

吉林大学研究生立项教材

临床检验诊断学

张桂珍 主编

进展



吉林大学出版社

吉林大学研究生立项教材

临床检验诊断学进展

张桂珍 主编

吉林大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

临床检验诊断学展/张桂珍主编. —长春: 吉林大学出版社, 2004

ISBN 7-5601-3025-9

I. 临... II. 张... III. 临床医学—医学检验
IV. R446.1

中国版本图书馆CIP数据核字(2004)第023516号

临床检验诊断学进展

张桂珍 主编

特邀责任编辑、责任校对: 白 明

封面设计: 孙 群

吉林大学出版社出版
(长春市明德路421号)

吉林大学出版社发行
长春市永昌福利印刷厂印刷

开本: 787×1092毫米 1/16

2004年4月第1版

印张: 19.625

2004年4月第1次印刷

字数: 465千字

印数: 1—700册

ISBN 7-5601-3025-9/R·29

定价: 29.00元

内容提要

本书主要介绍了临床检验诊断学学科理论与技术的进展。主要包括：

1. 密切结合临床检验诊断学理论与技术的新进展，重点介绍了酶学、肿瘤标志物、细菌学检测、临床免疫学检查、临床分子生物学、组织配型及亲子鉴定等内容。

2. 结合研究生学位论文研究及临床医学专业学位高层次人才培养的需求，系统介绍了流式细胞术应用进展，体视学定量分析技术在生物医学中的应用、PCR 技术、高效液相色谱分析等技术的应用。

3. 为了增加临床检验学知识系统性，进一步介绍了临床检验现代化，留取临床检测样本应注意的问题等内容。本书适合于高等医学院校高年级学生、硕士及博士学位研究生作为教科书，也可作为临床医务工作者提高业务水平的重要参考书。

前 言

随着现代科学技术的进步,临床检验诊断学理论与实验技术展现了日新月异发展的态势。人类基因组与基因组后计划的不断深入,电子计算机技术的日趋精湛,检验自动化水平的快速发展,使临床检验诊断学总体水平跃上了新的平台。相对于高速发展的临床检验诊断学理论与技术,医学专业学生的临床检验诊断学教学内容相对滞后,难以满足临床实际工作的需要,尤其对于研究生层次的临床检验诊断学教学,目前还没有一本较完善而系统的教材出版。为了更好地适应医学教育培养高层次人才的需求,在研究生层面较系统介绍临床检验诊断学新理论、新知识、新技术的进展,我们编写了这本《临床检验诊断学进展》研究生教材。本书共分十四章。包括流式细胞术在临床检验学中的应用进展、肿瘤标志物研究现状与展望、诊断酶学、PCR技术在临床检验中的应用、临床细菌学检查、细菌的耐药性检测、临床常用免疫学检查、组织配型技术及亲子鉴定技术进展、生物医学体视学定量分析技术应用进展、生物医药中的高效液相色谱分析、临床分子生物学概要、现代实验室离心技术、影响检验标本质量的因素及其控制、医学检验自动化的现状与展望。

根据研究生学位教育的培养目标需要,本书一方面重点介绍了肿瘤标志物、临床酶学、临床免疫学、临床细菌学检查等内容,另一方面考虑到研究生学位论文研究的需要,为了培养研究生实验室操作能力,掌握临床检验相关的新技术、新方法,较系统地介绍了流式细胞术应用进展、生物医学体视学定量分析技术应用、高效液相技术的应用、组织配型等以新技术为核心的章节。本书内容没有追求临床检验诊断学的覆盖面,而以进展较快、新知识点多的章节为重点内容,结合研究生教学需要,力求重点突出、内容精炼,旨在为研究生教学提供一本高质量的教科书,也为临床医生提供一本在临床实践中不可缺少的参考书。

本书编写过程中,疏漏之处在所难免,敬请广大读者予以指正。

目 录

| | |
|--------------------------------------|-------|
| 第一章 流式细胞术在临床检验诊断学中的应用进展 | (1) |
| 第一节 流式细胞术的基本原理 | (1) |
| 第二节 细胞参量和荧光探针 | (5) |
| 第三节 流式细胞术在免疫学中的应用 | (13) |
| 第四节 流式细胞术在临床血液学中的应用 | (19) |
| 第五节 流式细胞术在临床肿瘤学中的应用 | (24) |
| 第二章 肿瘤标志物研究现状与展望 | (39) |
| 第三章 诊断酶学 | (64) |
| 第一节 酶学基础 | (64) |
| 第二节 血清(浆)酶测定在临床诊断学中的应用 | (72) |
| 第四章 PCR 技术在临床检验中的应用 | (95) |
| 第一节 PCR 技术的基本原理与典型操作 | (95) |
| 第二节 PCR 条件的优化 | (97) |
| 第三节 模板 DNA 样品的处理 | (101) |
| 第四节 PCR 技术的种类 | (104) |
| 第五节 PCR 技术在医学上的应用 | (107) |
| 第六节 PCR 技术存在的主要问题及解决的办法 | (111) |
| 第五章 临床细菌学检查 | (115) |
| 第一节 标本的采集与培养方法 | (115) |
| 第二节 临床常见的致病菌检查 | (119) |
| 第六章 细菌的耐药性检测 | (129) |
| 第一节 临床常见的抗生素 | (129) |
| 第二节 抗生素敏感试验 | (133) |
| 第三节 抗生素的耐药 | (136) |
| 第七章 临床常用免疫学检查 | (141) |
| 第一节 免疫活性物质与体液免疫 | (141) |
| 第二节 补体和免疫复合物 | (144) |
| 第三节 自身免疫 | (147) |
| 第八章 组织配型技术及亲子鉴定技术进展 | (154) |
| 第一节 概述 | (154) |
| 第二节 人类 MHC - HLA 系统 | (154) |
| 第三节 组织配型基础 | (156) |

| | | |
|-------------|--------------------------|--------------|
| 第四节 | 组织配型主要内容与实验方法 | (160) |
| 第五节 | HLA 抗原分型研究进展 | (165) |
| 第六节 | HLA 配型的临床意义 | (168) |
| 第七节 | 亲子鉴定技术及其进展 | (170) |
| 第九章 | 生物医学体视学定量分析技术应用进展 | (177) |
| 第一节 | 体视学的基本概念 | (177) |
| 第二节 | 生物医学体视学技术常用基本参数与测试系统 | (178) |
| 第三节 | 生物医学体视学定量分析的样本采集与方法 | (183) |
| 第四节 | 图像分析系统的原理和应用 | (185) |
| 第五节 | 体视学定量分析技术在教学中的应用 | (189) |
| 第六节 | 图像分析系统在诊断学中的应用 | (190) |
| 第七节 | 体视学定量分析技术在科研工作中的应用 | (191) |
| 第十章 | 生物医药中的高效液相色谱分析 | (199) |
| 第一节 | 概述 | (199) |
| 第二节 | 高效液相色谱图和基本参数 | (200) |
| 第三节 | 定性和定量分析 | (205) |
| 第四节 | 生物样品的预处理技术及 HPLC 柱的使用和维护 | (207) |
| 第五节 | HPLC 在生物学中的应用 | (209) |
| 第十一章 | 临床分子生物学概要 | (218) |
| 第一节 | 分子生物学的任务和发展趋势 | (218) |
| 第二节 | 人类基因组计划 | (219) |
| 第三节 | 基因的结构和功能 | (229) |
| 第四节 | 细胞凋亡 | (230) |
| 第五节 | 研究基因的方法和技术 | (235) |
| 第六节 | DNA 芯片技术 | (242) |
| 第七节 | 临床分子生物学研究现状与发展趋势 | (247) |
| 第十二章 | 实验室生物样品分离技术简介 | (256) |
| 第一节 | 层析分离法 | (256) |
| 第二节 | 离心分离技术 | (263) |
| 第三节 | 生物膜与细胞器的分离纯化法 | (270) |
| 第十三章 | 医学检验自动化的现状与展望 | (281) |
| 第十四章 | 影响检验标本质量的因素及其控制 | (296) |

第一章 流式细胞术在临床检验诊断学中的应用进展

流式细胞术是应用流式细胞仪,对流动的单细胞悬液进行测试的一项技术。它融合了激光、电子计算机、单克隆抗体、荧光色素化学、细胞化学染色等技术的优点,成为当代新技术的杂交体。流式细胞术在临床检验工作中的应用,从细胞分子层面提高了对疾病的辅助诊断、判定疗效及预后预测水平,开创了临床检验工作的新起点。

第一节 流式细胞术的基本原理

一、流式细胞术的概念

流式细胞术(flow cytometry, FCM)是对细胞或细胞器快速自动分析的高新技术。该技术利用流式细胞仪对生物颗粒(组织细胞)、微生物(细菌、病毒)及人工合成微球的多种物理和生物学特性进行定量分析,并能对特定细胞群体加以分选的细胞参量分析技术。FCM的基本工作原理为悬浮在液体中的分散细胞一个个依次通过测量区,每个细胞通过测量区时都将产生电信号,这些信号可以代表荧光、光散射、光吸收、细胞的组抗等。这些信号被测量、存储、显示,因而细胞的一系列重要物理特性和化学特性被快速地、大量地记录下来。这些特性可以是细胞的大小与活性、酶、抗原等。

流式细胞术的测量速度可达每秒数千乃至上万个细胞,它与显微镜的作用可以互补。显微镜可以研究组织的结构、细胞定位、荧光等在细胞中的分布;流式细胞仪主要用来测定单个细胞的总核酸、总蛋白。流式细胞仪还可以根据所规定的参量把指定的细胞亚群从整个群体中分离出来。FCM在当前的细胞生物学、免疫学、肿瘤学、血液学、遗传学、病理学、临床检验学等各领域用途十分广泛,主要应用于:

1. 细胞表型(cellular phenotype)分析,包括膜表面和膜内成分分析;
2. DNA含量及细胞周期分析(DNA content and cell cycle analysis);
3. 细胞分选(cell sorting)根据标记荧光抗体不同,选出单克隆细胞;
4. 自身抗体的检测等。

流式细胞仪的诞生经历了一个漫长的里程,早在1934年Moldavn首先描述了流式细胞仪的雏形,其装置让悬浮的红细胞从显微镜载物台上的一个毛细玻璃管中流过,每个通过的细胞可被光电装置记录下来,以后经长时间多学科科学家的不断改进与完善,使流式细

胞术从一个只能计数，稍后可测定粒子大小的仪器，发展到可快速定量测定同一个细胞的多种化学的和物理的特性，终于使集高科技于一身的流式细胞仪问世。

二、FCM 的工作原理

FCM 的工作流程总括起来分为荧光染色、液流技术、激光技术、数据处理四个部分。如原理图 1-1 所示：待测细胞被制成单细胞悬液，经特异性荧光染料染色后放入样品管中，在气体的压力下进入流动室。流动室内充满鞘液，在鞘液约束下，细胞排成单列由流动室的喷嘴喷出，形成细胞液柱。液柱与入射的激光束垂直相交，相交点称为测量区。通过测量区的细胞被激发产生荧光。在与入射光束和液柱垂直的方向放置光学系统（透镜、光阑、滤片和检测器等）用以收集荧光信号。图中的阻断滤片用于阻挡激发光，二色性反射镜用于选择被测荧光波长，荧光检测器是光电倍增管（PMT），散射光检测器是光电二级管，用来收集前向角散射光（FSC）。

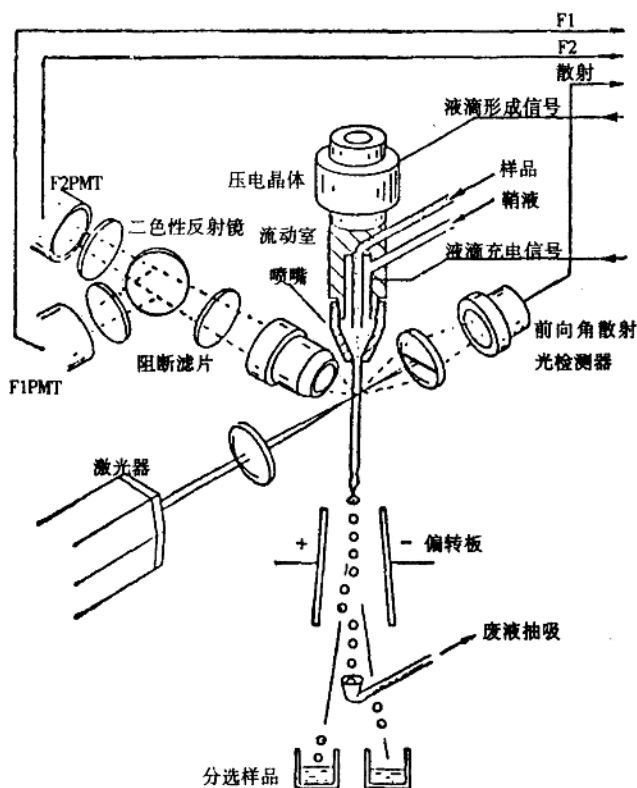


图 1-1 流式细胞术工作原理

图 1-2、图 1-3、图 1-4、图 1-5、图 1-6 分别为流式细胞仪测定外周血白细胞时荧光屏显示的图象及流式细胞术部分数据表示方法。

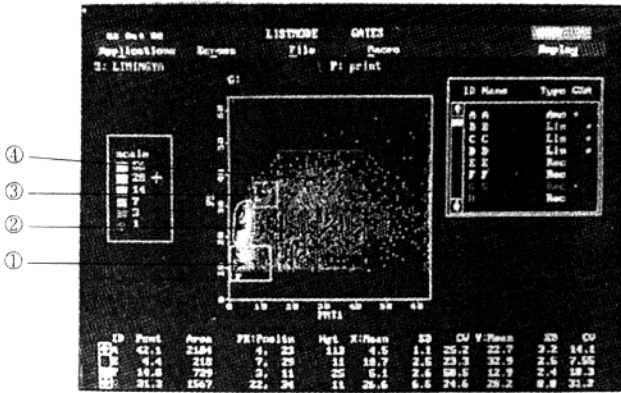


图 1-2 用前向角散射对侧向角散射设门分析外周血白细胞,可将细胞分成 4 群
1. 细胞碎屑; 2. 淋巴细胞群; 3. 单核细胞群; 4. 中性粒细胞群

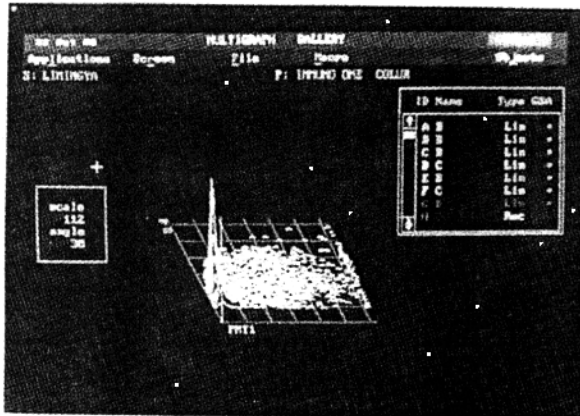


图 1-3 流式细胞术假三维图分析

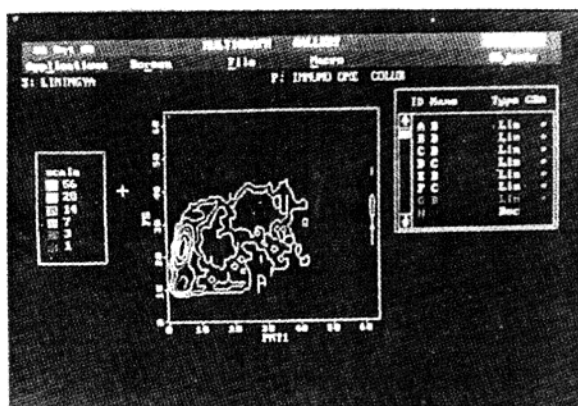


图 1-4 流式细胞术等高图分析

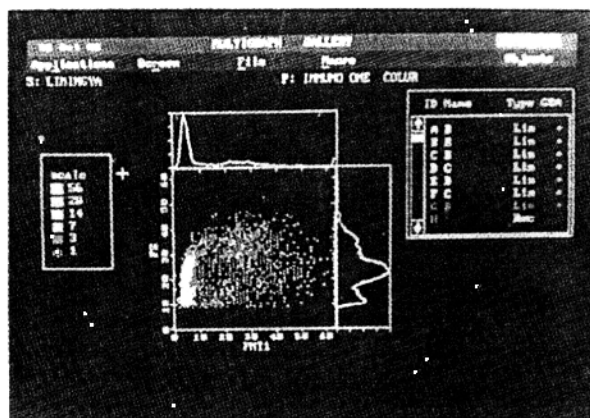


图 1-5 外周血白细胞群及其对应纵横坐标直方图分析

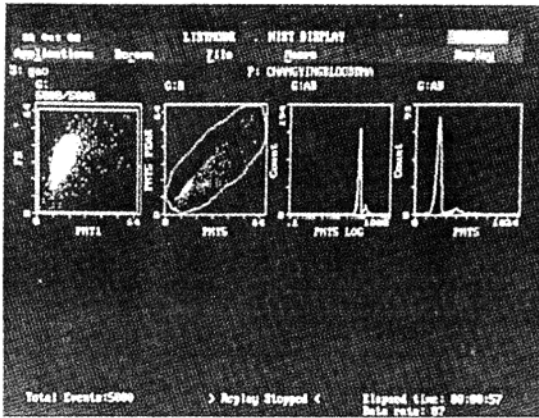


图 1-6 小鼠脾细胞周期分析

三、细胞分选工作原理 (cell sorting)

液滴形成信号的频率约 30KHz，此信号加在压电晶体上使之产生同频的机械振动，引起流动室的振动使液柱断裂形成均匀液滴（3 万个/秒）。细胞通过喷嘴的速度 2000 个/秒，每 15 个液滴中只有一个液滴包有细胞，如果其特性与要被进行分选的特性相符，则仪器在这个被选定的细胞刚形成液滴时则给液柱充以指定的电荷，未被选定的细胞形成的液滴及不包含细胞的空白液滴不被充电，也不带电荷。故带有电荷的液滴向下落入偏转板的高压静电场时，依所带电荷符号向左偏转或向右偏转，落入指定的收集器（细胞克隆化）。

以上整个仪器系统由电子电路和计算机控制，用以收集、显示、分析、储存被测定的各种信号及控制细胞的分选收集。

第二节 细胞参量和荧光探针

流式细胞术能够测量细胞的很多参量，被测的细胞参量可分为两类；一类是内部参量，指不用任何荧光探针标记就可测得的细胞参量；另一类是外部参量，指需要加荧光探针标记就可测量的细胞参量。同时又可可将细胞参量分为结构参量和功能参量，结构参量描述细胞的形态特征和化学组成，功能参量描述细胞的理化特性。综合这两种分类，称为对细胞参量的二维分类。

测量细胞的外部参量必须用荧光探针进行标记。荧光探针（即荧光染料）是探测细胞内结构和功能的非常灵敏的工具。表征荧光探针最常用的参量为激发波长、发射波长、消光系数、量子产额以及探针对于微环境时的 pH 值、极性、电荷和离子强度的敏感性等。

由于荧光探针发射的荧光强度与消光系数和量子产额的乘积成正比,所以理想的荧光探针应具有较大的消光系数和较高的量子产额。本节主要介绍一些流式细胞术中常用参量所需的荧光探针。

一、测试 DNA 和 RNA 含量荧光探针

DNA 含量在细胞内所有参量中比较恒定。在细胞周期内, DNA 含量随各时相发生周期性变化。如果 DNA 含量发生微小的异常变化,则有可能导致恶性肿瘤的产生。所以,运用荧光探针对细胞进行 DNA 含量测定,既可应用于对细胞周期的理论研究,又可为临床对恶性肿瘤等的诊断、治疗和预防提供信息。

实验表明,仅用 DNA 一个参量,不能区别静止期细胞(G₀)和 G₁ 期细胞,因为它们的 DNA 含量都是 2 倍体,但是引入 RNA 和 DNA 两个参量后,就可以进行鉴别。测量细胞内 RNA 含量的另一重要应用是检测和计数血液中的网织红细胞。这是根据在红细胞群体中,随着红细胞的成熟, RNA 含量逐渐减少;而在不成熟的红细胞中, RNA 较多。

碘化丙啶(Propidium iodide, PI)和溴化乙啶(Ethidium bromide, EB)都是嵌入到双链 DNA 和 RNA 的碱基对中与之结合,无碱基特异性。为了获得特异的 DNA 分布,染色前必须用 RNA 酶处理细胞,排除双链 RNA 的干扰。PI 和 EB 的另一特点是不能进入完整的细胞膜,因此可用来鉴别死细胞与活细胞。

PI 和 EB 的各种理化特性都类似。但是由于 PI 比 EB 的发射光谱峰向长波方向移动,因而在作 DNA 和蛋白的双参数测量时,PI 的红色荧光和 FITC 的绿色荧光更易于区分和测量。而且用 PI 比 EB 测得的 DNA 分布的变异系数(CV 值)低,所以 PI 得到了更广泛的应用。常用的 PI(或 EB)的染色程序:

首先用 70% 的冷乙醇固定细胞,固定方法是将各种来源的生物学样品,例如单层培养细胞、实体组织或者石蜡包埋组织首先制备成单个细胞或细胞核悬液,然后在 200 g 下离心 5 ~ 10 分钟去除上清液,将余下的约 0.5 ml 细胞悬液搅匀,用细滴管或注射器将此细胞悬液迅速喷射到已经在 4℃ 预冷的 70% 乙醇中(另一方法为将 70% 的冷乙醇边往细胞悬液中倒,边搅匀),然后保存于 4℃ 冰箱中,至少固定 18 小时。调整上述细胞悬液至浓度为 10⁶ 细胞/ml,取 1ml 细胞悬液,用 PBS 离心,洗 2 次,弃上清液后余下 0.5ml,加入 RNA 酶 A(每样品约加 3000 活性单位),37℃ 水浴中孵育 30 分钟后,立即放入冰浴中停止 RNA 酶 A 作用,这时加入 1.5ml PI 染液(50ug/ml)进行 DNA 染色,样品被保存在冰浴中暗处至少 30 分钟。上机前,用适当孔径的尼龙网过滤。其中 PBS 为 pH7.4、无钙镁离子的磷酸缓冲液, PBS 的成分(后面到提到的 PBS,如不特别标明,与此相同)为: 8.0g NaCl 0.2g KCl 0.2g KH₂PO₄ 1.15g Na₂HPO₄(或者 2.9g Na₂HPO₄·12H₂O)蒸馏水 1000ml。

图 1-7、图 1-8 示流式细胞术分析 DNA 含量及细胞凋亡。

二、测试 DNA 碱基组成荧光探针

双链 DNA 的碱基对结构受到所组装分子碱基组成的约束,腺嘌呤(A)残基数应等于胸腺嘧啶(T)残基数,鸟嘌呤(G)残基数应等于胞嘧啶(C)残基数。在各物种中,(A

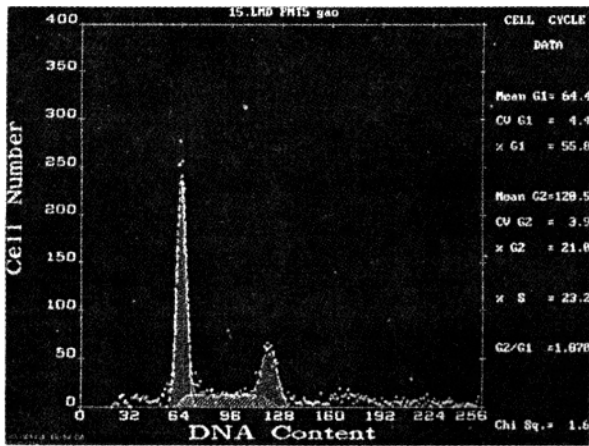


图 1-7 大鼠肝细胞 DNA 含量分析

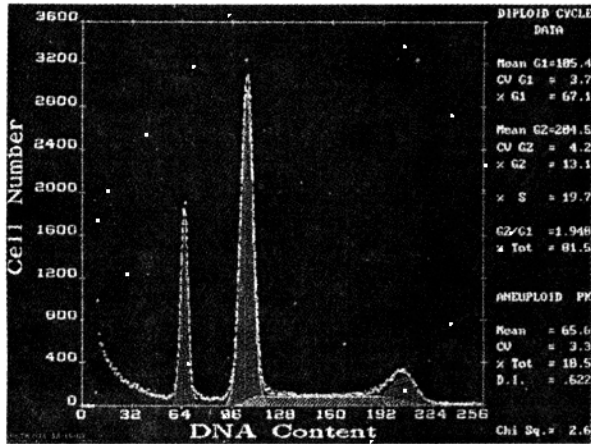


图 1-8 细胞凋亡分析,第一个小峰代表细胞凋亡峰

+T) 对于 (G+C) 的比例是不同的。在人类细胞中, 这个比例接近 1, 而在细菌中这个比例是有变化的。由于 HO (Hoechst) 特异地和 AT 碱基对结合, CA₃ (Chromomycin A₃, 色霉素 3) 特异地和 GC 碱基对相结合, 因此利用 HO/CA₃ 双染可以分析 DNA 的碱基组成。

美国劳伦茨·利维摩尔国家实验室首次利用双激光流式细胞术分析人类染色体的核型, 他们用 351~364nm 的紫外光激发 AT-Hoechst (HO), 产生蓝色荧光, 以 458nm 的蓝光激发 GC-Chromomycin (CA₃) 产生黄色荧光。Van Dilla 等用这种方法测定不同种细菌 DNA 的碱基组成。他们的制备程序为: 将细菌在 70% 的冷乙醇中固定, 细菌浓度为 10⁸ 个/ml。取少量固定好的细菌加至染液中, 染液组成:

- 3 μ M HO33258
- 10 μ M CA₃
- 10mM Tris (pH7.2)

150mM NaCl

1.5mM MgCl₂

细菌终浓度为 2×10^7 个/ml, 染色后即可进行流式测量。以 DNA 碱基组成为指标, 能很好地区别不同种类的细菌, 这种方法可为临床实验室中识别尿或痰中的细菌开辟广泛的应用前景。

三、测试染色质结构荧光探针

Darzynkiewicz 和他的同事们用流式细胞术作了大量染色质结构的工作。他们首先用 RNA 酶 A 处理细胞, 除去 RNA, 然后用酸变性或者热变性等方法使 DNA 部分变性。变性的部分由双链变成单链。丫啶橙 (Acridine orange, AO) 标记后, 凡是已变性的单链核酸由发绿色荧光变为发红色荧光, 所以红色荧光的强度说明染色质变性的程度。由于细胞周期各时相中, 染色质的凝集程度不同, 经酸或热处理后, 变性程度也不同, 染色质越凝集, 对酸和热变性越敏感。他们用这种方法区分出了细胞周期各时相如 G₀、G₁、S、G₂ 和 M 期细胞。

AO 酸变性的程序为: 首先配制 AO 贮液、A 液和 B 液。

AO 贮液浓度为 1mg/ml, 在蒸馏水中;

A 液由 0.1M HCl 和 0.1M KCl 组成, pH 1.4;

B 液由 8μg/ml AO、0.2M Na₂HPO₄ 和 0.1M 柠檬酸组成, pH2.6。

以 70% 冷乙醇在 4℃ 固定细胞至少 12 小时, 离心洗细胞后, 将细胞沉淀重新悬浮在 PBS 缓冲液中 (PH 7.4), 细胞浓度为 10⁶ 细胞/ml。在室温下, 取 0.2ml 细胞, 加入 0.5ml A 液, 30 秒后立即加入 2ml B 液, 染色 2 至 10 分钟, 立即进行流式分析。

四、测试细胞总蛋白含量荧光探针

测定总蛋白含量能够检测一个细胞群体生长和代谢的状态, 也可以区别任何不同蛋白含量的细胞亚群, 如血液中的白细胞。

FTTC (Fluorescein isothiocyanate, 异硫氰基荧光素) 是检测总蛋白最常用的荧光探针。它是酸性染料, 以共价键方式结合到蛋白的带有正电荷的基团上, 以蓝光激发后, 发出明亮的绿色荧光。

FTTC 的贮液以浓度 1mg/ml 制备在纯乙醇中, 使用时用 PBS (PH 7.4) 稀释成所需工作液。FTTC 和 PI 对固定细胞的总蛋白和 DNA 双染的方法是: 将固定的细胞悬浮在含有 18μg/ml PI, 0.05μg/ml FTTC 和 40μg/ml RNase 的 PBS 液中, 室温下至少染 20 分钟后, 进行流式分析。

FTTC 不能穿过活细胞的膜, 若丹明 640 (Rhodamine640) 能对活细胞的蛋白进行染色, 使用浓度为 1~5μg/ml, 若丹明 640 最大激发峰为 582nm, 最大发射峰为 601nm。

五、抗体和其它分子的共价标记荧光探针

以共价键结合的荧光染料 FTTC 既能标记细胞内总蛋白, 又能更广泛地标记各种特异性配体。这些配体是能不同的细胞结构强而特异地结合的各种大分子和小分子, 如蛋

白、多聚核苷酸、脂类以及其他生物分子。被标记的特异性配体能够探测很多种细胞结构和功能的参量。例如：被标记的外源凝集素可检测细胞表面糖蛋白；被标记的抗体可检测表面抗原；被标记的多聚阳离子可检测表面电荷，被标记的激素、生长因子、神经递质和病毒等可以检测细胞受体；被标记的大分子、微生物或者塑料微球可检测细胞的内吞性；被标记的 BrdU 单克隆抗体可检测细胞的 DNA 合成；用荧光素标记的亲合素以及用带有 dUTP 的生物素衍生物 DNA 探针与靶 DNA 杂交能够检测原位的特殊基因。用这种技术，能够追踪感染的原因、致癌基因、基因缺陷，有助于发展原位杂交的程序和进行染色体分析。总之，利用荧光探针标记各种配体的方法是研究活细胞、死细胞和组织中的抗原、基因和各种生化过程的有力手段。

对于抗体和其它配体分子共价标记的荧光探针除 FITC 外，近年来又发展了很多新的荧光探针，它们的一些理化特性和结构式列于表 1-1 中。

表 1-1 对抗体和其他配体分子共价标记的荧光探针

| 染料 | 分子量近似值 | 消光系数 | 吸收峰 (nm) | 发射峰 (nm) | 量子产额 |
|--------|---------|-----------|-------------|----------|------|
| B-藻红蛋白 | 240 000 | 2 410 000 | 545 565 | 575 | 0.98 |
| R-藻红蛋白 | 240 000 | 1 960 000 | 490 545 565 | 578 | 0.80 |
| C-藻青蛋白 | 224 000 | 1 600 000 | 620 | 650 | 0.51 |
| 别藻青蛋白 | 104 000 | 700 000 | 650 | 660 | 0.68 |
| R-藻青蛋白 | 103 000 | 760 000 | 555 618 | 634 | 0.7 |
| FITC | 390 | 80 000 | 495 | 525 | 0.5 |
| 四甲基若丹明 | 444 | | 555 | 582 | |
| X-RITC | 547 | 795 000 | 582 | 601 | 0.2 |
| 德州红 | 625 | 84 000 | 596 | 615 | 0.51 |

FITC 是最常用的荧光共价标记物，它的一些特性已经在总蛋白含量中叙述。此外，它易溶于水，很容易共价联结在抗体、外源凝集素、抗生物素蛋白、激素、脂类、蛋白类似物以及其他生物分子上，每个被标记分子可标记 2~8 个荧光素分子。FITC 有较高的消光系数和量子产额（在蛋白中为 0.5），适用于氩离子激光器的 488nm 谱线激发。其缺点是所发射的荧光强度与 pH 有关，当 pH 低于 8 时，荧光显著下降。另一个问题是 FITC 的激发波长处于产生自发荧光的光谱区，所以 FITC 荧光受到自发荧光的干扰。自发荧光是当受光激发时，未染色的细胞本身所发的荧光。FITC 荧光主要受细胞内核黄素自发荧光的影响，测量时必须排除。

另一种常用的共价标记探针是若丹明。若丹明比 FITC 光稳定性好，在生理条件下对 pH 变化不敏感，其荧光受细胞的自发荧光干扰较小。缺点是不易溶于水，使其偶联配体后荧光的量子产额较 FITC 低。TRITC (Tetramethylrho damine isothiocyanate, 四甲基异硫氰基若丹明)、XRITC (Rhodamine X isothiocyanate, 异硫氰基若丹明 X) 和 Texas Red (德州红) 都是若丹明的衍生物，是常用的共价标记探针。FITC 和 TRITC 是最早使用的一组双标记配体的荧光探针，前者发绿色荧光，后者发红色荧光。但是由于 FITC 与 TRITC 的量子产额不匹配，(FITC 远大于 TRITC)，以及它们之间光谱范围有较多交叉，容易产生能量转移，因此以后又发展了 XRITC 和 Texas Red。当用 FITC 和 XRITC 或者 FITC 和 Texas Red 作双标记工作时，选用合适的两组激光光源和滤片系统，可使两种信号之间没有多少光谱交叉。

但也存在一些问题,例如由于 XRITC 的疏水特性,使其偶联的蛋白不易溶解,并且未与蛋白结合的染料也不易被洗掉。Texas Red 有纯化抗体的倾向,造成荧光信号较弱,现在多采用 Texas Red 标记抗生物素蛋白,这种标记物与生物素偶联的抗体有极强的亲合力。

六、测试细胞活性的荧光探针

流式细胞术常采用两类荧光探针判断细胞的死活,一类是能透过活的细胞膜进入细胞的分子,如 FDA (Fluorescein Diacetate, 二醋酸酯荧光素);另一类是不能透过活细胞膜进入细胞中,但能对固定的细胞、膜有缺损的细胞核进行染色的荧光探针,如 PI 或 EB。所以可通过这两类荧光探针判断细胞的死活。

FDA 是不带电荷的酸溶性分子,所以很容易透过细胞膜。FDA 本身不发荧光,但进入细胞后,被细胞内非特异性酯酶水解后,释放出能发黄绿色荧光的荧光素分子。如果细胞膜是完整的,这些荧光素分子被活细胞所俘获,发出黄绿色荧光;如果细胞有损伤,荧光素分子将从细胞内流失掉,不发荧光。检验方法为:先配制溶于丙酮 0.5% 的 FDA 贮液,由于这种贮液极易挥发,应迅速配成 1:1000 的 FDA 工作液(在 PBS 中),检查细胞活性时以 10 μ l FDA 工作溶液加至 100 μ l 细胞悬液中,细胞悬液浓度为 1 \times 10⁵ 细胞/ml ~ 1 \times 10⁷ 细胞/ml,以蓝光激发,观察细胞是否发射黄绿色荧光。

七、测试 DNA 合成的荧光探针

为了准确地测定一个细胞群体的动力学,不仅需要了解细胞的 DNA 含量,而且应了解 DNA 的合成率。流式细胞术采用 BrdU 单克隆抗体免疫荧光技术检测细胞 DNA 合成情况。BrdU (Bromodeoxyuridine, 溴脱氧尿嘧啶核苷)是胸苷的一种类似物,如果以 BrdU 处理细胞,BrdU 将代替胸苷参与 DNA 合成。再用 FITC 或者其它荧光探针标记的 BrdU 单克隆抗体与已掺入 BrdU 的细胞孵育,那么 FITC 的黄绿色免疫荧光的强度就代表细胞内 DNA 合成的情况。

用双参数流式细胞光度术可以同时测定细胞内总 DNA 含量和 DNA 合成。一个参数用 PI 标记 DNA,发红色荧光;另一个参数用 FITC 标记的 BrdU 单克隆抗体探测细胞内 DNA 合成,发黄绿色荧光,其简要的染色制备步骤为:

1. BrdU 掺入细胞
2. 固定细胞
3. RNA 酶消化
4. 提取组蛋白
5. 一抗孵育
6. 二抗孵育
7. PI 染色
8. 流式细胞术分析。

八、测试细胞膜电位的荧光探针

由于细胞膜上各种泵的作用,例如钠钾泵、钙泵等,使细胞膜内外维持着不同离子的