因此切勿等数天后再观察.因为此时多数孔内已有多个细胞,较难判断是单个细胞分裂出的或是分选时打入了多个细胞.所以,需在分选后放置于培养箱 1~2 h,待细胞沉底(非贴壁)后立即观察.观察时,应先在显微镜明场下确认只有 1 个细胞的孔,并用记号笔在盖板上

做标记,标记细胞在孔内的大致位置.由于也有在孔内打入荧光不强的细胞的可能性,因此需用荧光显微镜观察其荧光亮度,从只含有 1 个细胞的孔中进一步筛选出荧光较亮的孔.有学者提出了一种相对简便的方法判断是否为单细胞:用 HRP(horseradish peroxidase,辣根过氧化物酶)与 TMB(3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine,四甲基联苯胺)的显色反应,快速验证单细胞分选准确性<sup>[13]</sup>.此方法虽方便,但对于分选荧光阳性的细胞,并不能直接判断入孔单细胞的荧光强度,仍需使用荧光显微镜观察其荧光强度。

### 3.4 细胞生长观察

随后的数天,持续观察只含有 1 个荧光较亮的细胞的孔内的细胞生长情况.笔者发现,虽然分选当天看到不同孔内的单个细胞荧光强度差不多,但是随着克隆团的增大,其分裂细胞的荧光强度仍有很大差别,有的孔内细胞荧光强度均一旦荧光信号较强,应予以保留,而有的孔内细胞荧光强度差别很大,应当舍弃.建议至少保留 5~10 孔。

### 3.5 细胞换液、传代

细胞生长期间,应根据需要对保留的孔换液,为了防止细胞被洗脱、吸走,切勿使用冷的 PBS.待细胞长出克隆团,由于 1 个细胞分裂出的细胞大多挤在一起,不利于细胞生长,需将其消化、分散后再培养.细胞消化后,用含血清的培养基终止消化.由于离心后无法用肉眼看到细胞沉淀,所以无法完全去除上清液,必须至少保留 20~40  $\mu\text{L}$  的液体.因此,为了降低残留的消化液对细胞的损伤,可以在消化收集细胞后、离心前,多加入含血清的培养基.由于第一次消化时细胞数量仍不多,建议消化后仍将细胞种入 96 孔板新孔中,待细胞贴壁后立即换液,以去除残留的消化液.经数次传代培养,当细胞在 96 孔板中生长至覆盖单孔面积的 70%~80% 时,可逐步转种至 24 孔板单孔中,继而转种至 6 孔板单孔。

## 4 流式检测 GFP

笔者曾尝试用慢病毒稳转的 GFP 标记 BGC-823 胃癌细胞,用 85  $\mu\text{m}$  喷嘴同时进行管式分选和单细胞分选(管式分选与单细胞分选的原始细胞为同一细胞样本,且分选在同一天完成,分选条件、设门等完全一致).原始细胞继续培养,管式分选的细胞离心后放入培养皿继续培养,单细胞分选入 96 孔板,当天确认有且仅有一个细胞的孔,后续观察



上述孔细胞的荧光强度,最终保留3孔,数次传代.约一个月后,细胞长至足够数量,收集细胞再次进行流式检测,检测其荧光强度.检测结果如图1所示:管式分选后培养的细胞、单细胞分选后培养的细胞的平均荧光强度明显高于未分选细胞,且单细胞分选优于管式分选.就单细胞分选而言,来源于1号孔的细胞平均荧光强度较强,但均一性(纯度)不是最好;来源于2号孔的细胞的荧光强度不是最强,但均一性最好;来源于3号孔的细胞平均荧光强度和均一性都不是最好.由此可见,若能多保留

孔数,获得平均荧光强度和均一性都好的细胞的可能性就越大;否则,只能根据实验者的需求有所侧重,两者无法兼顾.

## 5 荧光显微镜观察 GFP

用荧光显微镜观察未分选细胞、管式分选后培养的细胞、来源于1号孔的单细胞培养的细胞的荧光强度.结果如图2所示:管式分选后培养的细胞和单细胞分选后培养的细胞的荧光强度均高于未分选细胞,且单细胞分选优于管式分选.

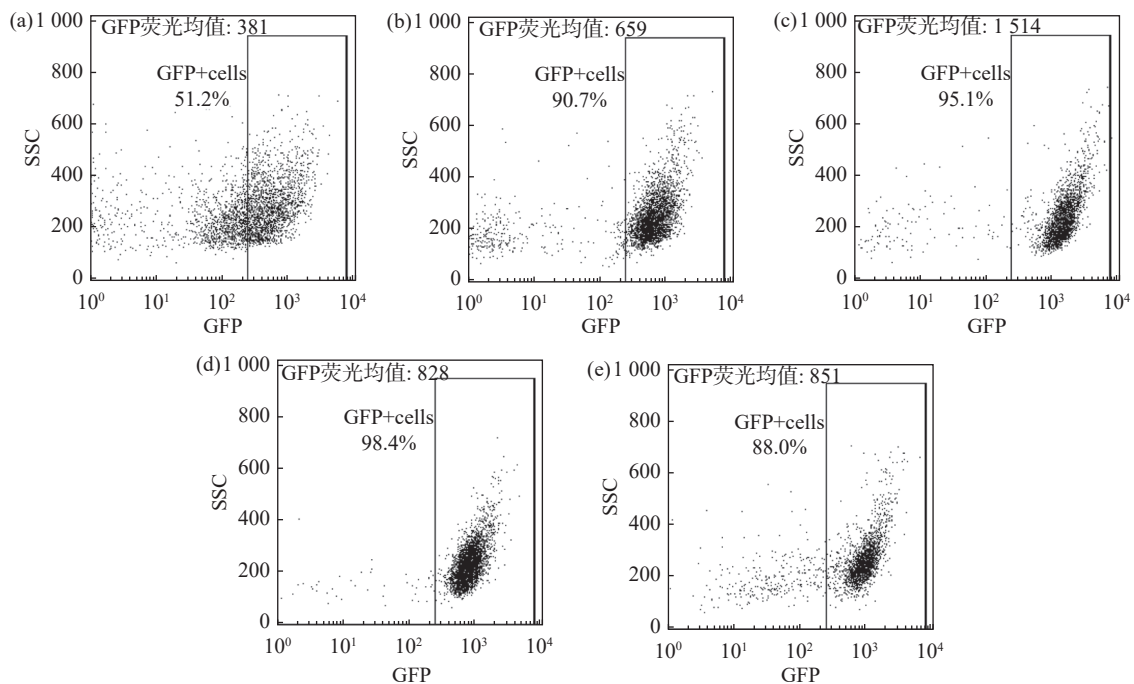


图1 流式细胞术检测(a)未分选细胞、(b)管式分选后培养的细胞、(c)~(e)单细胞分选后3个孔中单细胞各自培养获得的细胞的GFP荧光

Fig. 1 Flow cytometry detection of GFP fluorescence of (a) unsorted cells, (b) cells that were sorted into a tube and cultured, and (c)~(e) cells obtained by culturing one single cell in each of 3 wells after single cell sorting

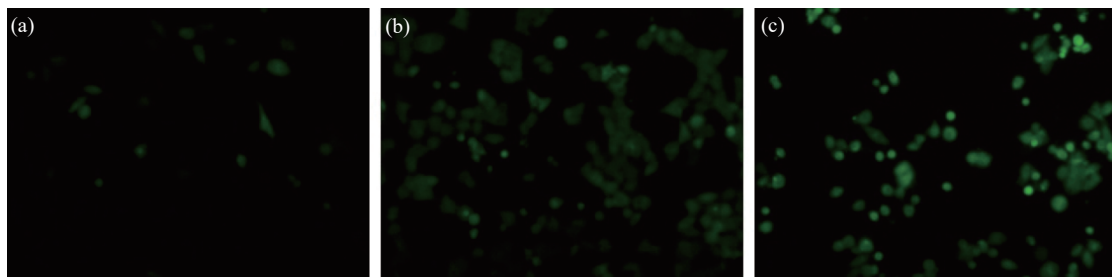


图2 (a)未分选细胞、(b)管式分选后培养的细胞、(c)单细胞分选后单个细胞培养获得的细胞的荧光成像

Fig. 2 Fluorescence imaging of (a) unsorted cells, (b) cells that were sorted into a tube and cultured, (c) cells obtained by culturing one single cell after single cell sorting

## 6 结论

总的来说,使用 BD FACSAria 进行单细胞分选时,需使用稳定转染的细胞,根据不同情况决定重悬细胞液体的体积,从而控制分选样本的细胞浓度,根据细胞大小和特性选用合适的喷嘴,确定 drop delay 值,精确调整 ACUDU 位置,分选后尽快确认有且仅有一个细胞的孔,合理换液、消化促进其生长,用流式细胞术检测荧光,挑选出平均荧光强度和纯度最优的细胞.单细胞分选后再培养获得的细胞的平均荧光强度和纯度明显优于管式分选后培养的细胞,若对细胞的平均荧光强度和纯度要求较高,推荐使用单细胞分选再培养.

### 参考文献:

- [ 1 ] 陈希,许瑞,蒋易楠,等.密度梯度离心法同时分离新生大鼠原代心肌细胞与成纤维细胞[J].生理学报,2015,67(4):423-430.[CHEN Xi, XU Rui, JIANG Yinan, et al. Simultaneous separation of primary cardiomyocytes and cardiac fibroblasts from neonatal rats with density gradient centrifugation[J]. Acta Physiologica Sinica, 2015, 67(4): 423-430.]
- [ 2 ] 唐苗苗,宾雅棣,赵蓝波,等.基于免疫磁珠法不同筛选方案对胎儿有核红细胞富集效果的比较[J].重庆医科大学学报,2023,48(2):155-161.[TANG Miaomiao, BIN Yadi, ZHAO Lanbo, et al. The comparison of enrichment effects of different screening schemes for fetal nucleated red blood cells from maternal blood by magnetic-activated cell sorting[J]. Journal of Chongqing Medical University, 2023, 48(2): 155-161.]
- [ 3 ] Gerashchenko B I. Choosing a cell sorting option to study the fate of bystander cells: FACS or MACS?[J]. Cytometry A, 2011, 79(3): 179-180.
- [ 4 ] 黄莹莹,尹盛夏,曹文强,等.高端流式分选与免疫磁珠法纯化 T 细胞的比较[J].国际医药卫生导报,2016,22(22):3377-3383.[HUANG Yingying, YIN Shengxia, CAO Wenqiang, et al. Fluorescence activated cell sorting versus magnetic activated cell sorting in purification of T lymphocytes[J]. International Medicine and Health Guidance News, 2016, 22(22): 3377-3383.]
- [ 5 ] 胡凡.流式细胞分选术在生物医学研究中的应用[J].药物与人,2014,27(11):53-54.[HU Fan. Application of cell sorting by flow cytometry in biological and medical research[J]. Medicine & People, 2014, 27(11): 53-54.]
- [ 6 ] 周羽,陈路.流式细胞分选仪(BD FACSAria III)分选中常见问题分析及处理[J].中国医疗器械信息,2022,28(5):36-38.[ZHOU Yu, CHEN Lu. Analysis and treatment of common problems in flow cytometry (BD FACSAria III) sorting[J]. China Medical Device Information, 2022, 28(5): 36-38.]
- [ 7 ] 刘锡娟,丁慧荣,张宏.FACSAria 流式细胞仪 96 孔微孔板单个细胞分选方法的优化和应用[J].生物学通报,2010,45(3):51-55.
- [ 8 ] 闵智慧,程韵枫.第三代流式细胞分选仪及 96 孔板分选单个细胞的方法及参数优化[J].中国临床医学,2016,23(6):846-850.[MIN Zhihui, CHENG Yunfeng. Method and parameter optimization of the third-generation flow cytometry sorter and 96-well plate in single cell sorting[J]. Chinese Journal of Clinical Medicine, 2016, 23(6): 846-850.]
- [ 9 ] 黄莹莹,邢月婷,孟晓瑜,等.离心参数对流式分选后样本的影响研究[J].中国细胞生物学学报,2021,43(10):2001-2008.[HUANG Yingying, XING Yueting, MENG Xiaoyu, et al. Study on the influence of centrifugal parameters on the samples sorted by flow cell sorting[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2021, 43(10): 2001-2008.]
- [ 10 ] 刘洋,王丽婷,刘芳,等.流式细胞分选优化经验浅谈[J].科学咨询(科技·管理),2018(1):55-56.
- [ 11 ] 郭陈智,史桂英.流式分选仪 FACSAria II 分选 GFP 阳性乳腺癌 MCF-7 细胞株的条件优化研究[J].上海交通大学学报(医学版),2013,33(1):127-130.[GUO Chenzhi, SHI Guiying. Study on favorable setup of flow cytometry sorter FACSAria II in sorting GFP positive population of breast cancer cell line MCF-7[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science), 2013, 33(1): 127-130.]
- [ 12 ] 黄莹莹,徐琴,姜宇.流式细胞分选仪高效分选条件的探索[J].国际医药卫生导报,2021,27(1):24-29.[HUANG Yingying, XU Qin, JIANG Yu. Conditions for high efficient sorting experiments by flow cytometry[J]. International Medicine and Health Guidance News, 2021, 27(1): 24-29.]
- [ 13 ] 符蓉,张小翠.HRP 与 TMB 显色用于流式细胞仪 MoFlo Astrios<sup>EQ</sup> 单细胞分选的方法探索[J].中国细胞生物学学报,2018,40(12):2059-2064.[FU Rong, ZHANG Xiaocui. An exploration of HRP and TMB colorimetric method of the flow cytometry MoFlo Astrios<sup>EQ</sup> on single-cell sorting[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2018, 40(12): 2059-2064.]