



药
学
实
验
室
技
术
系
列

PHARMACY LAB TECHNIQUE SERIES

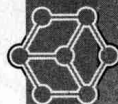
流式细胞术

• 贾永蕊 编

FLOW CYTOMETRY



化学工业出版社
生物·医药出版分社



药
学
实
验
室
技
术
系
列

PHARMACY LAB TECHNIQUE SERIES

流式细胞术

● 贾永蕊 编

FLOW CYTOMETRY



化学工业出版社
生物·医药出版分社
· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

流式细胞术/贾永蕊编. —北京: 化学工业出版社,
2009.1

(药学实验室技术系列)

ISBN 978-7-122-03825-8

I. 流… II. 贾… 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 153893 号

责任编辑: 杨燕玲 韩文阳

装帧设计: 韩 飞

责任校对: 陶燕华

出版发行: 化学工业出版社 生物·医药出版分社

(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 装: 北京云浩印刷有限责任公司

720mm×1000mm 1/16 印张 12 字数 158 千字 2009 年 3 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 29.00 元

版权所有 违者必究

《药学实验室技术系列》 编委会名单

主	任	刘振明				
委	员	王文浩	刘振明	陆峰	赵阳	
		刘丹	马宇衡	乔梁	刘森	
		贾永蕊	王冬梅			

目 录

基础篇	1
第 1 章 流式细胞术及其原理	3
1.1 流式细胞术	3
1.2 流式细胞仪的基本结构	4
1.2.1 液流系统	5
1.2.2 光学系统	7
1.2.3 电子系统	10
1.2.4 分选系统	28
1.3 流式细胞仪的主要技术指标	29
1.3.1 荧光分辨率	29
1.3.2 荧光灵敏度	29
1.3.3 前向角散射光灵敏度	30
1.3.4 分析/分选速度	30
1.3.5 分选纯度	30
1.3.6 分选收获率	30
参考文献	30
第 2 章 流式细胞术的质量控制	33
2.1 环境要求	33
2.2 仪器的校正	33
2.3 样本的要求	34
2.4 合理设计对照	34
2.5 获取实验数据和分析	35
参考文献	35
操作篇	37
第 3 章 流式细胞术单细胞悬液的制备	39
3.1 单层培养细胞分散为单个细胞	39
3.2 新鲜实体组织分散为单个细胞	39
3.2.1 机械法	39

3.2.2	酶处理法	40
3.2.3	化学试剂处理法	40
3.3	石蜡包埋组织分散为单个细胞	40
3.3.1	二甲苯脱蜡法	40
3.3.2	组织清洁剂脱蜡法	41
3.3.3	甲氧-双氧水处理法	41
	参考文献	42
第4章	流式细胞术的应用	43
4.1	细胞周期和 DNA 倍体分析	43
4.1.1	概述	43
4.1.2	荧光探针	46
4.1.3	DNA 检测的常用术语	48
4.1.4	样品制备	49
4.1.5	上机检测 (以 PI 标记的标本在 BD FACSCalibur 流式细胞仪检测为例)	50
4.1.6	数据分析	53
4.1.7	注意事项	55
4.1.8	应用举例	57
4.2	DNA 的双参数分析	60
4.2.1	试剂	60
4.2.2	样品制备	60
4.2.3	上机检测	61
4.2.4	结果分析	63
4.2.5	注意事项	64
4.3	凋亡检测	65
4.3.1	凋亡的诱导	67
4.3.2	细胞凋亡的形态学分析	68
4.3.3	Annexin V 凋亡检测法	71
4.3.4	caspase-3 分析	80
4.3.5	碘化丙啶 (PI) 单染色法	88
4.3.6	线粒体膜电位的检测	92
4.3.7	细胞内活性氧的检测	99
4.3.8	DNA 片段检测	107
4.4	肿瘤细胞多药耐药检测	118
4.4.1	细胞表面膜糖蛋白表达水平的检测	119
4.4.2	罗丹明 123 蓄积实验	123

4.5 细胞免疫表型分析	127
4.5.1 概述	127
4.5.2 淋巴细胞免疫表型分析	130
4.5.3 应用举例	135
4.5.4 影响免疫表型分析的一些问题	137
4.6 细胞因子的测定	139
4.6.1 细胞内细胞因子检测	140
4.6.2 流式微球分析 (cytometric beads array, CBA) 法检测 细胞外细胞因子	153
参考文献	170
常见问题解答篇	171

基 础 篇

第1章 流式细胞术及其原理

1.1 流式细胞术

流式细胞术，即利用流式细胞仪对处在快速直线流动状态中的生物颗粒，如各种细胞、微生物及人工合成微球等进行多参数、快速定量分析，同时对特定群体加以分选的现代细胞分析技术，是20世纪70年代初发展起来的。它综合了激光技术、计算机技术、半导体技术、流体力学、细胞化学等各学科的知识，是一种自动分析的技术。随着流式细胞术的不断发展和完善，其应用领域也从细胞生物学基础研究扩大到肿瘤学、血液学、免疫学、药理学、临床检验等各方面。经过科研人员的不断努力，流式细胞仪也在不断更新换代，检测功能不断增加，精确度和检测速度大大提高，操作起来也更加方便。目前的流式细胞仪可以分为两大类：一类是台式机，机型较小、光路调节系统固定、自动化程度高、方便操作，临床检验使用的多是这类机型。另一类是大型机，可以快速地进行分选，而且可以把单细胞分选到指定的培养板上，同时可以选配多种类型和波长的激光管，同时测量多个参数，满足不同的科研需要。目前国际上的两大流式细胞仪生产厂家分别是BD（Becton Dickinson）公司和Beckman Coulter公司。美国BD公司生产的流式细胞仪有FACSCalibur、FACS Aria、FACS Vantage Diva等，Beckman Coulter公司的流式细胞仪有EPICS XL/-MCL、Cytomics™ FC 500系列等。

在分析或分选过程中，包在液流中的单个细胞或细胞器通过聚焦的光源，在通过测量区时可以产生荧光信号或散射光信号，通过测量这些信号，可以了解细胞的一些理化性质，并可根据这些性质分选出高纯度的细胞亚群，以满足进一步研究的目的。与其他细胞分析技术相比，流式细胞术有以下优点：①速度快，可以对细胞或细胞器进行快速测量，测量速度可达到每秒钟数千个至上万个细胞；②高灵敏度，每个细胞上只需要带有 1000~3000 个荧光分子就能检测出来；③高精度，在细胞悬液中测量细胞，比其他技术的变异系数更小，分辨率较高；④高纯度，分选细胞的纯度可达到 99% 以上；⑤多参数，可以同时测量多个参数；⑥在适当的条件下，可以对细胞进行无害性的分析和分选。

1.2 流式细胞仪的基本结构

流式细胞仪主要包括三大部分：①流动室和液流系统 (fluidics system)；②光学系统 (optics system)；③电子系统 (electronics system) (图 1-1)。

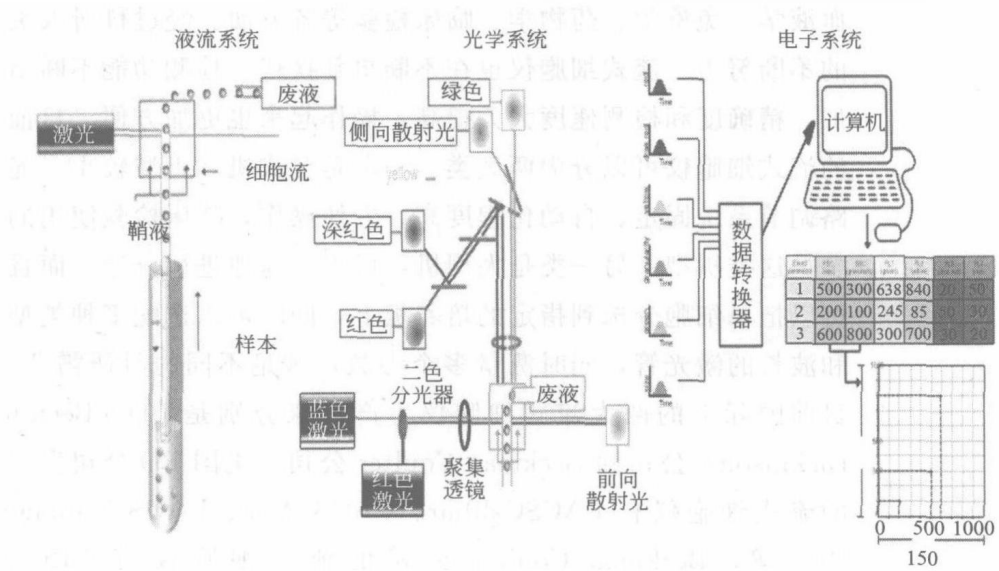


图 1-1 流式细胞仪结构示意图

4 流式细胞术

1.2.1 液流系统

液流系统的作用是依次传送待测样本中的细胞到激光照射区，其理想状态是把细胞传送到激光束的中心。而且在特定时间内，应该只有一个细胞或粒子通过激光束。液流系统包括流动室和液流驱动系统。流动室是流式细胞仪的核心元件，常以有机玻璃、光学玻璃或石英等制成，其设计要求在流体力学、光学、机械学和电学上都十分稳定。在流动室内鞘液将细胞包裹，在鞘液的约束下，细胞排成单列进入流动室喷嘴口，形成细胞液柱。根据层流原理，使得标本流和鞘液两种液体形成稳定的同轴流动状态，外面包裹有鞘液，从而约束标本细胞悬液位于轴心。喷嘴口的直径较小，细胞单个排列通过，尽可能避免了对管道的堵塞，提高了检测速度，同时可以防止因细胞偏离轴心，激光束无法准确照射在细胞中心，造成信号的不稳定和 inaccurate（图 1-2）。

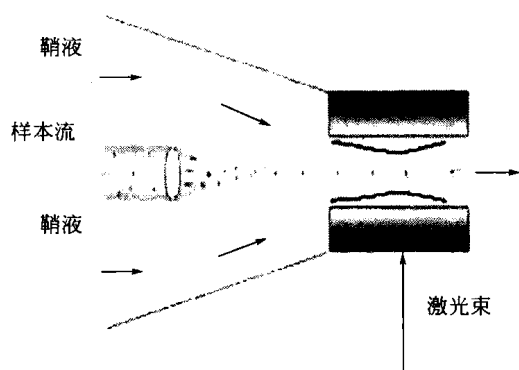


图 1-2 鞘流和液流聚焦原理
(临床流式细胞分析, 王建中, 2005)

常用的液流系统中细胞流和鞘液流一般是采用正压的方法控制的（图 1-3），使用正压使鞘液进入流动室，并同时加压至样本管，使鞘液与样本流在流动室混合，或经由陶瓷喷嘴（vibration nozzle）将带有细胞的鞘液流水柱经高频振荡成微粒水珠，再经过激光照射而产生信号。

增加样本压力就是通过加宽液柱的方法增加样本流速，在特定时间内，允许更多细胞通过液流。当液柱变宽时，一些流经激光束的细胞会偏离中心，光斑也会偏离理想角度，这在一定范围内是允许的（图 1-4）。

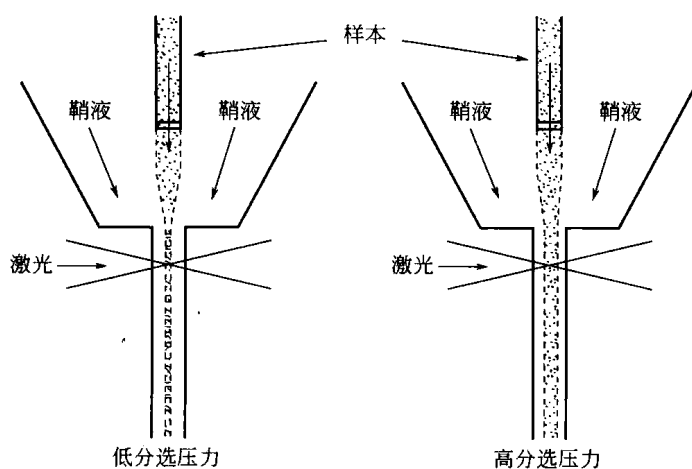
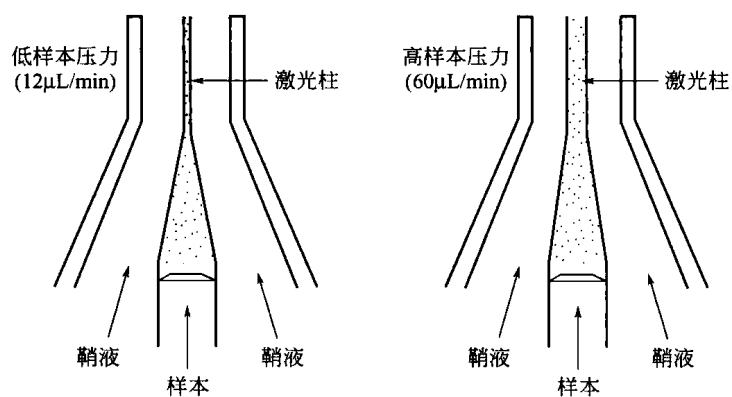
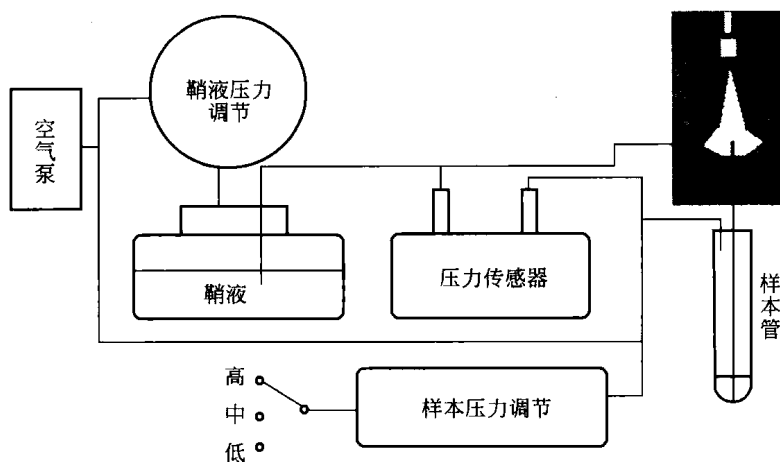


图 1-4 液流聚焦示意图

压力恒定的情况下，鞘液流的流速稳定，每个细胞通过流动室测量区的时间恒定，受激光照射的能量一致，激光焦点处能量分布为正态分布（图 1-5）。当样本速率选择高速（Hi）时，处在样本流不同位置的细胞或颗粒受激光照射的能量不同，可造成测量误差，因此在进行分辨率较高的试验时宜尽量选择低速（Lo）（如 DNA 分析）。高流速适用于定性测量，如免疫表型。此时样本流变宽，细胞间距离缩短，在单位时间内流经激光照射区的细胞数量增加，可以快速获取数据。

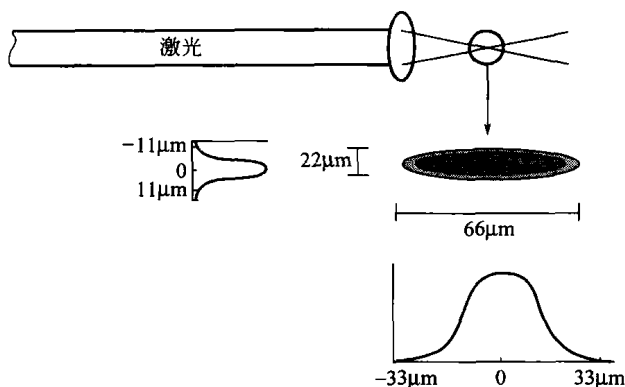


图 1-5 激光束的形成与聚焦示意图

1.2.2 光学系统

1.2.2.1 光学平台

流式细胞仪的光学平台主要包括光学控制系统，由激光光源、分束器和二色分光镜等若干组透镜、滤片组成。台式机的流动室和光路是固定的，能够保证光斑和样本流自始至终保持恒定（图 1-6）。

大型机的光路没有台式机稳定，需要每日优化。光路不正有可能导致粒子受激光照射的能量不均一，从而被激发出的荧光强度也不相同，造成测量误差（图 1-7）。

流式细胞仪的激发光源包括弧光灯和激光。早期的流式细胞仪的激发光源曾采用过弧光灯，这种光源价格便宜，但能量发散、单色性差，且功率不稳定，应用受限。目前流式细胞仪多采用激光作为激发光源，具有稳定性好、能量高、发射角小等特点。目前使用的激光器有气体激光器如氩离子激光、氦氖

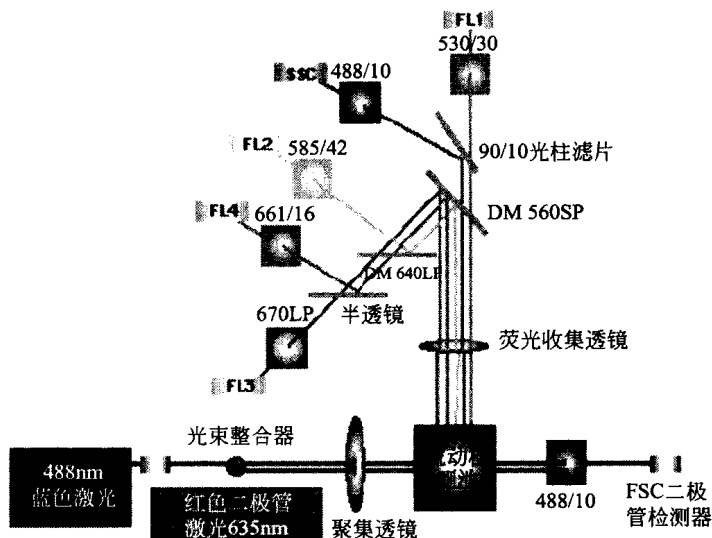


图 1-6 FACSCalibur 流式细胞仪光路图

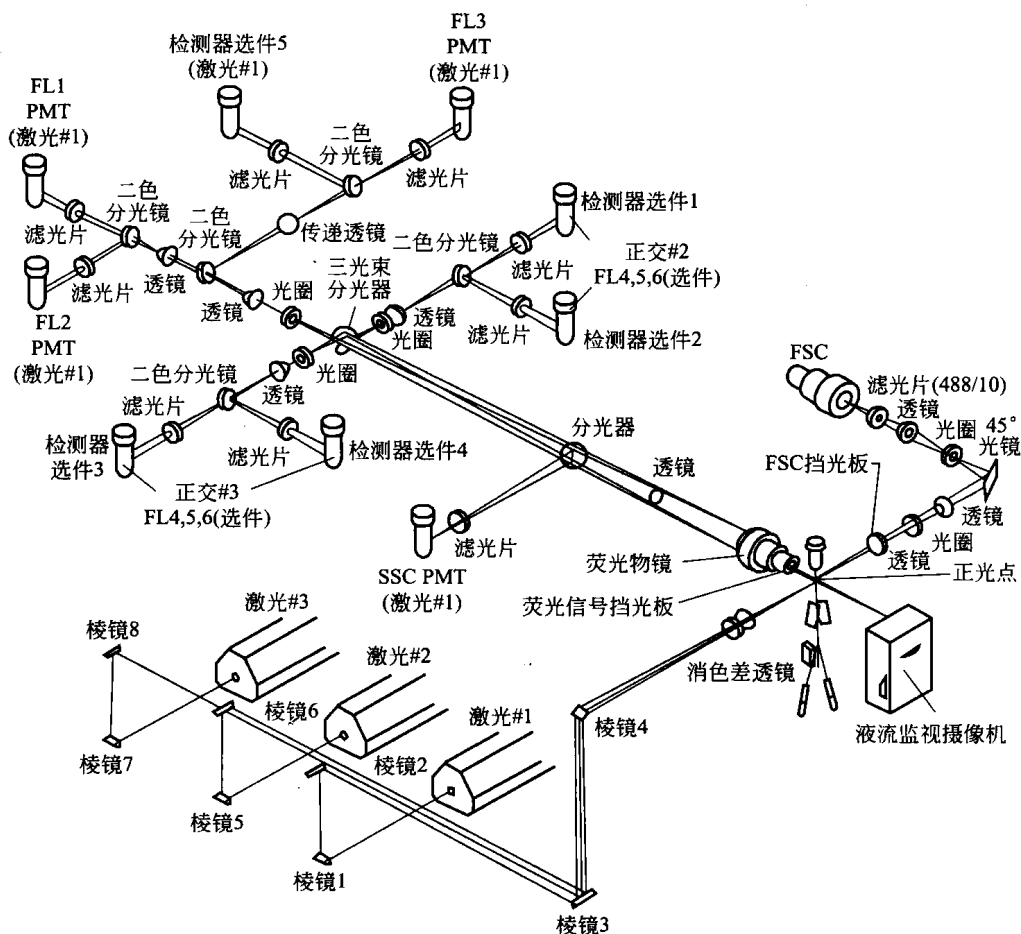


图 1-7 FACSVantage SE 流式细胞仪光路图

激光、氦离子激光等以及染料激光器和半导体激光器。其中半导体激光器价格低、结构简单、寿命长，是激光器的发展方向，缺点是功率较低。目前，最常用的激光的波长是 488nm 的蓝色激光光源和 633nm 的红色激光光源。

1.2.2.2 光学滤片

流式细胞仪的主要光学元件是滤光片，主要分为三类：长通滤片（long-pass filter, LP）、短通滤片（short-pass filter, SP）及带通滤片（band-pass filter, BP）。长通滤片只允许特定波长以上的光通过，如 LP500 滤片只允许波长在 500nm 以上的光通过，波长在 500nm 以下的光被吸收或返回。短通滤片只允许特定波长以下的光通过。带通滤片只允许波长在一定范围内的光通过，该波长范围之外的光均不能通过，如 BP 500/50 表示通过滤片的波长中心值是 500nm，50 则代表

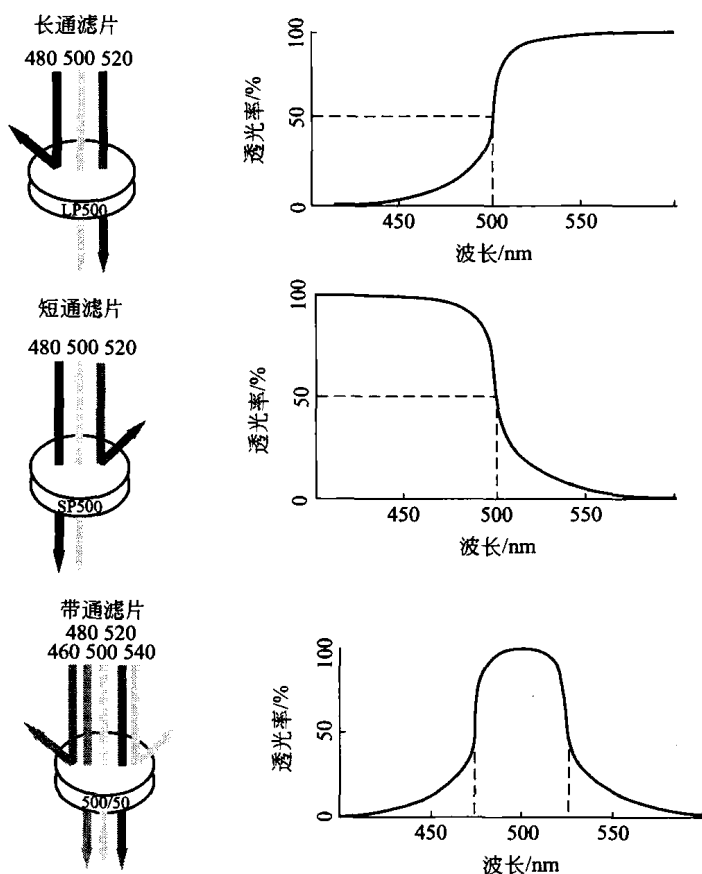


图 1-8 长通滤片、短通滤片和带通滤片的波长范围

允许通过的波长范围，即波长为 475~525nm 的光可以通过该滤片（图 1-8）。

1.2.2.3 检测器

信号探测器共有两类：光电二极管和光电倍增管（PMT）。在光线较弱时，光电倍增管灵敏度较高，稳定性较好；但是在光线很强时，光电二极管比光电倍增管稳定得多了。所以在探测信号很强的 FSC 时使用光电二极管，增益在 $10^{-1} \sim 10^4$ 内可调，而在检测 SSC 和各种荧光时使用光电倍增管，PMT 电压调节从 150~999，电压上升时，信号增强。

1.2.3 电子系统

电子系统包括光电转换器和数据处理系统，功能是采集信号，并将采集到的电信号转换为数字信号，进行储存和分析（图 1-9）。

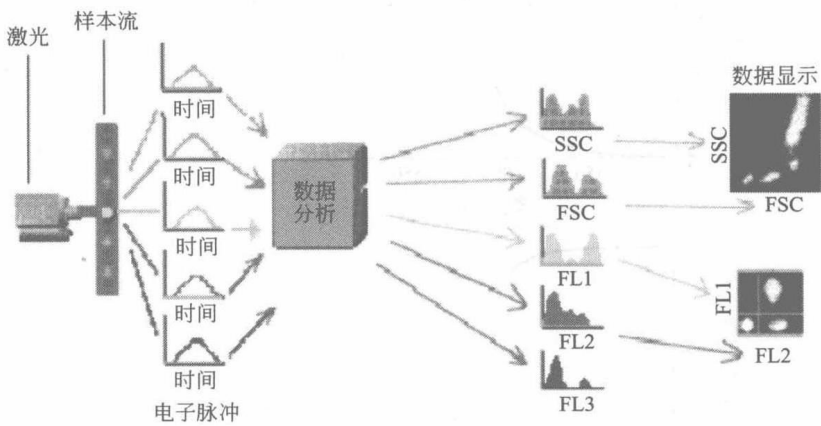


图 1-9 FAC-SCalibur 流式细胞仪（三色）的电子系统

当液流中的细胞或颗粒通过测量区，经激光照射后，液流中的细胞在激光照射激发下，会向各方向发射散射光和荧光（图 1-10），通过放置在各方向上的光敏元件，就可得到每个细胞的一组相关参数。

1.2.3.1 散射光信号

散射光信号分为前向散射光（forward scatter，FSC）和侧向散射光（side scatter，SSC），散射光不依赖任何细胞样品