



流式细胞术入门及 平台化管理

李妍 / 编著

 吉林 大学 出版社

流式细胞术入门及 平台化管理

李妍 / 编著

吉林大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

流式细胞术入门及平台化管理 / 李妍编著. — 长春:
吉林大学出版社, 2012.8
ISBN 978-7-5601-9020-4

I. ①流… II. ①李… III. ①细胞 - 生物样品分析 - 定量分析
IV. ①Q2-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2012)第206355号

书 名: 流式细胞术入门及平台化管理

作者: 李妍 编著

责任编辑: 王丽 责任校对: 曲楠

吉林大学出版社出版、发行

开本: 880×1230毫米 1/32

印张: 4.75 字数: 160千字

ISBN 978-7-5601-9020-4

封面设计: 高延灵

吉林市海阔工贸有限公司印刷

2012年10月 第1版

2012年10月 第1次印刷

定价: 16.50元

版权所有 翻印必究

社址: 长春市明德路501号 邮编: 130021

发行部电话: 0431-89580026/28/29

网址: <http://www.jlup.com.cn>

E-mail: jlup@mail.jlu.edu.cn

前 言

流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 也称流式细胞分析, 是用流式细胞仪 (flow cytometer) 来对细胞 (或其他微粒) 进行分析或分选的技术。FCM 涉及多种现代高科技技术, 包括电子、激光、计算机、流体力学、单克隆抗体等; 并综合运用了免疫学、血液学、细胞生物学和分子遗传学等多学科知识; 具备短时间内同时分析多种参数的独特功能, 并可对感兴趣的细胞进行分选。历经 40 年发展, 流式细胞仪不断更新、换代, 而 FCM 应用也不再局限于血液学、免疫学和临床检验等传统医学领域, 生物学、药理学和环境科学等学科也广泛采用该技术。除膜分子外, FCM 还可进行如下项目检测: 细胞周期、细胞凋亡、线粒体膜电位、细胞内活性氧、钙离子、锌离子和细胞内 pH 值等。上述项目不仅可由配多个激光器的大型流式细胞仪完成, 单激光台式机或个人机也可准确、快速地完成分析。

伴随我国经济发展和教育投入的增加, 流式细胞仪越来越多地落户到普通高等院校; 而多数院校在引进流式细胞仪后, 通常安排专门技术人员负责仪器的日常维护、标本检测 and 数据分析。我校以“流式细胞术与免疫学开放实验平台”(以下简称“开放实验平台”) 为载体, 对流式细胞仪等大型仪器实行平台化管理, 为本校和其他单位科研工作者提供便利的预约服务。不仅“开放实验平台”的管理方法、技术人员水平对 FCM 检测服务有影响, 普通实验者能否提供合格样品也直接影响实验的结果。在 FCM 分析前, 普通实验

者需要熟悉标本制备的正确方法；在分析后能准确描述所获得的实验数据。然而在样品准备过程中，未接受过培训的普通实验者经常出现各种问题，并因此无法获得准确数据。在我校图书馆多位同志协助下，著者检索了近5年医学、生物学和药学领域的优秀硕士、博士学位论文，选择上述论文中应用频率高的FCM分析项目，分别在9个章节中详细介绍。著者按照“实验目的与原理”、“试剂与器材”、“实验步骤”、“基本方案和数据分析”等板块，详细介绍常用检测项目。并将工作中的经验体会写进“注意事项”板块，供读者参考。本书适合医学、生物学和药学领域的研究生，参与科学研究的高年级本科生及从事基础和临床医学研究的实验人员，作为他们学习FCM的入门读物。

在科教兴国战略指导下，“十五”和“十一五”期间我国高等教育得到迅速发展，教育质量和人才培养是实现我国中发展规划的重要保证。流式细胞仪等大型仪器是高等院校宝贵的教育资源，重视科研与教学相结合，不仅能推动科研进展，还能让科研人员和科研资源在学生综合能力培养中发挥作用。医学检验、药学和食品质量与安全专业均为我校重点发展的特色专业，实践性强是3个专业的共同特点。著者及教学团队以开放实验平台为载体，通过“本科生科研见习”和“本科生创新实验设计”等模式，丰富3个专业的课外实践教学。同时，通过校企合作计划和研究生合作培养等途径扩大开放实验平台的影响力，提高服务水平。

我校教务处、科研处和国有资产管理处等上级管理部门对开放实验平台给予大力支持：为技术人员提供进修学习机会，对我们每

一阶段的尝试提供指导、给予鼓励。今后工作中，我们将不断探索，让先进仪器和实验技术更好地为科学研究服务；继续坚持教学与科研相结合，让开放实验平台继续成为学生汲取营养的源泉。

感谢我校图书馆于秀芬馆长、郭秀梅副馆长，及王春晓和种艳秋等优秀馆员，她们以专业的检索协助作者精选 FCM 项目。

本书在编写过程中还得到贝克曼公司专家刘晓东先生、李炜女士，碧迪公司专家侯立华先生的大力支持，他们为部分内容提供了宝贵的修改意见。也感谢他们的理解和支持，让我们顺利开展了“开放实验平台为本科生培养服务”的初步尝试，即本科生适当学习免疫学的新进展、见习高端仪器的使用、阶段性参与教师科研活动。

虽然力求内容准确，但著者的理论水平和实验技术均有限，书中存在缺点和错误在所难免，肯请各位专家和广大读者批评、指正。

目 录

第一章	流式细胞术原理.....	1
第二章	单细胞样品制备.....	15
第三章	细胞周期分析.....	25
第四章	免疫荧光标记与膜分子分析.....	42
第五章	细胞内蛋白检测.....	56
第六章	细胞增殖分析.....	73
第七章	细胞死亡分析.....	83
第八章	线粒体损伤检测.....	109
第九章	细胞内离子的检测.....	123
第十章	FCM 平台化管理探索.....	134
附录 1	常用标记蛋白的荧光染料.....	142
附录 2	常用标记核酸的荧光染料.....	142

第一章 流式细胞术原理

第一节 流式细胞仪的工作原理

流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 也称流式细胞分析, 是用流式细胞仪 (flow cytometer) 来对细胞 (或其他微粒) 进行分析或分选的技术。FCM 涉及多种现代高科技技术, 包括电子、激光、计算机、流体力学、单克隆抗体等, 并综合运用了免疫学、血液学、细胞生物学和分子遗传学等多学科知识。具备短时间内完成多参数分析的独特功能, 并可对感兴趣的细胞进行分选。虽然不同流式细胞仪有其特殊的结构, 但基本结构相同, 均具有液流系统、光学系统和电子系统, 分选型流式细胞仪还具有分选装置。流式细胞仪分析和分选功能涉及流体力学、光学原理和光电转换等原理, 并需要分析软件来处理数据。

一、流式细胞仪的基本组成结构

(一) 液流系统

液流系统由流动室 (flow chamber) 和液流驱动系统组成。流动室是仪器精密的部件之一, 其喷嘴口直径很小, 使细胞单个排列。在流动室内样品流由鞘液包绕, 流体聚焦效应使细胞沿轴心匀速流动 (图 1-1)。鞘液流和样品流分别由独立的驱动系统控制流速, 鞘液在液流系统中流速是不变的, 当增大样品流压力时, 细胞间距离缩短, 单位时间内流经激光照射区的细胞数增多。液流系统的作用

是把细胞传送到激光束中心，其理想的工作状态是特定的时间内，只有一个细胞或粒子被激光束照射。

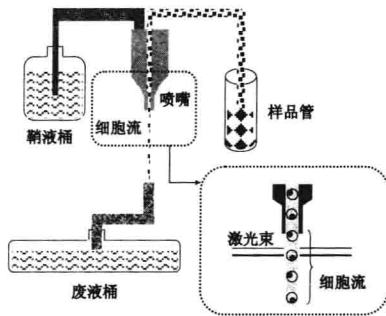


图 1-1 流式细胞仪液流系统示意图

(二) 光学系统

光学系统由激发光光源、光束成形器和光信号收集通道组成。

1. 激发光光源 气体激光器是目前应用最广的光源。氩离子激光器的激发光波长为 488nm (蓝激光器)，适合多种常用染料的激发，是流式细胞仪最基本的光源配置。一台仪器还可选配 635nm 的红激光器，405nm 的紫激光器和 355nm 的紫激光器等。

2. 光束成形器 光束成型器通常由两个交叉的圆柱形透镜组成，将激光束聚焦为宽 15 ~ 25 μm ，高 50 ~ 60 μm 椭圆形光斑。光斑的大小与细胞接近，为了保证样品中细胞所受到的光强度一致，需将样品流与激光束正交。台式机的光路通常在仪器安装时由工程师完成调试，使用者一般无需调试（也称固定光路）；而大型机和分选型流式细胞仪需使用者在工作前校准光路。

3. 光信号收集通道

光信号收集通道主要由多组透镜、光学滤片和小孔组成。其核心部件为选择性光学滤片，其中长通滤片 (long pass filter, LP) 只

允许特定波长以上的光通过；短通滤片（short pass filter, SP）只允许特定波长以下的光通过；而带通滤片（band pass filter, BP）则允许通过一定波长范围的光束（图 1-2）。不同荧光染料受激发后发射的不同荧光，分别由流式细胞仪的不同通道接受。

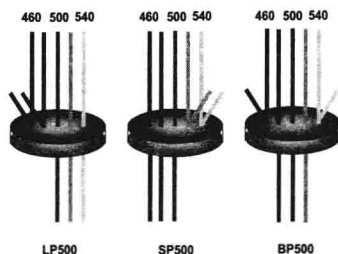


图 1-2 不同光学滤片的特性

（三）电子系统

电子系统由光电转换器、前置放大电路、模数转换电路和数据处理系统组成。每个荧光通道分配一个光电转换器，光电转换器的作用是将接收的散射光和荧光信号转换为电信号。单个细胞的散射光和荧光信号弱，因此要通过前置放大电路将其放大。信号放大的方式有两种，线性放大和对数放大。前者适用于 DNA 含量、RNA 含量和总蛋白含量等分析，而后者适用于细胞膜分子等免疫荧光信号的检测。模数转换电路将放大的模拟电压峰值（模拟信号）转换为数字信号，并以通道数（channels）来表示。数据处理系统主要包括电子计算机和各种应用软件。操作者通过软件完成样本检测、数据采集和结果分析。

二、流式细胞仪检测的信号

流式细胞检测的信号包括两类：散射光和荧光。

（一）散射光

激光束照射细胞时，光以相对小的角度（ $0.5^{\circ} \sim 10^{\circ}$ ）向前方

散射的光称为前向散射光(forward scatter, FSC/SS), 由设置在激光束前 $1^{\circ} \sim 6^{\circ}$ 方向的前向散射光检测器来检测。激光束照射细胞时, 细胞内颗粒成分使光束发生折射, 位于激发光轴 90° 方向的检测器所检测的光信号即为侧向散射光(side scatter, SSC/SS)。FSC 信号的强弱与细胞大小成正比; 而 SSC 由细胞内结构复杂性决定, 细胞内颗粒多、结构复杂则 SSC 信号强 (图 1-3)。

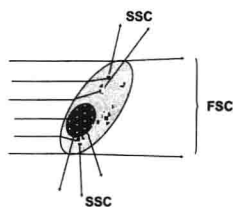


图 1-3 FSC 和 SSC 示意图

(二) 荧光信号

荧光 (fluorescence, FL) 信号通常由被检细胞上标记的特异性荧光染料受激发所产生, 常用的荧光染料及其特性见附录 1 和附录 2。混杂的荧光经多组滤光片分离, 可被筛选为不同波长的 FL 信号, 再由对应的荧光通道接收。EPICS XL/XL-MCL(BC 公司)流式细胞仪配备了 488nm 激光, 具有接受 FSC、SSC 和 4 组不同波长荧光的通道。荧光通道可按照波长或所检测荧光染料来命名, 例如 FITC(FL1)、PE (FL2)、ECD(FL3)和 PerCP(FL4)通道。但一个荧光通道可检测的荧光素不只一个, 除 ECD 外, FL3 通道还可检测 PI 和 7-AAD 等荧光素。

三、流式细胞仪分析原理

适当压力下, 鞘液包绕着细胞 (或其他微粒) 通过喷嘴进入流

动室；激发光照射到细胞上，光线发生散射和折射；标记于细胞表面或内部的荧光素被激发并发射出荧光。用检测器检测与激发光束成 90° 的 SSC、激发光束方向小角度 ($1^\circ \sim 6^\circ$) 偏转的前向散射光 FSC、以及不同波长荧光 (图 1-4)。仪器的电子系统将 FSC、SSC 和各 FL 信号转换为电信号 (模拟信号) 并进行放大, 再将模拟信号转换为数字信号, 以列表模式 (list mode, LSD) 和图型形式储存于计算机。其中, LSD 数据将每一个细胞的多个参数以列表方式存储。如每个细胞产生 FSC、SSC、FL1、FL2、FL3 和 FL4 参数, 为一组数据, 而 10 000 个细胞将产生 60 000 个数据, 但每组数据是关联的。采用分析软件对 LSD 进行单参数和多参数的组合分析后, 显示细胞的各种信息。

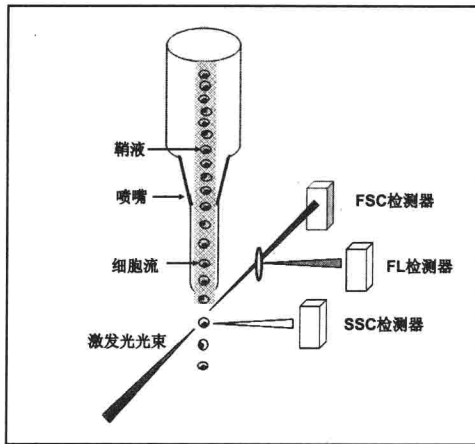


图 1-4 流式细胞仪光信号采集示意图

四、流式细胞仪分选原理

具有分选功能的流式细胞仪配有分选装置, 按工作原理, 流式分选可分为两种: 通道式分选和电荷式分选。通过分选可将符合特

定要求的细胞从混杂群体中分离出来，并进一步培养和研究。

（一）通道式分选

通道式分选的核心装置为机械控制的捕获管。在封闭的流动室内捕获管伸入液流，将符合要求的细胞吸入收集管，不符合要求的细胞流入废液桶。但由于机械惯性的影响，通道式分选速度较慢，这种方式已经被电荷式分选取代。

（二）电荷式分选

电荷式分选装置主要包括压电晶体、喷嘴、液流充电电路和高压电极板等部件。压电晶体位于流动室上端，通过高频电信号使液流产生同频震动并均匀断裂为稳定小液滴，一般每秒产生4万滴，每个液滴含有一个细胞或不含任何细胞。电荷式分选的原理：频震液流由喷嘴喷出，形成分离的液滴；充电电路由逻辑电路控制，对符合分选条件液滴（含目的细胞）充电；液滴经过喷嘴下方的两个高压电极板时，带电荷的液滴在电场中偏转，落入细胞收集管中，而不带电荷的液滴垂直落下，按废液收集（图1-5）。

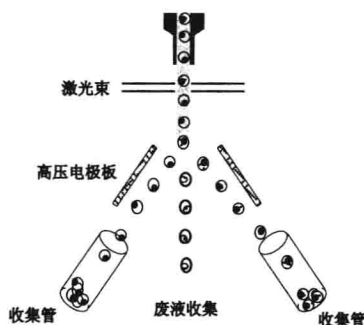


图 1-5 电荷式分选示意图

五、流式细胞术的应用范畴

(一) 流式细胞术分析对象

FCM 不仅可分析人或动物血液、骨髓中分散的单个细胞,也可分析实体组织经消化处理后所形成的单个细胞。此外,植物细胞、细菌、病毒和人工合成微球等均可用 FCM 分析。不仅如此,当特制的微球包被上抗体、抗原和核酸等,可建立定量检测液体中或其他可溶成分的新技术。BD 公司最早建立了以荧光微球为载体的免疫测定技术 (microsphere-based immunoassay), 即流式微球阵列 (cytometric bead array, CBA) 技术。采用 CBA 技术,可实现在同一份样品中同时检测多种微量可溶性成分。

(二) 分析细胞多种生物学特性

1. 细胞膜分子

细胞表面的受体、配体、黏附分子和分化抗原 (cluster of differentiation, CD) 的表达,与细胞种类、分化发育阶段和功能状态密切相关。荧光素标记的单克隆抗体与细胞膜分子结合后,经 FCM 分析可显示阳性表达细胞的百分率;而细胞平均荧光强度可代表该膜分子在细胞表面分布的相对密度。

2. 细胞内分子

用非离子性去垢剂将细胞膜、内质网膜和核膜等“打孔”后,荧光素标记的单克隆抗体可进入细胞内,与细胞因子、细胞骨架蛋白和信号转导相关激酶等结合,再由 FCM 分析阳性细胞百分率和平均荧光强度。使用特殊的荧光探针结合细胞内的 DNA、RNA 和端粒序列后,即可采用 FCM 分析这些指标。

3. 细胞内离子和其他代谢产物

乙酸乙脂型的 Fluo-3、Fluo-4 和 Indo-1 等荧光指示剂可用于检测细胞内游离的钙离子；荧光染料 ZP1(zinpyr-1)可检测到细胞内低浓度的锌离子。细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 主要包括超氧自由基、过氧化氢和羟化物等。Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) 可进入活细胞, 被酯酶水解为 DCFH, 该物质被 ROS 氧化生成 DCF, 而 DCF 发射的荧光可采用流式细胞仪 FL1 (FITC) 通道来检测。

4. 细胞功能

应用 FCM 可精确区分坏死细胞、活细胞和凋亡细胞、检测细胞增殖及分析细胞杀伤功能和吞噬功能。亲阳离子的脂溶性染料 Rh123 等可与线粒体膜结合, 经 FCM 检测后分析线粒体膜电位。通过 FCM 检测细胞内染料和药物的蓄积情况, 则可分析肿瘤多药物耐药性。

5. 淋巴细胞表型分析

应用配套荧光素标记抗体可对淋巴细胞表面标志进行多参数分析, 并对外周血或骨髓的淋巴细胞表型做准确分析。例如, 表型为 $CD3^+CD4^+CD8^-$ 和 $CD3^+CD4^+CD8^+$ 淋巴细胞分别代表辅助性 T 细胞和杀伤性 T 细胞; $CD3^-CD19^+CD5^-$ 为 B2 型 B 细胞; $CD3^-CD16^+CD56^+$ 为 NK 细胞。读者可参看血液学、免疫学和肿瘤学等领域的文献或著作, 深入了解淋巴细胞亚群及表面标志的研究进展。

第二节 数据分析与显示方式

流式细胞仪在收集细胞时，同时记录细胞的多项目信息，以列表模式和图形模式储存。前者将每个细胞的各个检测参数以列表或矩阵方式存储，支持原始数据进行再处理和再分析，但文件体积较大；后者只能记录一次结果的图形数据，可用于显示或打印结果，不能进行再次分析。“设门”技术是建立 FCM 分析方案，进行数据分析的基本方法。多种分析软件可在仪器关机后，对保存的列表模式数据进行离线分析，便利地以图形和数值结合方式显示数据。

一、数据显示方式

(一) 单参数直方图

单参数分析时可采用单参数直方图 (histogram) 来显示实验结果 (图 1-6A)。图中的 X 轴代表某荧光检测通道的荧光或散射光强度，用通道数表示；通道数和转换前光信号强度呈对数或线形的对应关系；Y 轴代表检测通道内出现的具有相同光信号强度细胞的频度，即相对细胞数。在直方图内设门分析后，计算机可对选定区域的数据进行定性或定量分析，如区域内的细胞数目 (event/count)，门内百分比 (% gated) 和门内细胞占总检测细胞的百分比 (% total)，以及平均荧光强度 (mean)、细胞的荧光变异系数 (CV)、荧光强度中值 (median) 和峰值道数 (peak channel) 等。

(二) 二维点图

为了研究两个参数或更多参数间的关系，可用二维或三维散点图 (dot plot) 来显示结果。以双参数散点图为例，图中每个点代表一个细胞，该点在图中有两个参数值 (图 1-6B)。若把该图每个点分别投射到 X 轴和 Y 轴可分别得到两个直方图；但两个直方图无法反向转换为一个双参数散点图，因为双参数散点图中每个点联系着

两个参数的对应关系，而两个直方图则无法建立这种联系。多个参数间的关联是以列表模式数据储存的，所占存储空间大。因此，与流式细胞仪器联机电脑内不宜存放过多的数据，以免影响软件运行速度。

（三）等高线图

等高线图（contour plot）是把代表相同数目的点依次连接起来所形成密闭的曲线，类似地图中所使用的等高线，越往里面的曲线代表细胞数目越多，等高线密集的地方代表着细胞数目变化快（图 1-6C）。当细胞数目变化不大时，等高线间可设为等间距，便于观察局部；当细胞数目变化较大时，等高线间可设为对数间距，便于观察总体。采用软件可在等高线间加入伪彩，结果的显示则更直观。

（四）假三维图

假三维图（pseudo 3D plot）是在双参数图的基础上，用计算机软件将细胞数目设为 Z 轴，来立体展示不同二维参数的细胞分布情况（图 1-6D）。图中的一维不是参数而是细胞数目，因此仍为二维图，也称为假三维图。

（五）多参数组合分析

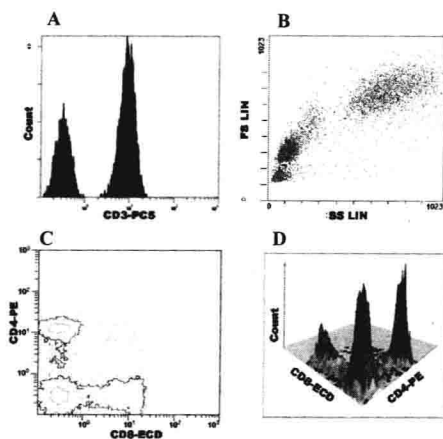


图 1-6 流式细胞术数据展示图