

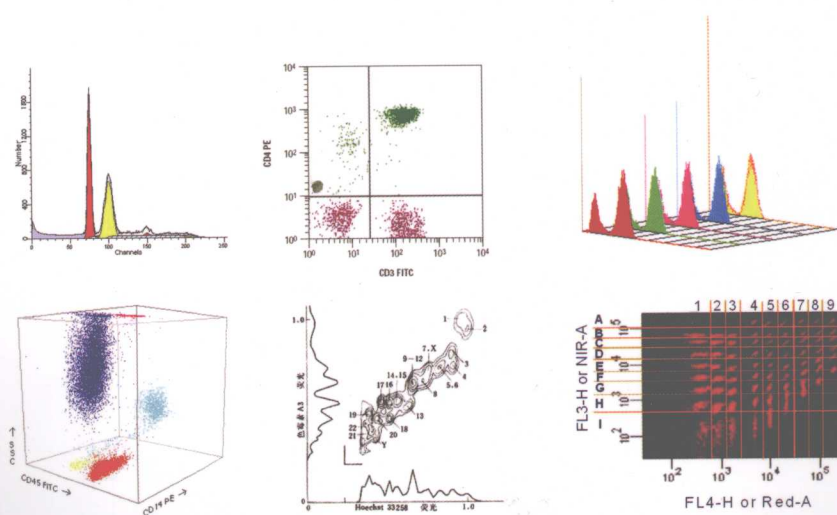
借



北京大学医学教材

# 流式细胞术 原理与应用教程

吴后男 编



北京大学医学出版社

北京大学医学教材

# 流式细胞术原理与应用教程

吴后男 编

北京大学医学出版社

**图书在版编目 (CIP) 数据**

流式细胞术原理与应用教程/吴后男编. —北京: 北京大学医学出版社, 2008. 2  
ISBN 978-7-81071-744-1

I. 流… II. 吴… III. 细胞生物学—教材 IV. Q2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 003754 号

**流式细胞术原理与应用教程**

---

编 者: 吴后男

出版发行: 北京大学医学出版社 (电话: 010-82802230)

地 址: (100083) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E - mail: [booksale@bjmu.edu.cn](mailto:booksale@bjmu.edu.cn)

印 刷: 北京东方圣雅印刷有限公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 安 林 责任校对: 金彤文 责任印制: 张京生

开 本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 9.25 插页: 2 字数: 230 千字

版 次: 2008 年 2 月第 1 版 2008 年 2 月第 1 次印刷 印数: 1-2000 册

书 号: ISBN 978-7-81071-744-1

定 价: 21.00 元

版权所有, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

# 前 言

流式细胞术 (flow cytometry) 是利用流式细胞仪 (flow cytometer) 对悬浮细胞或微粒进行快速、多参数分析的现代细胞分析技术。流式细胞术动用了现代多学科高新技术, 能够同时定量检测单个细胞的多项指标, 显示出无比优越性, 已广泛应用于细胞生物学、免疫学、药理学、病理学、遗传学、血液学、肿瘤学、海洋生物以及动植物学等研究领域, 对细胞的生理功能、疾病的发生与发展规律的研究起着重要作用, 越来越受到众多科研人员关注。

目前该技术已逐步进入到临床工作与各项研究领域, 并已陆续纳入到一些高等院校的教学课程。虽然该技术在国际上发展迅速, 但在国内尚未达到普及化, 特别是尚缺乏适合于教学的参考书。本书主要为高等院校教学而编写的。

本书重点介绍了流式细胞仪主要内部结构、分析和分选原理、数据获取和分析方法、仪器的维护方法与注意事项、实验室常规样本制备方法, 同时较全面地介绍了目前该项技术在科研和临床中广泛应用领域, 以及最前沿的应用和发展动态, 还介绍了流式细胞术常用试剂配制、常用实验技术的操作步骤和注意事项、流式细胞术应用实例彩色图谱, 最后介绍了目前市场上畅销的美国 BD 公司和库尔特公司的不同配置型号流式细胞仪。该书的内容丰富, 涉及面广, 非常适合于做研究生和本科生教材, 同时也可做从事流式细胞术的科研人员 and 专业技术人员参考书。

由于本书编写过程比较匆忙, 问题与不足之处在所难免, 敬请读者、专家和同仁批评指正。

编者

# 目 录

<b>第一章 流式细胞仪基本结构与工作原理</b> .....	(1)
<b>第一节 流式细胞术发展简史</b> .....	(1)
<b>第二节 流式细胞仪的基本结构</b> .....	(2)
一、流式细胞仪分类.....	(3)
二、流式细胞仪的基本结构.....	(4)
<b>第三节 流式细胞仪的工作原理</b> .....	(12)
一、流式细胞仪的分析原理 .....	(12)
二、流式细胞仪的分选原理 .....	(14)
<b>第四节 流式细胞仪的光信号检测</b> .....	(17)
一、散射光信号检测 .....	(17)
二、荧光信号检测 .....	(18)
<b>第五节 FCM 常用荧光染料</b> .....	(22)
一、单克隆抗体标记的荧光染料 .....	(22)
二、核酸荧光染料 .....	(23)
<b>第六节 FCM 的主要技术指标</b> .....	(26)
一、荧光分辨率 .....	(26)
二、荧光测量灵敏度 .....	(27)
三、前向散射光检测灵敏度 .....	(27)
四、FCM 分析速度.....	(27)
五、FCM 分选指标.....	(27)
六、其他软指标 .....	(28)
<b>第七节 FCM 仪器校正和维护与保养方法</b> .....	(28)
一、FCM 仪器校准.....	(28)
二、FCM 仪器维护与保养方法.....	(29)
<b>第二章 流式细胞术的数据采集与分析</b> .....	(31)
<b>第一节 流式细胞术的数据显示方法</b> .....	(31)

一、单参数直方图 .....	(31)
二、散点图 .....	(32)
三、等高图 .....	(32)
四、密度图 .....	(33)
五、假三维图 .....	(33)
六、三维图 .....	(34)
七、多参数组合分析 .....	(34)
<b>第二节 流式细胞术数据采集与分析方法 .....</b>	<b>(35)</b>
一、CellQuest 软件主界面 .....	(35)
二、流式细胞术的数据采集方法 .....	(37)
三、流式细胞术的数据分析方法 .....	(38)
<b>第三章 流式细胞术的样品制备方法 .....</b>	<b>(39)</b>
<b>第一节 单细胞悬液的制备 .....</b>	<b>(39)</b>
一、新鲜实体组织单细胞悬液制备 .....	(39)
二、石蜡包埋组织单细胞悬液制备 .....	(41)
三、培养细胞的单细胞悬液制备 .....	(42)
四、外周血单细胞悬液制备 .....	(42)
五、骨髓有核细胞悬液的制备 .....	(43)
六、活检、内镜取材标本单细胞悬液制备 .....	(43)
七、脱落细胞的单细胞悬液制备 .....	(44)
<b>第二节 荧光抗体的选择与使用原则 .....</b>	<b>(44)</b>
一、根据信噪比选择抗体滴度，低表达抗原标记高信噪比荧光素 .....	(44)
二、多色分析时组合抗体的使用原则 .....	(45)
三、根据仪器型号和抗原表达强弱合理选择荧光抗体 .....	(45)
<b>第三节 样品的荧光素标记与影响因素 .....</b>	<b>(45)</b>
一、荧光抗体直接标记法 .....	(46)
二、荧光抗体间接标记法 .....	(46)
三、样品荧光素标记影响因素 .....	(46)
<b>第四节 FCM 检测样品对照的设置 .....</b>	<b>(47)</b>
一、阳性对照 .....	(47)
二、阴性对照 .....	(47)
三、补偿对照 .....	(48)

第五节 样品的固定与保存 .....	(48)
一、固定剂的作用 .....	(48)
二、固定方法 .....	(48)
第四章 流式细胞术的应用 .....	(50)
第一节 FCM 在临床医学中应用 .....	(50)
一、淋巴细胞亚群分析 .....	(50)
二、血小板分析 .....	(50)
三、网织红细胞分析 .....	(52)
四、白血病和淋巴瘤免疫分型 .....	(53)
五、HLA-B27 表型分析 .....	(53)
六、PNH 诊断 .....	(54)
七、人类同种异体器官移植中的应用 .....	(55)
八、艾滋病的诊断与治疗 .....	(56)
九、临床肿瘤学中的应用 .....	(56)
十、临床微生物学中的应用 .....	(57)
第二节 FCM 在基础研究中的应用 .....	(57)
一、DNA 分析 .....	(57)
二、细胞凋亡分析 .....	(62)
三、树突状细胞 (DC) 研究 .....	(66)
四、造血干/祖细胞研究 .....	(67)
五、细胞膜电位测定 .....	(69)
六、胞内钙离子测定 .....	(70)
七、细胞内 pH 测定 .....	(71)
八、细胞内活性氧检测 .....	(71)
九、蛋白质磷酸化检测 .....	(72)
十、染色体分析 .....	(74)
十一、精液质量检测 .....	(76)
十二、flow-FISH 法测定端粒长度 .....	(78)
十三、肿瘤多药耐药性检测 .....	(78)
十四、人类调节性 T 细胞检测 .....	(80)
十五、细胞因子检测 .....	(81)
第三节 流式细胞术在海洋生物中应用 .....	(83)

一、FCM 在海洋浮游植物研究中的应用	(84)
二、FCM 在海洋细菌研究中的应用	(85)
三、FCM 在海洋经济动物细胞核研究中的应用	(85)
第四节 FCM 分选技术应用与注意事项	(86)
一、分选应用	(86)
二、分选注意事项	(86)
第五节 定量流式细胞术与应用	(87)
一、校准微球	(88)
二、定量流式细胞分析方法	(88)
三、定量流式细胞术的应用	(91)
第六节 流式微球捕获芯片技术 (CBA 方法)	(92)
一、CBA 工作原理	(92)
二、CBA 特点	(93)
三、所需试剂与仪器	(94)
四、主要实验步骤	(94)
五、CBA Flex Set 试剂组合	(94)
第五章 流式细胞术的优越性、发展趋势与展望	(96)
一、流式细胞术的优越性	(96)
二、流式细胞术的发展趋势	(96)
三、展望	(97)
第六章 流式细胞术常用实验方法和注意事项	(98)
第一节 流式细胞术常用试剂	(98)
一、4%多聚甲醛的配制	(98)
二、PBS 配制	(98)
三、溶血剂的使用	(98)
四、破膜剂的使用	(99)
第二节 流式细胞术常用实验	(99)
实验一 外周血淋巴细胞亚群测定 (CD 系列)	(99)
一、原理	(99)
二、样本采集与处理	(100)
三、样本制备	(100)
四、结果分析	(100)



实验二 激活的淋巴细胞内细胞因子的检测	(100)
一、简介	(100)
二、检测方法	(101)
实验三 细胞凋亡检测	(107)
一、碘化丙啶单染法	(108)
二、Annexin V/PI 双染色法	(109)
三、Caspase-3 活性检测法	(110)
四、DNA 断裂点标记	(110)
五、凋亡相关蛋白检测	(113)
实验四 细胞周期与 DNA 倍体分析	(114)
一、原理	(114)
二、试剂配制和实验步骤	(114)
三、结果判定	(114)
四、注意事项	(114)
实验五 液相中细胞因子的 CBA 方法检测	(114)
一、流式微球捕获芯片技术 (Cytometric Beads Array, CBA)	(114)
二、CBA Flex set 检测方法	(116)
实验六 细胞 RNA 含量测定	(122)
一、原理	(122)
二、试剂	(122)
三、染色步骤	(122)
四、检测分析	(122)
实验七 细胞总蛋白质含量测定	(123)
一、原理	(123)
二、样品制备	(123)
三、检测分析	(123)
实验八 网织红细胞分析	(123)
一、原理	(123)
二、样品制备	(124)
三、检测分析	(124)
实验九 外周血白细胞 HLA-B27 抗原分析	(124)
一、原理	(124)

二、样品制备.....	(124)
三、检测分析.....	(125)
实验十 血小板膜糖蛋白分析.....	(125)
一、原理.....	(125)
二、样品制备.....	(125)
三、检测分析.....	(126)
<b>参考文献</b> .....	(127)
<b>附录 1 商品化流式细胞仪概述</b> .....	(131)
一、美国 BD 公司生产流式细胞仪.....	(131)
二、美国 Coulter 公司生产流式细胞仪.....	(134)
<b>附录 2 流式细胞术应用实例彩色图谱</b> .....	(137)

# 第一章 流式细胞仪基本结构与工作原理

## 第一节 流式细胞术发展简史

流式细胞仪的发展起源于对细胞计数自动化的研究。1934年 Moldvan 首先报道了一种对流动的细胞进行计数的装置，检测红细胞或染色后的酵母菌在稳定的压力作用下流过显微镜载物台上的一个细玻璃管，每个通过显微镜视野的细胞可被光电装置记录下来。但试验中遇到了大细胞或聚集细胞阻塞玻璃管等一系列问题。为了解决细胞对玻璃管的阻塞问题，1947年 Gucker 等首次采用鞘液原理对气体中的微粒进行计数。1953年 Crosland-Taylor 利用同一原理，成功地设计了一种鞘液系统，配合光电技术对红细胞进行计数。他将待测细胞悬液缓慢地注入一个快速流动的液流中，使该液流包绕在细胞悬液的外侧形成鞘流 (sheath flow)，而细胞悬液则始终处于轴流状态。这样就可以用较粗的管道使较小直径的细胞悬液通过，因此避免了管道的阻塞。如今几乎所有流式细胞仪生产厂家均采用了这项技术。1949年 Coulter 申请了一项对“流动的悬浮粒子计数”的专利，原理是：将一个微孔两侧充满电解质溶液，通电时电流通过微孔，在压力系统控制下细胞或颗粒流过微孔时，使微孔截面积减小，由于细胞或颗粒的电阻与电解质相差很大，可以检测出微孔两侧电压变化脉冲，这就是著名的 Coulter 原理。如今商品化的大多数血细胞计数仪都是基于这个原理。1956年 Coulter 根据这个原理生产出了血细胞计数器，1959年又对电路系统进行了改进，提高了信噪比，降低了不同颗粒之间信号的重叠，推出 B 型计数器，从此自动化的血细胞计数仪开始逐渐取代了人工细胞计数的方法。根据 Coulter 原理推测出信号脉冲的幅度和宽度与细胞颗粒的体积有关，因此能够以此区分不同颗粒大小，从而对感兴趣的细胞或颗粒进行计数。随着对脉冲分析要求的提高，Van Dilla 在血细胞计数仪中引入了单通道脉冲高度分析器，大大增强了细胞计数仪数据分析能力，也为今天的白细胞体积分类打下了基础。1953年 Parker 和 Horst 介绍了一种全血细胞分析方法。其方法是：先将全血细胞进行荧光染色，白细胞染成蓝色荧光，红细胞染成红色荧光，当细胞悬液通过检测细玻璃管时被一束光照射产生蓝光和红光，产生的光经过滤光片后分别由两个光电转换器转换为电信号，再由数字化电路计数。1965年 Kamensky 等设计出一台仪器，可以同时测量未染色细胞核酸的紫外吸收光和反向闪射光两种参数，并首次把计算机同仪器连接起来进行数据处理，用二维散点图进行数据显示和分析，但该机器在液路系统中并未采用鞘流技术。不久这台仪器被借给斯坦福大学，这对 Becton Dickinson 公司 FACS™ 和 Bayer 公司 HemalogD™ 的研制开发产生了深远的影响。

1969年 Van Dilla 等在 Los Alamos 国家实验室研制出一种流式细胞仪，用氩离子激光为光源，采用了鞘流技术。在设计上使鞘流、激发光束和检测光路三者相互垂直，通过荧光强度的检测确定细胞内 DNA 含量。他们利用这台仪器首次通过 Feulgen 染色对细胞 DNA 荧光强度的检测，反映了倍体与荧光强度之间的线性关系，从而极大地推动了细胞动力学的

发展。随后, Göhde 等首先应用流式细胞仪测量细胞中 DNA 含量, 根据细胞周期的变化来研究药物对细胞的影响。随后的时间里 Mullaney 等发现小角度散射光 ( $0.5^{\circ}\sim 2^{\circ}$ ) 与被检测粒子的体积有一定关系。根据这个原理以氩-氦激光为光源, 对直径  $5\sim 20\mu\text{m}$  的微小粒子进行了测量, 其结果与显微镜检查有很好的相关性。这个发现使得后来的流式细胞仪可以通过小角散射光进行细胞大小的测量。1970 年 Phyweh 首次研究出一台配备荧光镜的流式细胞仪, 它可以对 DNA 含量进行定量分析。同年 Kamensky 发明了白细胞分类的流式细胞仪, 它以激光为光源, 用吡啶橙染色全血后上机检测, 可以区分淋巴细胞、单核细胞和中性粒细胞。1972 年 LenHerzenberg、BillBonnar、Dick Sweet 和 RussHulett 等人在斯坦福大学研制出一台荧光激活细胞分选仪 (fluorescence-activated cell sorter, FACS), 它标志着流式细胞仪商品化时代的到来。该机以氩离子激光为光源, 检测出激发出来的微弱荧光。1974 年 Becton Dickinson 公司 (BD) 将它投入市场, 商品名为 FACS I<sup>TM</sup>。之后 20 多年来 BD 公司不断发展并完善这个产品, 先后推出了 FACS Analyzer<sup>TM</sup>、FACSscan<sup>TM</sup>、FACS Calibur<sup>TM</sup>、FACS Vantage<sup>TM</sup>、FACS Diva<sup>TM</sup>、FACS Aria<sup>TM</sup>。

从 20 世纪 70 年代后期开始, Los Alamos 国家实验室的科学家们先后研发出一系列技术, 使得流式细胞仪可进行多参数分析。基于这些技术 1975 年美国 Coulter 公司推出了流式细胞仪 TPS-I<sup>TM</sup>, 该机是可进行双参数分析的分选仪 (two-parameter sorter), 随后 Coulter 公司不断推出新的不同型号流式细胞仪, 包括 EPICS-C<sup>TM</sup>、EPICS-Profile<sup>TM</sup>、EPICS-ELITE<sup>TM</sup> 等。80 年代初 Lawrence Livermore 国家实验室的 Joe Gray 等人制造出高速分选流式细胞仪, 分析速度可达 25000 个/秒, 为普通分选速度的  $5\sim 10$  倍。1994 年美国 Cytomation 公司推出了一款高性能流式细胞仪和高速分选装置 MoFlo<sup>TM</sup>, 该机以其出色的性能和创新理念, 一经推出即受到广泛的关注。从 20 世纪 80 年代初到今天, 世界上流式细胞仪厂家几经变迁, 美国 BD 公司、Coulter 公司等厂家推出的产品, 凭借着自己领先的技术和悠久的历史, 占领了大部分流式细胞仪市场。经过多年的研究, 2005 年美国 Amnis 公司又生产出一台 ImageStream<sup>®</sup> 100 图像流式细胞仪。该仪器是在一个技术平台上, 同时实现了流式细胞仪和荧光细胞显微图像的两种不同分析功能, 是一项具有创新性、革命性细胞分析技术。该技术不仅可以定量检测细胞表面和胞内的荧光信号, 也可以检测细胞的荧光定位。

进入 21 世纪流式细胞术作为一门生物检测技术已经日臻完善, 成为细胞学分析领域中任何技术无可替代的重要工具。

## 第二节 流式细胞仪的基本结构

流式细胞仪 (flow cytometer, FCM) 是一种集激光技术、电子物理技术、光电测量技术、电子计算机技术、细胞荧光化学技术、单克隆抗体技术等为一体的新型高科技仪器。所谓流式细胞术 (flow cytometry) 就是对于处在快速直线流动状态中的细胞或生物颗粒同时进行多参数、快速定量分析和分选的高新技术。从第一台流式细胞仪问世以来, 研究者们经过坚持不懈的努力推动了流式细胞术的迅猛发展, 目前流式细胞术已成为细胞或生物颗粒乃至可溶性生物分子分析的重要工具。

### 一、流式细胞仪分类

流式细胞仪大体上可分为三大类：第一类为临床型（台式机），特点为：机体较小，具有固定光路，每天开机不需要过多的人工调整，自动化程度高，操作简便，功能相对简单，易学易掌握，适合各种临床细胞免疫学分型、DNA 和 RNA 分析等。如 BD 公司的 FACS-Calibur 和 Beckman Coulter 公司的 EPICS XL 均属这类仪器（图 1-2-1）。

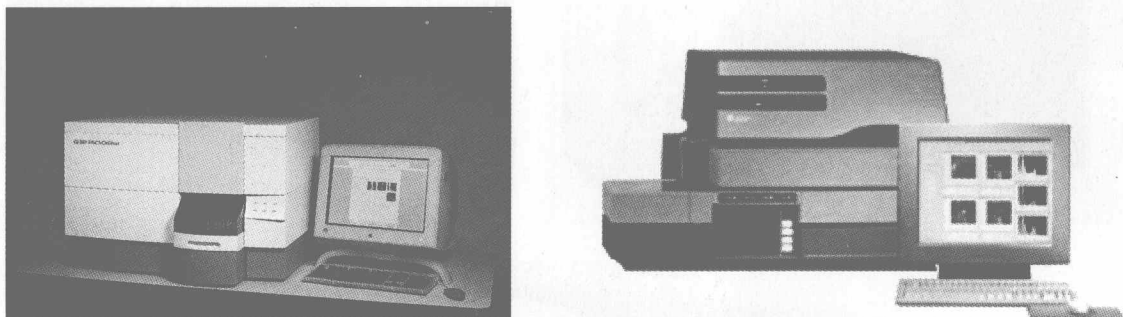


图 1-2-1 临床型流式细胞仪

左：BD 公司 FACS Calibur-2L, 4F 右：Coulter EPICS XL/XL-MCL-1L, 4F

第二类为科研型（大型机），特点为机体较大，但功能强大，分辨率高，除了可以完成临床型仪器的检测项目外，还可以进行细胞内的 pH、膜电位、染色体核型分析等科研工作。同时具有快速分选功能，将含量较低的细胞从异质性细胞群体中分离出来，可进行选择性细胞培养或单细胞的生物学行为测试，广泛应用与单克隆抗体的筛选和细胞株的纯化。这种机型每天开机时需要进行光路调整，需要有经验的人操作。代表性产品有 BD 公司的 FACSDiva 和 Beckman Coulter 公司的 EPICS Altra（图 1-2-2）。

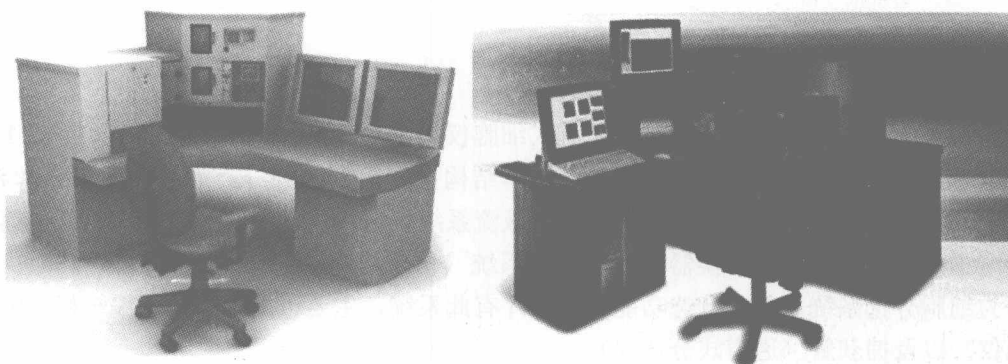


图 1-2-2 科研型流式细胞仪

左：BD 公司 FACSDiva-14F 右：Coulter 公司 EPICS Altra-4L, 8F

第三类为近几年问世的最新型仪器，如 BD 公司的 FACS Aria 分选仪和 Coulter 公司的 Cytomics™ FC500 分选仪以及 BD 公司的 LSR II 等。这些仪器选用了 2~4 根激光管，最多

能够检测 13 个荧光参数和 2 个散射光信号，可同时分析 15 个参数，并且分选仪可以实现高速 4 路分选，分选速度可达 50000 个/秒，通过软件自动调控仪器，避免了手动调节光路的麻烦，因此能够满足多种学科研究的要求（图 1-2-3）。

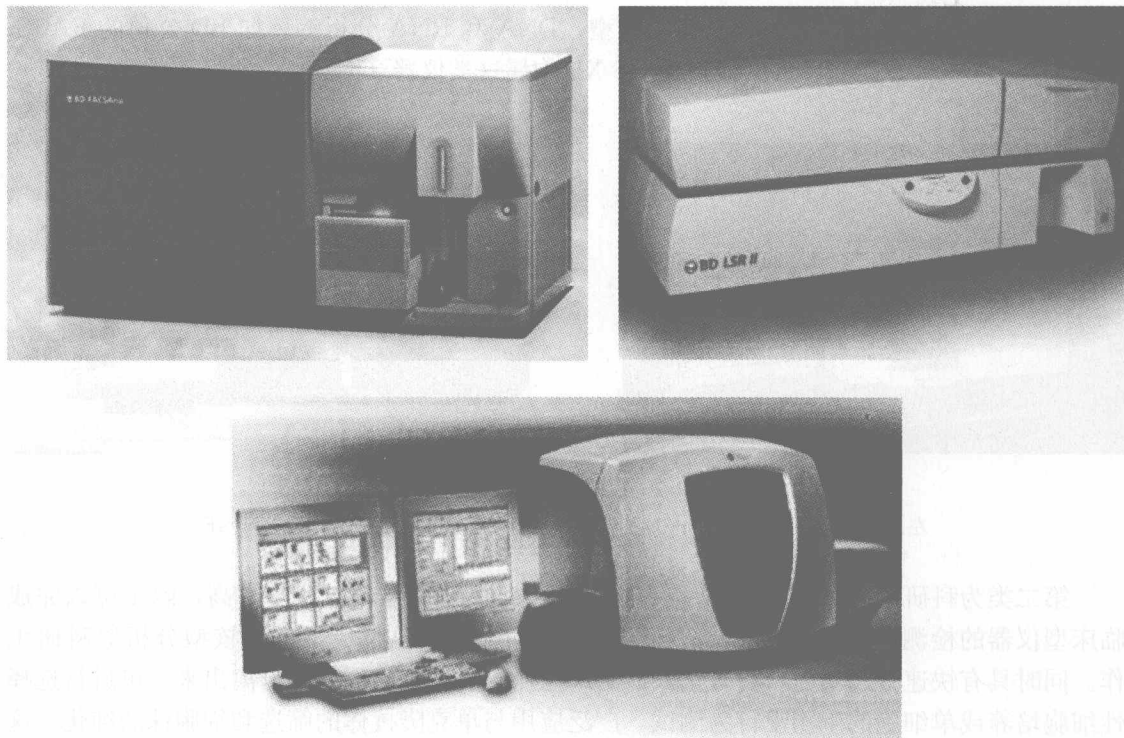


图 1-2-3 最新型流式细胞仪

左上：BD 公司 FACS Aria 分选仪；右上：BD 公司 LSR II 分析仪；下：Coulter 公司 Cytomics™ FC 500 系列分选仪

## 二、流式细胞仪的基本结构

无论是临床型、科研型还是最新型流式细胞仪，其内部结构的基本组成相同（图 1-2-4），但每种仪器还有各自的特征性结构。基本结构主要包括四部分：第一部分为光学系统，包括激发光源和光束成形系统；第二部分为液流系统，包括流动室和液流驱动系统；第三部分为电子系统，包括光电转换器和数据处理系统（信号检测、存储、显示、分析等）；第四部分为细胞分选系统，具有分选功能的仪器才有此系统，主要包括喷嘴和电偏转板（电荷式分选仪）以及捕获管（通道式分选仪）。

### （一）光学系统

流式细胞仪的主要功能是检测荧光信号和散射光信号，因此光学系统是在流式细胞仪中最重要的一个系统，它是由激光光源和光束成形、收集系统组成。

#### 1. 激发光源

流式细胞仪中激发光源主要包括弧光灯和激光（laser）两大类。

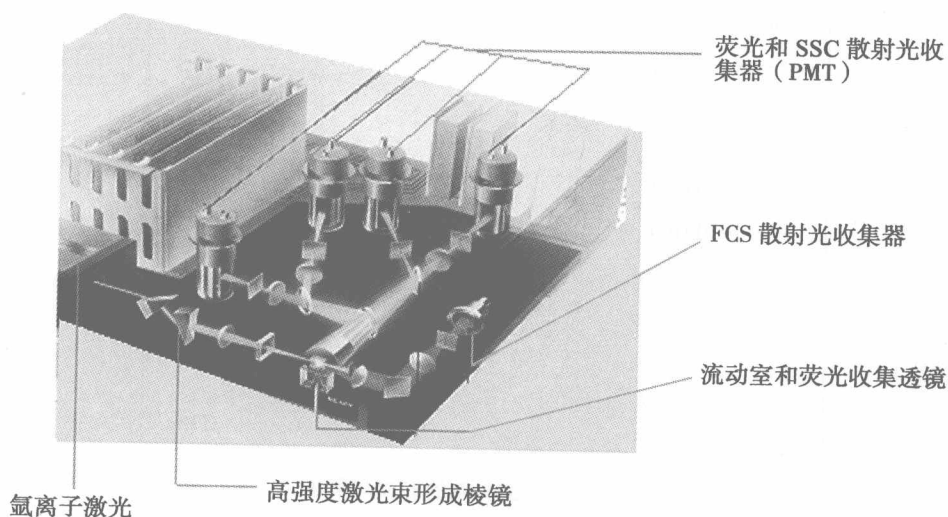


图 1-2-4 流式细胞仪基本光路结构图

(1) 弧光灯：主要有氙灯和高压汞灯，具有廉价、激发光谱广泛等优点，激发波长覆盖紫外光和整个可见光范围，经过滤光片滤波后可同时得到多个波长的激发光，特别是在紫外光范围也可以激发染料，因此非常适合于做 DNA 分析和特殊荧光染料的研究。但弧光灯在单一谱线上能量较弱，且功率不够稳定等缺点使其应用受到一定限制。

(2) 激光：现代流式细胞仪的激发光源通常采用激光。激光是一种相干光源，它能够提供单波长、高能量、高稳定性的光照，是快速分析细胞微弱光的理想光源，因而激光器已成为当今主流产品的标准配置。激光光源按着激光器的种类可分为气体激光器、染料激光器和半导体激光器。气体激光器主要有氩离子激光（激发波长 488nm）、氦-氖激光（激发波长 633 nm）、氦离子激光（激发波长 647 nm）、氦-氩混合气体激光（激发波长 568 nm）；而染料激光器的共激物质是一种荧光染料的溶液，需要有另外一个泵浦激光器（pump laser）激发才能发射出长波长的激光，例如以氩离子激光泵浦的 Rhodamine 6G 水溶液的染料激光器可发射出 550~650 nm 可变波长的激发光；半导体激光器是较新的产品，它具有价格低、结构简单、寿命长等优点，但它的功率较低是个缺点，如能解决这个问题它是今后激光器的发展方向。目前美国 BD 公司的 FACSCalibur™ 已采用了激发波长为 635nm 的半导体激光器。

因为激光器的发散角通常在  $10^{-6}$  球面度量级的立体角内，所以可以聚焦成非常窄的高能量光束，当细胞通过检测区时可以得到很强的信号，并且激发光束的宽度与细胞大小接近，就可以避免同时激发其他细胞所造成的干扰。激发光束在达到流动室之前，先经过透镜将其聚焦，形成几何尺寸约为  $22\sim 66\mu\text{m}$ ，即短轴稍大于细胞直径的光斑，这种椭圆形光斑激光能量分布属于正态分布（图 1-2-5）。为了保证样品中细胞受到的光照强度一致，须将样本流与激光束正交，相交于激光能量分布的峰值处。台式机的光路调节对使用者是封闭的，由专业工程师安装调试完毕后无须任何调节，因此操作起来十分方便。

## 2. 光束成形、收集系统

光束成形和收集系统主要由多组透镜（lens）、光学滤片和小孔组成。当不同功率的激

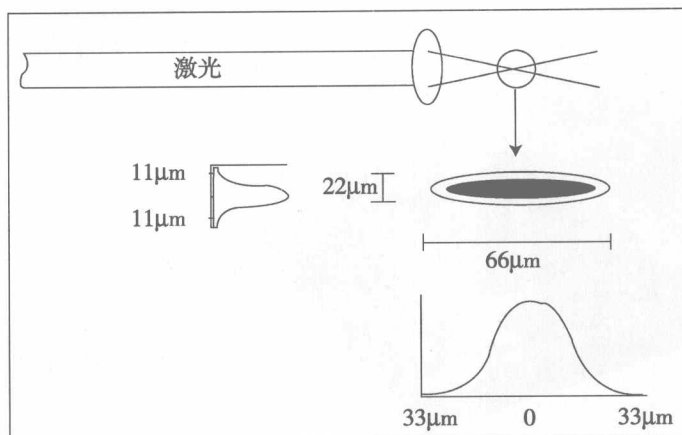


图 1-2-5 激光束的形成与聚焦

光器发射出单波长、高强度和高稳定性的不同波长激光以后，通过各种透镜的作用使激光束整形和聚焦。各种光学滤片（filter）和小孔主要是去除干扰信号。下面介绍三种常用光学滤片（图 1-2-6）。

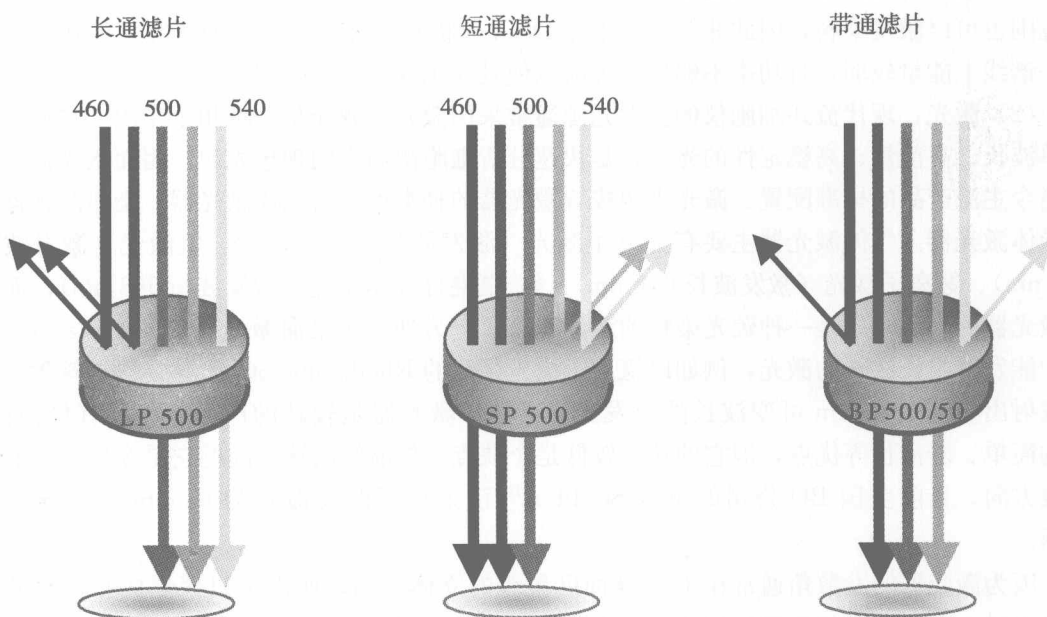


图 1-2-6 不同类型光学滤光片

长通滤片 (long pass filter): 这种滤片只能通过特定波长以上的光束，特定波长以下的光束不能通过。如 LP 500 滤片，只允许 500nm 以上的光束通过，而 500 nm 以下的光束被吸收或返回。

短通滤片 (short pass filter): 这种滤片只允许特定波长以下的光束通过，而特定波长以上的光束被吸收或返回。如 SP 500 滤片，允许 500 nm 以下的光束通过，而 500 nm 以上的光束被吸收或返回。



带通滤片 (band pass filter): 这种滤片只允许通过一定波长范围内的光束, 这种光束很窄。一般滤片上标注两个数, 一个是允许通过波长的中心值, 另一个是允许通过光束的波长范围。如 BP 500/50 表示允许通过的光束波长范围为 475~525 nm, 通过波长中心值为 500nm。

### (二) 液流系统

液流系统包括流动室 (flow chamber) 和液流驱动系统, 其作用是将被测样本管中的细胞或微球通过液流传递至流动室, 经液流聚焦形成单细胞流也称层流 (laminar flow), 使其通过检测区 (激光照射区)。

#### 1. 流动室

流动室是仪器的最核心部件, 在这里被测样品与激光相交。不同仪器的流动室结构有所差异。FACSCalibur 流式细胞仪的流动室是由石英玻璃制成, 并在石英玻璃中央开了一个孔径为  $430\mu\text{m}\times 180\mu\text{m}$  的长方形孔, 供单个细胞流过, 检测区就在该孔的中心。这种流动室的光学特性良好, 流速较慢, 细胞受照时间较长, 可收集的细胞信号光通量大, 配上广角收集透镜, 可获得很高的检测灵敏度和精密度 (图 1-2-7)。

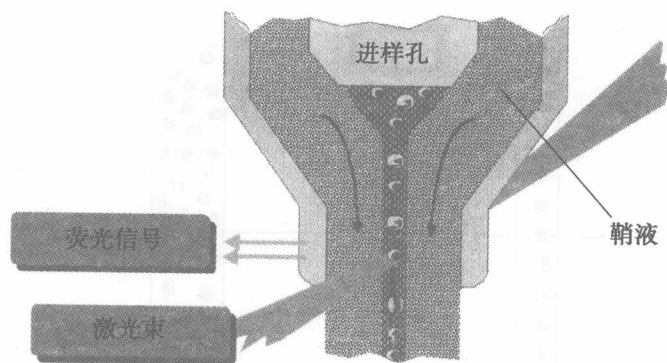


图 1-2-7 FCM 的流动室结构图

流动室内充满了鞘液, 鞘液的作用是将样品流环包。鞘液流 (sheath flow) 是一种稳定流动, 操作人员无法随意改变其流动的速度, 但样品流 (sample fluid) 进样速率可以通过 FCM 上的样品压力调节阀进行人工调节 (图 1-2-8)。样品流在鞘液的环包下形成流体力学聚焦, 使样品流不会脱离液流的轴线方向, 并保证每个细胞通过激光照射区的时间相等, 从而得到准确的细胞荧光信号。

#### 2. 液流驱动系统

液流驱动系统包括压缩空气泵、压力传感器、鞘液过滤器和样本压力调节器等 (图 1-2-8)。

细胞流和鞘液流的驱动一般采用加正压的方法, 保证了鞘液的流速恒定。鞘液以匀速运动流过流动室, 因此在整个液流系统运行中流速是不变的。但是通过样本压力调节阀可以调整样本的进样速率, 可提高采样分析速度, 而这并不是提高样本流的速度, 而是改变了细胞之间距离 (图 1-2-9)。