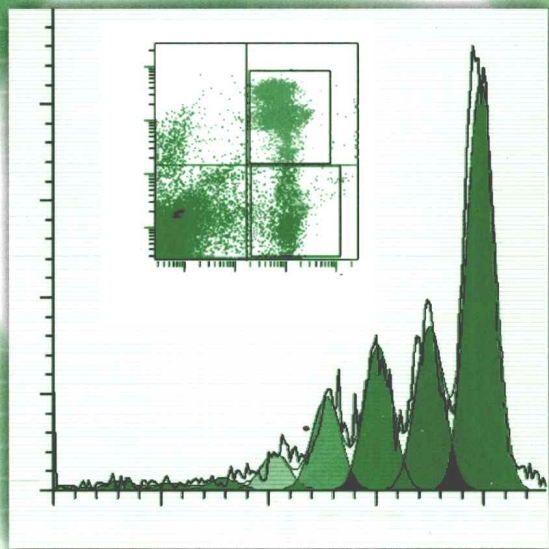


# 流式细胞术

基本原理  实用技术



梁智辉 朱慧芬 陈九武 编著

沈关心 吴雄文 主审

华中科技大学出版社



# 流式细胞术基本原理与实用技术

梁智辉 朱慧芬 陈九武 编著  
沈关心 吴雄文 主审

华中科技大学出版社  
中国·武汉

图书在版编目(CIP)数据

流式细胞术基本原理与实用技术/梁智辉 朱慧芬 陈九武 编著. —武汉:华中科技大学出版社,2008年6月

ISBN 978-7-5609-4637-5

I. 流… II. ①梁… ②朱… ③陈… III. 细胞-生物样品分析-定量分析  
IV. Q2-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 086532 号

流式细胞术基本原理与实用技术

梁智辉 朱慧芬 陈九武 编著

责任编辑:胡章成

封面设计:范翠璇

责任校对:李 琴

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)87557437

录 排:武汉佳年华科技有限公司

印 刷:湖北新华印务有限公司

开本:787 mm×1092 mm 1/16

印张:10.5

字数:243 000

版次:2008年6月第1版

印次:2008年6月第1次印刷

定价:60.00元

ISBN 978-7-5609-4637-5/Q·31

(本书若有印装质量问题,请向出版社发行部调换)

# 序

近年来,流式细胞术(flow cytometry, FCM)日益广泛地被应用于基础医学和临床医学,尤其是细胞生物学、细胞遗传学、生物化学、免疫学、肿瘤学、血液学等领域。流式细胞术是集物理电子技术、激光技术、计算机技术为一体的现代实验技术,作为生物学、医学专业人员,实际应用中并没必要了解其深奥的理论和细节,关键是掌握相关的基本原理与实验操作,并将该技术应用于科研和临床实践。

基于此,编者从科研和临床专业人员的实际需要出发,在总结多年的研究、教学工作与实际操作经验的基础上,编撰了《流式细胞术基本原理与实用技术》一书。本书具有以下几方面的特点。

(1) 深入浅出:全书文字浅显易懂、图文并茂,简明扼要地介绍流式细胞术的基本原理。

(2) 内容详实:全书按照细胞生物学、免疫学、肿瘤学、血液学、细胞遗传学、生物化学等学科的应用领域进行归类,全面而详尽地介绍流式细胞术的应用范围,涉及细胞表面分子、细胞内或细胞核内抗原、细胞凋亡、DNA含量与细胞周期、细胞增殖、细胞毒作用、可溶性蛋白质分子、报告基因等的检测和分析,并介绍了流式细胞术的其他用途。

(3) 注重实际:全书在兼顾流式细胞术最新进展的同时,重点介绍经典和常用的实验技术,包括详尽的操作步骤,并借助图释介绍资料数据的分析。

(4) 经验之谈:本书编者均经历了研究生阶段的严格科研训练,有较扎实的免疫学、分子生物学和细胞生物学的理论基础,并多年从事流式细胞术相关的实验研究。在此基础上,他们结合自身丰富的实践经验和体会,针对性地介绍与流式细胞术应用相关的内容,既为抛砖引玉,也期望与同行们交流经验。

本人相信,该书作为流式细胞术的入门读物和实验指南,是一本有价值的工具书,并将受到广大读者的欢迎。



于华中科技大学同济医学院

2008年5月21日

# 前 言

流式细胞仪是集现代物理电子技术、激光技术、计算机技术于一体的先进科学技术设备,是生命科学研究领域中先进的仪器之一。概括来说,流式细胞术就是利用流式细胞仪对处在快速直线流动状态中的单列细胞或生物颗粒进行逐个、多参数、快速的定性、定量分析或分选的技术,具有检测速度快、测量指标多、采集数据量大、分析全面、方法灵活等特点。流式细胞术已被众多的研究人员作为优先选择的研究技术。目前,流式细胞仪已广泛应用于免疫学、细胞生物学、遗传学、生物化学、肿瘤学、血液学等基础科学研究和临床医学领域。

然而,在我们实际检测过程中,经常有人问“老师,我什么都不懂,如何看流式分析结果图啊”、“荧光染料如何搭配”、“实验方法应该如何选择”等等问题。

另外,随着流式细胞术应用范围不断扩大及其临床试剂的大力开发,创建三甲医院和公共卫生防御部门的需要,流式细胞仪已成为这些部门基础建设的设备之一。近几年来,常有相关部门的流式细胞术检测人员来我处进行培训。

为了有助于研究工作者更多地了解流式细胞术的基本原理和相关实验技术,更好地选择实验方法和开展实验,以及更合理地分析实验结果,几年前,我们就萌生了编写《流式细胞术基本原理与实用技术》一书的想法。幸蒙华中科技大学出版社大力支持,本书方能出版。

面对日新月异的流式细胞术的新技术、新方法,本书定位于实用技术参考书,立足于“四要”编写原则,即技术方法要经典实用,实验原理要清晰,分析结果要能看懂,按步骤要能操作。在编写过程中力求总结编者多年的研究工作与实际操作经验,介绍编者十分熟悉或亲自操作的内容,强调内容的实用性和可行性,关注流式细胞术在当前各领域的新技术和新发展的同时,特别突出介绍常用和经典的实验技术,力求使实验原理简明扼要,操作步骤详尽可行,资料数据分析图释简洁清晰,并将编者自己的相关经验与操作、分析结果细节加以介绍和提出,供大家参考使用。

虽然编著者具有多年从事免疫学和流式细胞术检测与分析实验教学与研究的经验,但由于编者学识水平有限,书中难免有不少缺点和错误,敬请读者和同行们提出宝贵意见,以便以后进一步修订。

衷心感谢龚非力教授在百忙之中为本书作序!衷心感谢沈关心教授、吴雄文教授为本书精心策划、审校!衷心感谢华中科技大学同济医学院免疫学系领导、老师与同学们的大力支持!衷心感谢游东生先生的大力支持与帮助!衷心感谢我们的家人对我们的大力支持!

最后,衷心感谢本书的读者!希望能给您带来方便与乐趣。

梁智辉 朱慧芬

2008年2月于同济医学院

# 目 录

<b>第 1 章 流式细胞仪基本结构与原理</b> .....	(1)
1.1 流式细胞仪基本结构与功能 .....	(1)
1.1.1 流式细胞仪基本结构 .....	(1)
1.1.2 流式细胞仪的基本功能与应用 .....	(4)
1.2 流式细胞术的重要术语 .....	(4)
1.2.1 前向散射与侧向散射 .....	(4)
1.2.2 Coulter 效应与电子体积 .....	(6)
1.2.3 荧光信号及其面积与宽度 .....	(6)
1.2.4 光谱重叠与荧光补偿 .....	(7)
1.2.5 细胞基础荧光域值与阴性对照置信区间 .....	(9)
1.3 流式细胞术基本原理 .....	(11)
1.3.1 流式细胞术分析的基本原理 .....	(11)
1.3.2 流式细胞术分选的基本原理 .....	(13)
1.3.3 流式细胞仪荧光补偿设置 .....	(14)
1.4 流式细胞术的样本设置 .....	(15)
1.4.1 常用对照 .....	(15)
1.4.2 一套完整的流式细胞术检测样本设置 .....	(16)
1.5 流式细胞术的数据分析 .....	(16)
1.5.1 数据显示与分析 .....	(17)
1.5.2 设门 .....	(20)
1.5.3 数据分析中几种常见图形及分析原则 .....	(23)
<b>第 2 章 抗原抗体反应基本特点与流式抗体及荧光染料的选择</b> .....	(27)
2.1 抗原抗体反应基本特点 .....	(27)
2.1.1 抗原抗体结合具有特异性 .....	(27)
2.1.2 抗原与抗体的结合是可逆的化学反应 .....	(27)
2.2 抗原抗体反应影响因素 .....	(27)
2.2.1 电解质 .....	(27)
2.2.2 反应温度与时间 .....	(27)
2.2.3 pH 值 .....	(28)
2.3 流式抗体的选择 .....	(28)
2.3.1 尽量使用直标抗体 .....	(28)
2.3.2 注意流式抗体的应用级别 .....	(28)
2.3.3 抗体滴度或标记量的选择 .....	(28)
2.3.4 根据流式细胞仪的类型及荧光素的荧光光谱选择荧光抗体 .....	(28)
2.3.5 根据检测物(抗原)表达量选择荧光染料 .....	(29)
2.4 荧光染料特性及其应用 .....	(30)
2.4.1 抗体标记荧光染料特性及其应用 .....	(30)

2.4.2	核酸荧光染料特性及其应用	(30)
2.4.3	细胞膜及其他荧光探针特性及其应用	(33)
<b>第3章</b>	<b>细胞表面分子的检测与分析</b>	<b>(36)</b>
3.1	流式细胞术在细胞表面分子的检测与分析中的应用	(36)
3.1.1	免疫细胞及其亚群的检测与功能分析	(36)
3.1.2	血液系统细胞表面标志的研究	(36)
3.1.3	细胞群体及细胞表面标志变化的监测	(36)
3.1.4	细胞表面标志构成性质的分析	(36)
3.2	标本制备	(36)
3.2.1	血液或骨髓标本的制备	(36)
3.2.2	体液、灌洗液或悬浮培养细胞的制备	(36)
3.2.3	贴壁细胞的制备	(37)
3.2.4	组织标本的制备	(37)
3.3	细胞表面分子免疫标记方法	(37)
3.3.1	直接免疫荧光法	(37)
3.3.2	间接免疫荧光法	(38)
3.3.3	全血直接标记法	(39)
3.3.4	直接与间接免疫荧光混合染色法	(40)
3.4	常用的免疫细胞表面标志的检测与分析	(40)
3.4.1	T淋巴细胞及其亚类检测	(41)
3.4.2	B淋巴细胞及其亚类检测	(47)
3.4.3	NK细胞与NKT细胞检测	(47)
<b>第4章</b>	<b>细胞内或细胞核内抗原检测与分析</b>	<b>(49)</b>
4.1	流式细胞术分析细胞内或细胞核内抗原基本步骤	(49)
4.1.1	细胞固定剂和穿膜剂的选择	(49)
4.1.2	最佳抗体浓度的选择	(51)
4.1.3	细胞膜内外FcR的封闭	(51)
4.2	胞内抗原的检测与分析——胞内细胞因子的检测与分析	(51)
4.3	核内抗原的检测与分析——调节性T细胞(Treg, CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> ) 的检测与分析	(56)
<b>第5章</b>	<b>细胞凋亡的检测与分析</b>	<b>(60)</b>
5.1	样品来源与收集	(60)
5.2	PI单染法——亚“G <sub>1</sub> ”峰检测法	(61)
5.3	Annexin-V-PI复染法	(63)
5.4	末端转移酶标记技术(TUNEL)	(65)
5.5	细胞周期特异性细胞凋亡的检测(PI-Annexin-V, PA法)	(66)
<b>第6章</b>	<b>DNA含量检测与细胞周期的分析</b>	<b>(69)</b>
6.1	常用DNA和RNA染料	(70)
6.2	DNA倍体分析在肿瘤诊断和治疗中的意义	(72)

6.2.1 DNA 倍体分析的判定标准	(72)
6.2.2 DNA 倍体分析在肿瘤诊断和治疗中的意义	(73)
6.3 细胞 DNA 检测的内参考标准	(74)
6.3.1 鸡红细胞	(74)
6.3.2 人淋巴细胞	(74)
6.3.3 鳖红细胞	(75)
6.4 DNA 样品的制备和检测	(75)
6.4.1 DNA 样品的制备和检测的影响因素与注意事项	(75)
6.4.2 培养细胞或悬浮样品的 DNA 含量检测	(76)
6.4.3 新鲜组织细胞核的 DNA 含量检测	(77)
6.4.4 石蜡包埋组织块切片的 DNA 含量检测	(78)
6.4.5 FCM 在肿瘤脱落细胞学检查的应用	(78)
6.5 数据采集后的软件分析	(79)
6.5.1 运用 ModFit LT 进行自动分析	(80)
6.5.2 运用 ModFit LT 进行手动分析	(80)
6.5.3 运用 ModFit 进行同步化分析	(81)
6.5.4 运用 ModFit LT 进行增殖分析	(82)
6.6 药物对细胞周期的影响	(82)
6.7 流式细胞核型分析	(83)
6.8 FCM-DNA 检测的质量控制	(85)
6.8.1 标本采集和固定方法的质控	(85)
6.8.2 单细胞悬液制备的质控制备	(85)
6.8.3 石蜡包埋组织单细胞悬液制备的质控	(85)
6.8.4 脱落细胞样品的采集	(86)
6.8.5 细胞悬液荧光染色的质控	(86)
6.8.6 流式细胞仪器操作技术质控	(86)
6.8.7 流式细胞分析资料处理的质控	(86)
6.8.8 定量荧光细胞染色技术的评价标准	(86)
<b>第 7 章 细胞增殖的检测与分析</b>	<b>(87)</b>
7.1 以检测细胞增殖抗原标志物为基础的分析法	(87)
7.1.1 BrdU/DNA 双参数法	(87)
7.1.2 Ki-67 检测与分析	(88)
7.1.3 PCNA/DNA 双参数法	(89)
7.1.4 Cyclins/DNA 双参数法	(90)
7.2 以检测细胞分裂情况为基础的分析法	(92)
7.2.1 检测细胞增殖的常用荧光染料及其分析原理	(92)
7.2.2 以检测细胞分裂情况为基础的分析法的应用	(93)
<b>第 8 章 细胞毒的检测与分析</b>	<b>(98)</b>
8.1 体外细胞毒检测方法	(98)
8.1.1 CFSE/PI 或 PKH-67/PI 检测法	(98)



8.1.2	GFP/PI 检测法——以 NK 杀伤活性为例	(100)
8.2	体内 CTL 细胞毒检测方法——CFSE 标记法	(101)
<b>第 9 章</b>	<b>可溶性蛋白质分子的检测与分析</b>	(103)
9.1	可溶性蛋白质分子的定性、定量检测与分析	(103)
9.2	可溶性蛋白质分子的定量检测与分析——液相芯片技术(LabMAP™ 和 CBA 技术)	(104)
9.2.1	液相芯片技术的基本原理	(104)
9.2.2	液相芯片的技术优势	(104)
9.2.3	液相芯片的主要实验步骤	(105)
9.2.4	LabMAP™ 技术	(105)
9.2.5	BD 微球阵列分析技术(CBA 技术)	(105)
<b>第 10 章</b>	<b>报告基因的检测和分析</b>	(109)
10.1	报告基因 GFP 及其突变体	(109)
10.2	报告基因 GFP 及其突变体在生物学中的应用	(110)
10.2.1	筛选新的药物	(110)
10.2.2	发育分子机理研究	(110)
10.2.3	细胞筛选或分选标记物	(110)
10.2.4	基因产物功能及基因定位研究	(110)
10.2.5	细胞功能活动的动态观察	(110)
10.2.6	细胞、分子之间的相互作用研究	(110)
10.2.7	体内示踪与应用	(110)
10.2.8	在 RNA 干扰与核酶体研究中的应用	(110)
10.2.9	免疫反应示踪标志物	(111)
10.2.10	在细胞凋亡相关基因研究中的应用	(111)
10.3	报告基因(GFP)的检测与分析	(111)
10.3.1	报告基因转染效率和(或)GFP 融合蛋白表达的检测与分析	(111)
10.3.2	GFP 融合基因的细胞周期检测与分析——GFP/PI 双标记法	(111)
10.3.3	在细胞凋亡相关基因研究中的应用——GFP/Annexin-V/PI 三色标记法	(112)
<b>第 11 章</b>	<b>其他流式细胞术应用技术</b>	(115)
11.1	胞内活性氧水平的检测与分析	(115)
11.1.1	DCFH-DA 单染色法	(115)
11.1.2	DCFH/PI 染色法	(117)
11.1.3	双氢罗丹明(Rhodamine)123 染色法	(117)
11.2	细胞膜电位的检测与分析	(119)
11.2.1	检测细胞膜电位的染料及其检测原理	(119)
11.2.2	Cyanine(花青苷)染色法	(120)
11.2.3	罗丹明 123 染色法	(120)
11.2.4	JC-1 染色法	(120)
11.3	细胞内钙离子浓度的检测与分析	(122)
11.3.1	检测细胞内钙离子浓度的荧光探针与检测原理	(122)

11.3.2	细胞内钙离子浓度的检测与分析——Fluo-3/AM 染色法	(124)
11.4	荧光共振能量转移技术及应用	(125)
11.5	干细胞(SP)的检测——Hoechst33342 法	(128)
<b>第 12 章</b>	<b>流式细胞仪的发展和商品化仪器</b>	<b>(130)</b>
12.1	流式细胞仪的发展历史和趋势	(130)
12.1.1	专业化的流式细胞仪纷纷面世	(131)
12.1.2	仪器全面自动化	(132)
12.1.3	多色多参数分析迅速发展	(132)
12.2	流式细胞仪商品仪器概述	(133)
12.2.1	激发光源及其荧光染料	(133)
12.2.2	液流系统	(137)
12.2.3	信号检测和光电转换	(138)
12.2.4	分选系统	(140)
12.2.5	数据处理与分析	(141)
12.2.6	流式微球芯片	(142)
12.2.7	图像流式细胞仪	(143)
12.3	流式细胞仪的主要技术指标	(144)
12.3.1	荧光分辨率	(144)
12.3.2	荧光灵敏度	(144)
12.3.3	前向角散射光灵敏度	(145)
12.3.4	前向角散射光分辨率	(145)
12.3.5	分析速度	(145)
12.3.6	分选指标	(145)
<b>附录 1</b>	<b>常见流式细胞术及荧光显微镜荧光染料激发波长与 发射波长快查表</b>	<b>(146)</b>
<b>附录 2</b>		<b>(149)</b>
2.1	常用溶液的配制	(149)
2.2	Hanks 液的配制	(149)
2.3	磷酸盐缓冲液(PB)的配制	(150)
<b>参考文献</b>		<b>(153)</b>

# 第 1 章 流式细胞仪基本结构与原理

## 1.1 流式细胞仪基本结构与功能

### 1.1.1 流式细胞仪基本结构

流式细胞仪(flow cytometer, FCM)是集现代物理电子技术、激光技术、计算机技术于一体的先进科学技术设备,是生命科学研究领域中先进的仪器之一。概括来说,流式细胞术就是利用流式细胞仪对处于快速直线流动状态中的单列细胞或生物颗粒进行逐个、多参数、快速的定性、定量分析或分选的技术。它具有如下几个特点:① 实现对单列细胞或生物颗粒进行逐个检测。只要标本是单个细胞或生物颗粒,即可用于分析,如血液、骨髓、体液中的细胞、培养细胞等,实体组织经处理后制成的单细胞悬液也能分析。② 实现高通量检测。只要标本中的细胞或生物颗粒数量足够,短时间内可分析大量细胞或生物颗粒。流式细胞仪可以每秒钟数十、数百、数千个细胞的速率进行检测,被检测的细胞总数可达数千、数万乃至数百万个。③ 多参数、多色荧光分析对细胞特性的识别、计数更为准确。用不同荧光素标记的单克隆抗体进行多色荧光染色,可同时分析单个细胞或生物颗粒的多种特征,使细胞特性的识别、计数更为准确。④ 定性或定量分析细胞。通过荧光染色对单个细胞或生物颗粒的某些成分,如 DNA 含量、抗原或受体表达量、 $\text{Ca}^{2+}$  浓度、酶活性、细胞的功能等均可进行单细胞水平的定性与定量分析。⑤ 分选特定性状或功能的细胞。有些流式细胞仪还具有细胞分选功能,可将具有特定性状或功能的细胞从混合细胞群中分离出来。总之,它具有检测速度快、测量指标多、采集数据量大、分析全面、分选纯度高、方法灵活等特点。

流式细胞仪的基本结构包括四大模块:流动室与液流系统、光源与光学系统、信号收集与信号转换系统、计算机与分析系统。具有分选功能的流式细胞仪还包括分选系统。

#### 1.1.1.1 流动室与液流系统

由于流式细胞仪的激发光路是固定的,一般与细胞悬液的轴心正交,这就要求细胞必须在流经激光聚焦区时不能偏离其轴心,且不能聚集成团,阻塞管路,否则光束无法准确照射细胞中心,造成信号不稳定,影响测量结果的精密度。流式细胞仪液流系统成功地解决了上述问题。根据层流原理,利用专门设计的流动室(flow cell),使样本流与鞘液流形成同轴流动状态。由于样本喷嘴处于流动室中央,这就使得样本流在鞘液流包裹下恒定处于同轴流动的中心位置,其精度可稳定在几微米之内。流动室还根据 Bernoulli 定律,利用大小两个不同截面,使鞘液从截面积较大部分流经截面积较小的样本流部分,使液流聚焦在入口处,形成检测点。液流系统的核心是流动室,由样品管、鞘液管和喷嘴等组成,常用石英玻璃等透明、稳定的材料制作,设计和制作均很精细。样品管储放样品,单个细胞悬液在液流压力作用下从样品管射出;鞘液由鞘液管从四周流向喷嘴,包围在样品外周后从喷嘴射出。为了保证液流是稳液,一般限制液流速度  $v < 10 \text{ m/s}$ (图 1-1、图 1-2)。

#### 1.1.1.2 光源与光学系统

流式细胞仪的检测是基于对光信号的检测来实现的,包括对散射光和荧光的检测,因此光源与光学系统是流式细胞仪中最为重要的一个系统。它由激发光源、一系列光通过和光反射的镜片组成(图 1-3)。

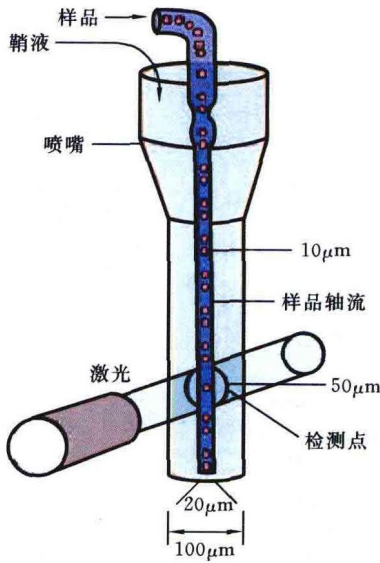


图 1-1 流动室液流原理与检测点

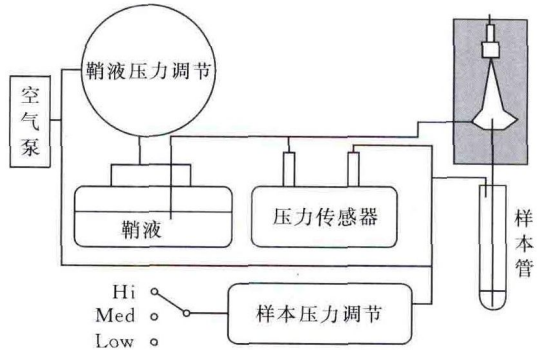


图 1-2 流动室与液流系统驱动结构示意图

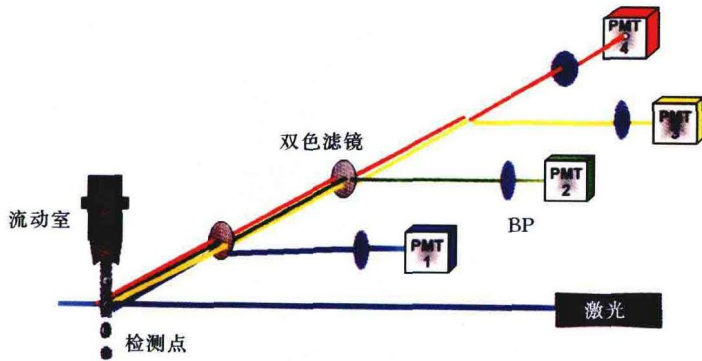


图 1-3 光源与光学系统

(1) 激发光源。目前流式细胞仪所用的激发光源包括弧光灯和激光器。弧光灯多为高压汞灯，激光器按产生激光的物质的种类可分为固体激光器、气体激光器、液体激光器和半导体激光器。各种激发光源应该说各有优缺点，没有哪种激发光源可以适于所有的场合，生产厂家在选择何种光源作为激发光的时候主要考虑：分析或分选目的、激发波长的需要、仪器设计等。作为流式细胞仪的激发光源，有两个特性是比较重要的：① 单色性和单向性。单色性是指一种激光往往为某一波长的光；单向性是指激光的方向性相当好，几乎没有侧散射并且能进行远距离传播。激光作为流式细胞仪的激发光源，具有良好的单向性和单色性。当然，任何光源其发射波长都不仅仅是一个波长，都需要通过各种配套的光学组件来获得单色光。例如，氩离子激光器其实提供了 488 nm 和 514 nm 两条谱线，后者在应用时通过滤光片滤除；汞弧光灯可以筛选出很多波长的光，通过各种配套的光学组件，也可以取得不亚于单波长激光的单色性。② 衰减。任何光源在使用时都会有功率衰减，因此都有寿命要求，对于气体激光器，汞弧光灯可以保用 5000 h，半导体激光器可以保用 8000 h。现有的流式细胞仪的激发光大概为两种波长，第一激光为 488 nm，第二激光为 633 nm。有些流式细胞仪还有第三、第四激光，分别为 407 nm、355 nm。

(2) 光学系统。流式细胞仪的光学系统是由若干组透镜、滤光片和分光镜等光学元件组成,它们分别将不同波长的光信号送入到不同的探测器。其主要光学元件是滤光片(filter),它主要分为四类:长通滤光片(long-pass filter, LP)、短通滤光片(short-pass filter, SL)、带通滤光片(band-pass filter, BP)和二分镜。

长通滤光片:使特定波长以上的光通过,特定波长以下的光不能通过,如 LP500 滤光片,允许 500 nm 以上的光通过,而 500 nm 以下的光则吸收或返回。

短通滤光片:与长通滤光片正好相反,使特定波长以下的光通过,特定波长以上的光则吸收或返回。

带通滤光片:可允许相当窄范围内的波长通过。滤片一般有两个值,一个为允许通过波长的中心值,另一个为允许通过波长的范围。例如,BP500/25 表示允许通过的波长范围为 475~525 nm,其中心值为 500 nm(图 1-4)。



图 1-4 各种透镜示意图

二分镜:二分镜分短通二分镜和长通二分镜。长通二分镜(dichromatic LP,DLP)只允许某一特定波长以上的光通过,此波长以下的光则呈 90°反射;短通二分镜(dichromatic SP,DSP)只允许某一特定波长以下的光通过,此波长以上的光呈 90°反射(图 1-5)。

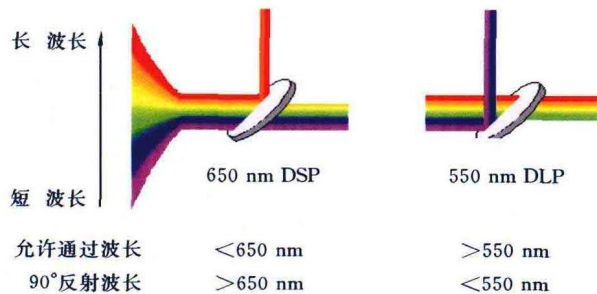


图 1-5 二分镜示意图

### 1.1.1.3 信号收集与光电转换系统

流式细胞仪的信号收集与光电转换系统主要由光电转换器件、放大器和信号处理电路组成。

(1) 光电转换器件。光电转换器件的主要功能是将光信号转换成电流信号。在流式细胞仪中,光电二极管和光电倍增管(PMT)执行此功能。PMT 的转换效率要远远大于光电二极管。对于光电二极管来说,如果有 10 个人射光子,产生的电子数量不会超过 10 个电子,但一个光子到达 PMT 的光阴极时,可产生数十万个电子。当然,如果前置放大电路有足够的增益和低噪音的话,光电二极管所产生的信号更准确。

当携带荧光素的细胞与激光正交时,受激发发出荧光,经过滤光片分离不同波长的光信号分别到达不同的 PMT 或光电二极管,将光信号转换成电信号,然后输入到放大器放大,供信号处理系统处理。放大器分两类:线性放大和对数放大。检测细胞 DNA 含量、

RNA 含量、总蛋白质含量等时,一般选用线性放大测量;而在检测细胞膜表面抗原等时,细胞膜表面抗原的分布有时相差几十倍,甚至几万倍,如用线性放大器,无法在一张图上清晰地将细胞阳性群、阴性群同时显示出来,通常需使用对数放大器。如果原来输出是 1,当输入增大到原来的 10 倍时,输出为 2;当输入增大到原来的 100 倍时,输出为 3 等。

信号处理系统的主要功能是将电信号转变成脉冲信号、数字信号最终传送给计算机系统进行处理。它主要由前置放大电路、脉冲峰值检测器和模/数转换电路组成。理论上,模/数转换芯片的位数和速度决定了数字信号的精度,模/数转换芯片的位数和速度越高,仪器精度就越高,但同时要考虑噪声信号的水平。

(2) 计算机与分析系统。流式细胞仪的计算机系统用于控制整个仪器的运行、数据采集和数据分析。各公司所产的流式细胞仪都有自己特有的分析系统,如 BD 公司的 Cellquest、FACSDiva 分析系统和 Beckman Coulter 公司的 EXP、CXP 分析系统。

### 1.1.2 流式细胞仪的基本功能与应用

流式细胞仪是检测细胞各种成分的重要细胞生物学工具,其基本功能是对各种粒子或细胞进行分析与分选。

#### 1.1.2.1 定性或定量分析功能

流式细胞术不但可以定性、定量分析细胞膜、细胞质和细胞核中的各种细胞成分,而且可以研究细胞的各种功能状态(如细胞增殖、细胞凋亡、细胞分化、酶活性、细胞膜通透性、氧化还原状态、吞噬性等)。目前通过液相芯片技术还可以定量检测血清中的各种可溶性生物分子成分。

细胞膜:脂质双层分子结构中具有多种蛋白质分子——细胞表面抗原,表面糖类,表面受体,膜电位,膜结合钙离子,细胞表面电荷等,这对确定细胞的性质及其功能是十分重要的。

细胞质:各种细胞成分,包括蛋白质、RNA、各种细胞器中的特殊成分、各种抗原、基因编码蛋白、细胞因子、细胞质内钙离子、pH 值、各种基因表达蛋白、抗原蛋白等。

细胞核:DNA、RNA、蛋白质等。

可溶性成分分析:通过液相芯片技术可以定量检测血清中的各种可溶性生物分子成分。

#### 1.1.2.2 分选功能

借助流式细胞仪的分选系统,可将具有特定性状或功能的细胞从混合细胞群中分离出来,再进行分析或培养。它具有以下优点:① 分选纯度高(可达 99%);② 分选回收率高(可达 90%);③ 可分选活细胞,并可进行单细胞克隆。

## 1.2 流式细胞术的重要术语

### 1.2.1 前向散射与侧向散射

在流式细胞术中,由于细胞在未受到任何破坏的情况下对光散射是其固有属性,所以可利用细胞对光的散射信号的不同反应对细胞进行分析与分选。

细胞在鞘液流中通过激光照射-测量区,细胞向空间呈 360°立体角方向散射光线,散射信号与细胞大小、形状、质膜以及细胞内颗粒结构的折射率有关。在流式细胞术中常被利用的有前向散射(forward scatter, FSC)与侧向散射(side scatter, SSC)。

前向散射也称小角散射,该值的大小与细胞的直径成近似直线关系,也就是说,对于



不同细胞,细胞越大,其 FSC 越大;反之则越小。侧向散射又称  $90^\circ$  散射,它对细胞膜、胞质和核膜的折射更为敏感,其散射强度几乎与细胞内颗粒结构的质量成近似直线关系,也就是说,细胞内颗粒结构越复杂,质量越大,其 SSC 越大;反之则越小。散射光检测原理如图 1-6(a)、图 1-6(b)、图 1-7、图 1-8 所示。

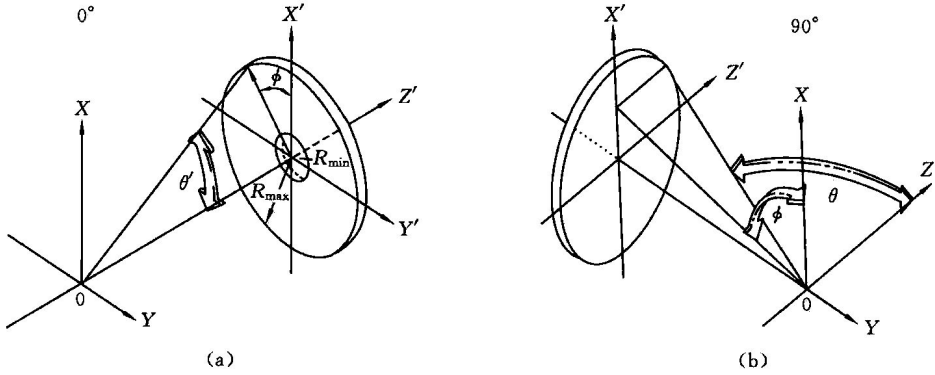


图 1-6

(a) 前向散射原理; (b) 侧向散射原理

图注: X 轴是液流方向, Z 轴表明入射的激光束方向,入射光与液柱在 0 点相交,0 点是测量区。图 1-6(a):在与 XY 面平行的  $X'Y'$  面上放一个半径为  $R_{max}$  的透镜,透镜中心半径为  $R_{min}$  的圆是不透光的,则只有立体角  $\theta$  范围内的散射光减去落到  $R_{min}$  圆面积上的散射光才被透镜收集与检测。 $R_{min}$  圆是为防止入射光直接进入,掩盖其散射光。在实际仪器中,  $R_{min}$  圆所占立体角大约为  $2^\circ$  左右。图 1-6(b):会聚透镜放在与 XZ 面平行的  $X'Y'$  平面内,因而收集到的是细胞通过测量区的侧向散射光。

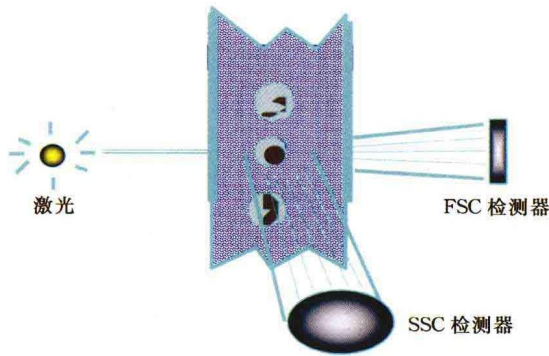


图 1-7 FSC 与 SSC 检测器

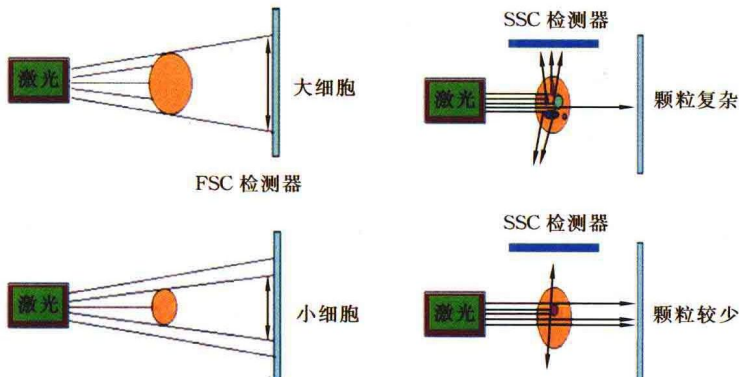


图 1-8 光散射信号 FFS,SSC 与细胞大小、胞内颗粒结构的关系

### 1.2.2 Coulter 效应与电子体积

Coulter 效应原理：微小粒子(包括细胞)并不导电，但通过充满电解液的特殊小孔时可产生电阻变化，细胞的体积越大，电阻的改变就越大。利用这种原理将电阻变化记录为电位变化，应用于微小粒子的体积测量和计数上。采用这种方法计算该颗粒的体积就是电子体积。目前，库尔特-贝克曼公司开发了应用电子体积与侧向散射组合代替 FSC 与 SSC 组合来对样品进行分群的新技术，如图 1-9(a)、图 1-9(b)、图 1-9(c)所示。

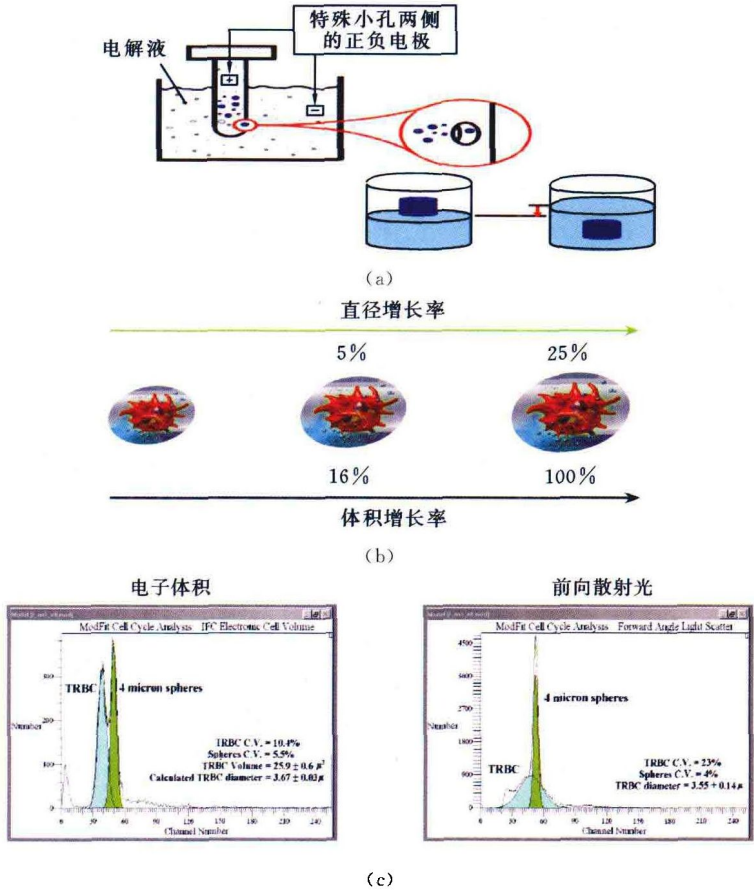


图 1-9

(a) Coulter 效应原理图； (b) 电子体积变化与细胞直径变化的关系；  
(c) 利用电子体积与前向散射光分析的结果

### 1.2.3 荧光信号及其面积与宽度

光线是一种由光子组成的能量形式，光线的颜色(波长)与光线的 photons 能量高低相关。光线的能量随着波长的递增而减弱，波长越短，能量越高；波长越长，能量越低。蓝光的波长为 400~500 nm，而红光的波长为 600~650 nm，其他可见光(绿、黄和橙)的光谱落在两者之间。原子由原子核(质子和中子)和沿核周轨道运动的外层电子组成，一个电子可以在任何的轨迹上运动，这取决于这个电子所携带的能量。在基础态电子轨道上运动的电子吸收能量(可以是光子携带的能量)而后转移到外层激发态电子轨道上运动，而在激发态电子轨道上运动的电子返回基础态轨道时，释放能量并散射出荧光，这就是荧光产生的机制。一种物质的吸收光谱(absorption spectra)取决于这种物质的原子中的基础态轨



道电子跃迁到激发态轨道所需要的能量,而荧光的发射光谱(emission spectra)则取决于电子由激发态轨道返回到基础态轨道所释放的能量。由于电子从激发态轨道返回到基础态轨道时,部分能量以热能的形式释放,这就是一种荧光物质的吸收光波长总比所散射的荧光波长小的原因。

经染色后的细胞通过激光照射-测量区,在激光照射下,荧光染料吸收能量发生能量跃迁,在短暂的延迟后回到基态并发出荧光,产生的荧光信号被特定波长的双色性反射镜和带通滤光片组成的一组光学元件传递到信号收集器中(光电倍增管,PMT)收集,形成信号脉冲。每一个信号脉冲都有其高度、面积与宽度(图 1-10(a))。每种颜色的荧光占用一个特定波长的检测器,每种颜色的检测器称为一个荧光通道(fluorescence channel)(图 1-10(b))。

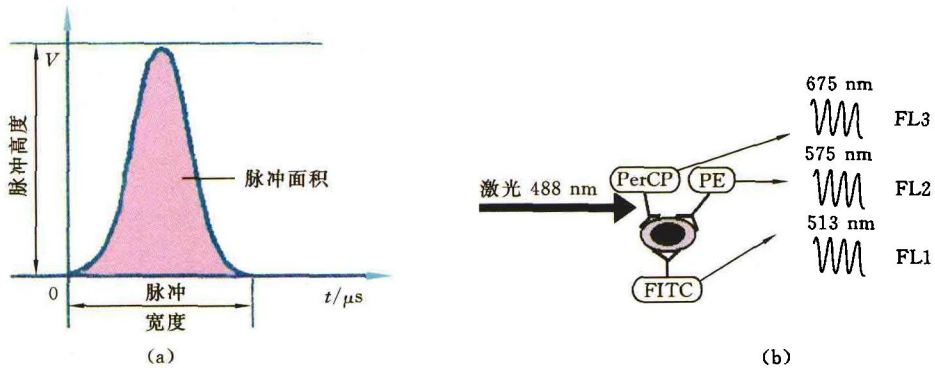


图 1-10

(a) 荧光信号脉冲的面积、高度与宽度; (b) 荧光信号与荧光通道

荧光信号脉冲高度表示荧光信号的强度,表示为  $FL_n\text{-Height}$ ,  $n$  为仪器的荧光信号收集器序数,如第 1 色荧光脉冲高度表示为  $FL1\text{-Height}$ 。

荧光信号脉冲面积是采用积分计算的荧光通量。一般对 DNA 倍体分析时采用面积与宽度,如第 2 色荧光信号脉冲面积( $FL2\text{-A}$ )、宽度( $FL2\text{-W}$ ),其他分析则一般采用脉冲高度。这是因为荧光脉冲面积比荧光脉冲高度更能准确地反映 DNA 含量。形态差异较大而 DNA 含量相同的细胞,其被检测的荧光脉冲高度( $FL2\text{-Height}$ )是不等的,而荧光脉冲面积( $FL2\text{-A}$ )则相等。

荧光信号脉冲宽度( $FL2\text{-W}$ )反映荧光的分布,常用来区分双连体细胞。由于 DNA 组织样本中的细胞容易聚集、粘连,当两个  $G_1$  期细胞粘连在一起时,其测量到的  $FL2\text{-A}$  与一个细胞的  $G_2/M$  期是相等的,导致测量数据中  $G_2$  期细胞比例会增加,影响测量数据的准确性。但连体细胞的  $FL2\text{-W}$  则要大些(图 1-11),用流式细胞术分析 DNA 倍体时,通常应选  $FL2\text{-W}$  将连体细胞区分开来(图 1-12)。

#### 1.2.4 光谱重叠与荧光补偿

流式细胞仪是通过内置的激光器发射激光激发荧光染料,通过荧光将 488 nm 或其他波长的光转变为另一波长的光,并通过光电倍增管或光电二极管将光信号转变为电信号或数字信号,并由计算机统计处理为可读数据。

用激光束激发两种或两种以上荧光物质而发出不同波长的荧光,从理论上讲,可以选择光学组件将它们分开,仅使一种荧光被一种荧光探测器收集处理,而检测不到另外一种荧光。实际上由于荧光素的激发或发射波长是正态或偏态曲线,即有很宽的范围,荧光素之间的波谱常有重叠现象,如图 1-13 所示,为 FITC、PE 的发射波长,可以看到两者的发