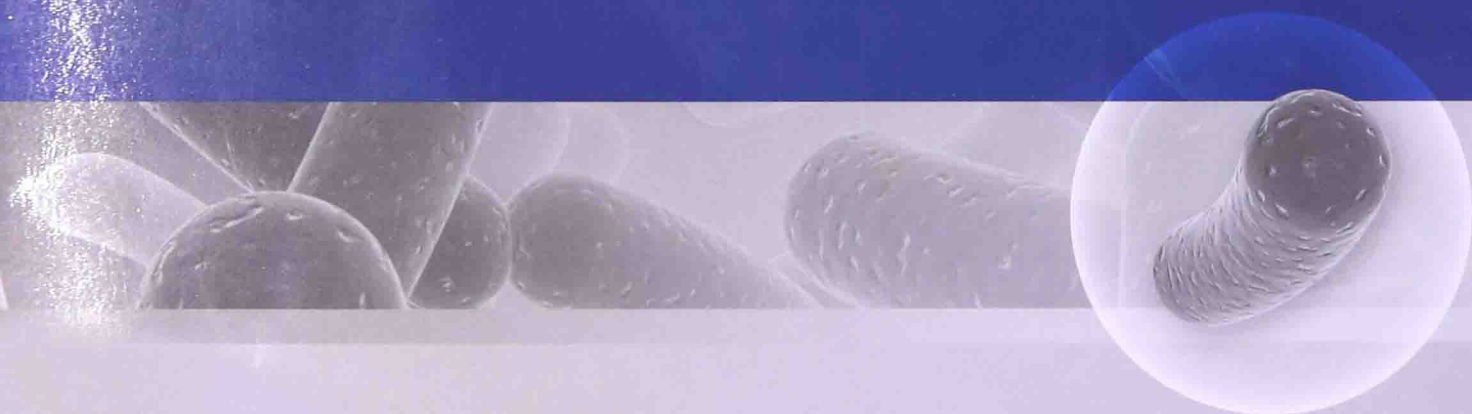



主编 吴长有

流式细胞术 的基础和临床应用



 人民卫生出版社

流式细胞术的基础和临床应用

主 编 吴长有

副 主 编 黄俊琪

编 委

曹雪涛 (中国医学科学院)

郑利民 (中山大学生命科学学院)

吴长有 (中山大学中山医学院)

黄俊琪 (中山大学中山医学院)

周茂华 (广东省人民医院)

池沛冬 (中山大学附属肿瘤医院)

欧阳涓 (中山大学附属第一医院)

韩晓燕 (中山大学附属第三医院)

编写秘书 王 慧 付笑迎 余思菲

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

流式细胞术的基础和临床应用/吴长有主编.—北京:
人民卫生出版社,2014.6

ISBN 978-7-117-18868-5

I. ①流… II. ①吴… 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(2014)第 068822 号

人卫社官网	www.pmph.com	出版物查询, 在线购书
人卫医学网	www.ipmph.com	医学考试辅导, 医学数 据库服务, 医学教育资 源, 大众健康资讯

版权所有, 侵权必究!

流式细胞术的基础和临床应用

主 编: 吴长有

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010-59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E-mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷: 潮河印业有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 22

字 数: 535 千字

版 次: 2014 年 6 月第 1 版 2014 年 6 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-18868-5/R·18869

定 价: 88.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: WQ@pmph.com

(凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换)

A grayscale micrograph showing several cells in a fluid environment. One cell in the upper right is particularly prominent, showing a clear nucleus and cytoplasm. The background is filled with other cells and structures, creating a textured, biological appearance.

前言

流式细胞术(flow cytometry, FCM)是利用流式细胞仪对单细胞或其他生物粒子进行定量分析和分选。流式细胞术综合运用电子、激光、计算机以及流体力学等方法,可在极短的时间内高速分析上万个细胞,同时从一个细胞中测得多个参数。与传统的荧光显微镜检查相比,具有速度快、精度高、准确性好等优点,成为当代最先进的细胞定量分析技术。更值得注意的是,流式细胞术可以从单细胞水平检测细胞的免疫表型特征及生物学功能的变化。近几年来,国内外对流式细胞术的发展做了不少的研究工作,目前人们逐步对流式细胞术所需要的样品的制备、标记方法及应用范围等进行了深入的研究。

早在20世纪30年代,Moldaven最早提出了使细胞检测自动化并试图使用光电仪记录流过毛细管的细胞。随后,科学家们研究并描述了一种全血细胞计数器装置,成为流式细胞仪的雏形。在1973年,斯坦福大学成功发明了世界上第一台流式细胞仪,从此流式细胞仪的研发及应用进入了飞速发展的时代。激光技术、喷射技术及计算机的应用使流式细胞仪在原理和结构上形成了固定的模式。20世纪80年代后,流式细胞仪逐渐商品化并提高了其硬件的更新速度。现在流式细胞术在免疫学、肿瘤学、血液学等领域中的广泛应用具有重要的意义。

在本书中我们分别阐述了流式细胞术的原理、技术以及方法等基础知识,进一步分析了流式细胞术及其分选技术在机体免疫功能、细胞周期、细胞凋亡等基础研究以及临床疾病中的应用和最新研究进展。在第一章中,我们介绍了流式细胞术的基本概念、基本结构、工作原理、常用的染色技术、流式结果分析方法以及流式检测的基本方法与技巧等,为深入了解流式细胞术的广泛应用提供了一定的理论基础。第二章重点阐述流式细胞术在基础研究如细胞群比例测定、细胞表型鉴定、细胞因子检测、细胞增殖及凋亡、细胞杀伤能力等方面的应用。鉴于流式细胞术在科学研究中的广泛应用,科学家们早在20世纪60年代末就提出了细胞分选的方法;在20世纪70年代初,Herzenberg研制出了细胞分选器的改进型,可以检测经过荧光标记抗体染色的细胞较弱的荧光信号。自流式分选技术发展至今,其技术也越来越成熟。在本章节中,我们重点介绍了流式分选术的概念及其应用,比较了流式分选与磁性分选的区别,阐述了流式分选术对于独立或非独立群体、低比例群体的细胞以及造血干细胞、间充质干细胞、肿瘤干细胞等的分选方法,为深入了解流式细胞分选技术提供了一定的参考。随着流式细胞术在研究领域的广泛应用,流式细胞分析也逐渐在临床疾病的诊断、检测与治疗中展现了重要的应用价值。第三章讲述了流式细胞术在临床疾病如感染性疾病、

血液系统疾病、阵发性睡眠性血红蛋白尿及强直性脊柱炎等自身免疫性疾病、肿瘤等多种疾病的检测与治疗中的广泛应用。对流式细胞术的应用价值的探讨有助于读者开阔视野,深入了解流式细胞术在临床疾病治疗中的应用价值,更好地建立起临床与科研之间的桥梁。

本书邀请了在相应研究领域具有丰富经验的专家教授及中青年科研工作者参与各个章节的编写,汇集了他们多年的工作经验和科研成果。各章节的内容对于科研工作和临床检测、治疗等有着重要的参考与应用价值;另外,本书中涉及的流式细胞术的检测技术与方法等可以为科研工作者提供一定的参考依据;书中各章节均配有相对应的图表说明,有利于读者更容易地理解和掌握流式细胞术的基本知识与技术方法。本书将流式细胞术的基础理论与临床应用相结合,体现了流式细胞术发展的历程及其最新的发展趋势。

本书在编写过程中,各章节的编写风格和重点不尽相同,在内容上也可能存在一定的交叉,望读者在阅读时从不同的角度了解流式细胞术的基本概念、检测方法、临床应用等方面。另外,书中可能存在一定的问题与不足,甚至错误之处,敬请读者、专家和同行们批评指正。

吴长有

中山大学中山医学院免疫学研究所

2014年4月



目 录

第一章 总论	1
第一节 流式细胞术与流式细胞仪概述	1
一、流式细胞术概述	1
二、流式细胞仪	2
(一) 基本结构	2
(二) 工作原理	3
(三) 分析型流式细胞仪介绍	6
(四) 分选型流式细胞仪介绍	9
第二节 荧光染料的选择与常用的染色技术	12
一、荧光染料的特性及其应用	12
二、常用的染色技术	16
(一) 细胞免疫荧光染色技术	16
(二) 核酸荧光染色技术	16
(三) 荧光微球捕获染色技术	17
第三节 结果分析与流式图	18
一、流式通道	18
二、流式直方图	18
三、流式散点图	19
四、流式等高线图	20
第四节 流式细胞术的基本操作与技巧	20
一、标本的采集、运送与储存	20
二、标本的处理	21
(一) 独立细胞样品制备	22
(二) 免疫器官样品制备	23
(三) 实体脏器样品制备	24
三、荧光素偶联抗体及其标记方法	24
(一) 荧光素与荧光素偶联抗体	24
(二) 样品封闭	26

(三) 荧光素偶联抗体标记	27
四、光电倍增管电压设定	28
五、对照的设置	28
(一) 阴性对照的设置	28
(二) FMO 对照	29
(三) 阳性对照的设置	29
六、补偿调节	30
(一) 补偿调节的原理	30
(二) 调节补偿的具体方法	30
(三) 三色和四色分析补偿调节方法	31
(四) 影响补偿大小的因素	32
七、阈值设定	33
(一) 减少样品中死细胞比例的方法	34
(二) 流式分析时区分死细胞和活细胞的方法	34
八、流式分选模式选择	35
(一) 纯度模式	35
(二) 得率模式 (富集模式)	36
(三) 单细胞模式	36
九、上样速度控制	36
(一) 流式分析速度控制	36
(二) 流式分选速度控制	36
十、分选设门基本原则	36
十一、流式分选基本步骤	37
第五节 方法学特点	38
一、单细胞分析	38
二、定量分析	38
三、快速性	39
四、准确性	39
五、特异性	39
六、可重复性	39
七、多参数分析	39
第六节 常见影响因素	40
一、温度	40
二、pH	40
三、荧光染料浓度	40
四、杂质	41
五、细胞固定剂	41
六、溶液黏度	41
七、其他因素	41

第七节 质量控制	41
一、室内质量控制	42
(一) 分析前对样本和试剂的质量控制	42
(二) 分析中仪器及检测过程的质量控制	43
(三) 分析后数据传输的质量控制	47
二、室间质量评价	47
(一) 国家卫计委流式检验室间质评	48
(二) 国际流式检验室间质评	48
第八节 新进展	48
一、不设门流式方法的应用	48
二、介绍几个较有用的组合	49
第二章 流式分析术及流式分选术的应用	51
第一节 流式分析术的应用	51
一、细胞群比例测定	51
二、机体免疫功能监测及细胞表型鉴定	55
(一) T 淋巴细胞及其亚群的检测	57
(二) B 淋巴细胞及其亚群的检测	85
(三) NK 细胞的检测及功能分析	87
(四) 树突状细胞的检测及功能分析	90
(五) 单核细胞的检测及亚群分析	100
(六) 中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞检测	103
三、检测细胞因子	106
(一) 胞内染色法检测细胞因子	107
(二) 胞内染色法与 ELISA 法比较	111
(三) CBA 法测定细胞因子	113
(四) CBA 法与 ELISA 法比较	116
四、检测细胞增殖	116
(一) 相对计数法	117
(二) CFSE 标记法	118
(三) BrdU 标记法	126
(四) 抗 Ki67 抗体标记法	129
五、检测细胞凋亡	133
(一) Annexin V/PI 双染色法	133
(二) SYTO/PI 双染色法	135
(三) 细胞 DNA 含量分析法	139
(四) 线粒体损伤检测法	140
(五) 活化的 Caspase-3 检测法	141
(六) 荧光素偶联的 Caspase 抑制剂标记法	141

(七) 甲酰胺诱导 ssDNA 单抗检测法	143
(八) TUNEL 法	143
六、检测细胞周期	145
(一) 非特异性核酸荧光染料标记法	145
(二) 特异性细胞周期调节蛋白检测法	146
七、检测细胞杀伤能力	147
(一) 荧光测定法与流式细胞术	149
(二) 报告基因转染法	162
八、检测细胞吞噬功能	162
九、检测胞内活化的激酶	164
十、检测基因表达	166
(一) 染色体分选	166
(二) 数量 DNA 纤维作图	167
(三) 端粒长度检测	169
(四) GFP 报告基因系统	170
(五) lacZ 报告基因系统	172
(六) β -内酰胺酶报告基因系统	173
十一、检测钙相关分子	173
(一) 检测细胞内游离的钙离子水平	173
(二) 检测钙蛋白酶活性	174
(三) 检测细胞膜钙泵活性	175
十二、表观遗传学中的应用	177
(一) CHIP-ON-BEADS	180
(二) 检测细胞水平组蛋白修饰情况	181
十三、检测缝隙连接介导的细胞通讯	182
十四、检测细胞内 pH 和钠氢转运体活性	183
(一) 检测细胞内 pH	183
(二) 检测钠氢转运体活性	183
十五、细胞间及细胞与环境间相互作用	184
(一) 细胞迁移分析	184
(二) 细胞接触及黏附分析	187
十六、其他应用	188
(一) 检测活性氧簇	188
(二) 检测细胞内游离的锌离子水平	188
(三) 荧光共振能量转移结合流式细胞术检测两种蛋白质的直接结合	189
(四) 检测端粒长度	191
(五) 检测脂筏结合蛋白	192
第二节 流式分选术的应用	194
一、流式分选与磁性分选	194

二、流式分选独立群体细胞	198
三、流式分选非独立细胞群体	198
四、流式分选低比例细胞群体	199
(一) 强势细胞群的辐射影响	199
(二) 流式分选结合磁性分选	199
(三) 二次分选法	200
五、流式分选干细胞	201
(一) 流式分选造血干细胞	201
(二) 流式分选间充质干细胞	203
(三) 流式分选肿瘤干细胞	205
第三章 流式细胞术的临床应用	209
第一节 感染性疾病	209
一、微生物检验	209
(一) 荧光素偶联抗体检测法	209
(二) 抗体结合人工荧光微球检测法	213
(三) 微生物活性流式检测	215
(四) 人工微球荧光免疫试验检测抗体	217
(五) 荧光原位杂交流式检测法	217
(六) PCR 免疫微球法	218
(七) 原位 PCR 杂交流式检测法	219
二、AIDS 患者的免疫功能检测	219
(一) AIDS 发病与免疫系统	220
(二) AIDS 患者的免疫功能检测	223
第二节 血液系统疾病	226
一、机体造血功能监测	226
(一) 造血干细胞和造血祖细胞的分类检测	227
(二) 网织红细胞测定	229
(三) 网织血小板测定	231
二、机体凝血功能监测	232
(一) 血小板的形态、结构与功能	232
(二) 血小板流式检验现状	234
(三) 血小板精确计数	235
(四) 活化血小板测定	237
(五) 血小板膜糖蛋白检测	239
(六) 血小板微粒测定	241
三、白血病免疫诊断与分型	242
(一) 正常骨髓造血细胞分化成熟的抗原表达规律	242
(二) 白血病免疫诊断与分型的基本原理与意义	243

(三) 临床常见白血病类型的免疫诊断与分型要点	248
(四) 临床少见白血病类型的免疫诊断与分型要点	270
第三节 自身免疫性疾病的鉴别诊断	275
一、自身抗体的检测	275
(一) 红细胞表面相关免疫球蛋白的测定	276
(二) 粒细胞表面相关免疫球蛋白的测定	280
(三) 血小板表面相关免疫球蛋白的测定	285
二、强直性脊柱炎的鉴别诊断	291
(一) HLA-B27/HLA-B7 表达的测定	291
(二) HLA-B27/CD3 表达的测定	292
三、阵发性睡眠性血红蛋白尿与 PNH 克隆检测	295
(一) 红细胞表面 CD55 和 CD59 分子表达检测	297
(二) 白细胞表面 CD55 和 CD59 分子表达检测	298
(三) 白细胞的 FLAER 法测定	299
第四节 肿瘤临床中的应用	302
一、细胞周期与 DNA 倍体检测	302
(一) 细胞周期检测	302
(二) DNA 倍体检测	304
二、细胞凋亡检测	305
(一) PI 染色法	305
(二) Annexin V/PI 染色法	306
(三) 末端转移酶标记 (TUNEL) 法	306
三、肿瘤化疗多药耐药性监测	307
第五节 移植中的应用	309
一、干细胞移植	310
(一) 外周血干细胞移植	311
(二) 脐血干细胞移植	311
(三) 流式细胞技术在造血干细胞移植中的应用	312
二、骨髓移植	320
三、器官移植	321
(一) 流式细胞术交叉配型	322
(二) 同种异体抗体检测	323
(三) 移植术后免疫监测	325
第六节 超敏反应中的应用	326
一、IgE 的检测	326
(一) 速发型超敏反应	326
(二) 速发型超敏反应的机制	327
(三) 速发型超敏反应的检测	327
(四) 嗜碱性粒细胞流式细胞术检测	328

(五) 流式细胞术体外检测和识别药物过敏反应	328
二、促炎因子的检测	328
附录	330
附录一 临床常见流式检验指标的正常参考范围	330
附录二 临床流式细胞学检验技术相关名词	334
附录三 常用流式检验试剂的配制	335
附录四 流式细胞仪工作术语	337

流式细胞术也用于检测不属于细胞的一些颗粒,比如,病毒、细胞核、染色体、DNA 片段、乳胶颗粒。随着现代抗原抗体技术以及微球制备工艺的进步,流式也可对通过结合有抗体的微球捕获可溶性蛋白或细胞因子然后进行分析,这些都极大地拓展了流式的使用范围,使其不再仅仅局限于“细胞”的范畴之中。

4. 流式细胞仪检测颗粒大小 流式细胞仪检测时,颗粒在极细的液流中流经极窄的激光光斑,因此,颗粒的大小有限制。一般来说,分析型流式细胞仪检测的颗粒在 $0.5 \sim 50 \mu\text{m}$ 。有些特殊流式细胞仪配置小颗粒检测装置,提高检测灵敏度,可检测到小至 $0.1 \mu\text{m}$ 的颗粒。但分选型流式细胞仪,如 MoFlo XDP 可对光斑大小进行调节,通过选择不同大小的喷嘴,也能对花粉等大颗粒进行检测。

5. 流式细胞仪颗粒检测浓度 流式细胞仪检测的颗粒悬浮于缓冲液中,浓度为 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6 / \text{ml}$ 。这种浓度下,颗粒/细胞基本可单一流经检测区,每一个细胞发出的光信号被检测、收集并存储于数据文件,以待后续分析。

6. 颗粒发出的光信号 当颗粒在检测点被激光激发时,检测点周围的透镜收集来自于细胞的光学信号。分为两类信号:散射光信号和荧光信号。

有两类典型的透镜:一个在激光光束的正前方,另一个在与激光光束成直角的方向。在正前方透镜的前面有一个挡光条,大概 1mm 宽,挡住照射在液流上的激光。液流中颗粒折射的激光信号,只有偏离原方向角度足够大,且未被挡光条挡住,才能到达正前方的透镜及透镜后的检测器,这类信号即是前向散射光信号。而另一个与激光光束成直角的方向上的检测器检测到的则是颗粒对激光的散射光,这类信号即是侧向散射光信号。

荧光信号有两类:①自发荧光信号:有些颗粒(主要是浮游生物)有自然的背景荧光;②荧光染料被激发:样本制备时标记了荧光染料,荧光染料吸收一定波长的激发光源的光后进行能级跃迁,然后释放出另外一种波长的光(即荧光,通常波长比激发光长)。

荧光染料可连接在抗体上,这时一个细胞上的荧光反映的是结合了抗体的蛋白/抗原总量;染料也可直接结合在细胞成分上,如核酸染料可直接结合 DNA,反映细胞的倍体。有些染料随胞质的钙离子浓度或跨膜电位差发不同的荧光,这种情况下细胞的荧光反映了细胞对刺激的反应;有些荧光染料在细胞分裂时均分到两个子代细胞,细胞的荧光强度反映的是细胞增殖的数目。

二、流式细胞仪

(一) 基本结构

流式细胞仪由 3 个基本结构组成:液流系统、光学系统、电子系统/外围计算机系统。此外,分选型流式细胞仪还有分选系统。

液流系统由上样系统、管路和液流调控系统组成。光学系统由作为激发光源的激光和聚焦并引导光走向的光学滤片、光纤等组成。电子系统包括负责将检测到的光信号转换为可被计算机处理的电信号的光电二极管或光电倍增管,计算机还有获取分析软件等。

简而言之,细胞通过上样装置进入液路系统,液流中的鞘液快速运送细胞入流动室,使细胞逐一通过一个或多个光源(通常指激光)检测区。细胞及与其结合的荧光素被光源激发后折射散射光或发出荧光,这些混合的光信号被滤光片分成的特定波长光信号后分别被检测器捕获,并由光学检测器将光信号转化为电信号(电压脉冲)。外围的计算机系统将电信

号进行数字化处理后即可完成对细胞的各种理化特征进行分析。

(二) 工作原理

1. 液流系统 流式细胞仪的液流主要由鞘液和样品悬液组成,鞘液通常是一种添加了抑菌剂并且不含颗粒物质的等渗盐溶液。流式细胞分析的理想状态是在既定的时间内只有一个细胞/颗粒通过激光束,因此,液流系统要将样本流中心定位于激光束的中央。在分析型流式中这个过程一般在石英流动室中完成,所以流动室是流式的核心部件之一。鞘液在系统压力的作用下,由鞘液桶进入流动室,而待测样本则以大于鞘液的压力进入流动室的鞘液流中。因为两种液流压力不同形成层流的形式,样品流在中间,鞘液流在外围,样本流被聚焦在鞘液流的中心形成单个细胞束,这一过程被称为流体动力学聚焦。

液流系统组件的正确操作对颗粒与激光束的正交非常重要,因此要保证液流系统中没有气泡和杂质并且被正确加压。

2. 光路系统

(1) 散射光信号:当颗粒被激光照射时会发生折射,部分光在细胞或颗粒的周围,部分光透过细胞或颗粒,这种光称为散射光。散射光的强度与颗粒的物理特性即大小或内部结构的复杂程度有关,对散射光影响最大的细胞成分是细胞膜、细胞核及细胞内的任何颗粒成分,细胞的外形和表面构造对总的散射光也有影响。

散射光在两个角度被收集:前向散射光(FSC)和侧向散射光(SSC)。前向散射光检测的是激光同轴方向(前向)的大部分衍射光,与细胞的表面积或大小成比例。侧向散射光在与激光垂直的角度收集,主要测的是折射光和反射光,与细胞的颗粒性及内部的复杂程度成比例。根据前向和侧向散射光的数据可对样本进行分类。图 1-1-1 是根据前向散射光和侧向散射光作图显示的外周血白细胞的形态学信息(每一个点代表一个细胞)。FSC 数据显示在 Y 轴上,根据颗粒大小,较小的淋巴细胞位于最下边;SSC 数据显示在 X 轴上,根据内部颗粒程度不同,可以将大小接近的单核细胞和粒细胞区分开。流式细胞仪也可以测合适标记的荧光信号。结合 FSC、SSC 和荧光信号,研究人员可以从样本中分辨出多个细胞亚群。

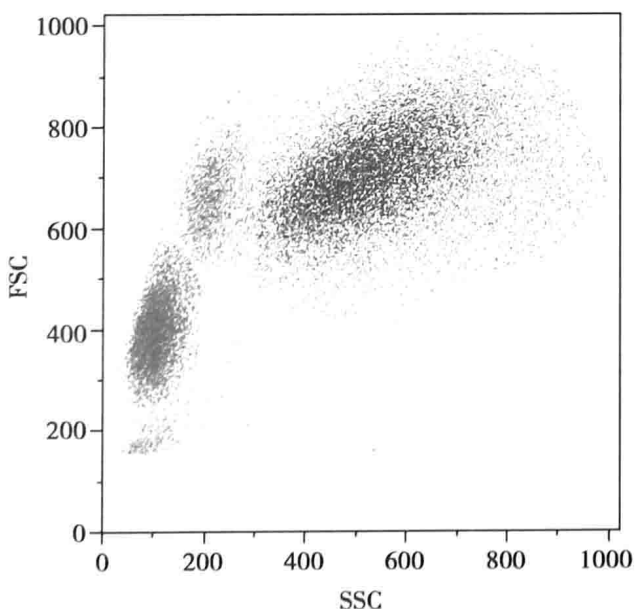


图 1-1-1 前向散射光(FSC)和侧向散射光(SSC)点图

(2) 荧光信号:吸收一定波长的光能(激光)后,荧光化合物上的电子跃迁到较高能级,受激电子很快返回基态,释放出剩余的光能,这部分能量就是荧光。

488nm 激光可以激发多个荧光素,是最常用的激光。几种荧光素如果由同一波长的激光激发(以 488nm 激光举例),而发射波长的峰值又不是太靠近,这几种荧光素可以组合使用。符合这一标准的最常用的荧光素组合是异硫氰酸荧光素(FITC)和藻红蛋白(PE)。FITC 和 PE 的吸收波峰在 495nm 左右,极易被 488nm 的激光激发(PE 有两个吸收波峰,另一个是 545nm),FITC 和 PE 的发射波峰分别是 530nm 和 570nm,相距较远,可由不同的检测器检测。

强的荧光信号表示细胞/颗粒上有较多的荧光分子。当荧光染料如 FITC 或 PE 连接到单克隆抗体上,就可根据细胞表面独特的表面蛋白来识别特殊的细胞群。因此,在一个混合的细胞样本中,不同的荧光素可用来区分不同的细胞群。结合 FSC 和 SSC 的数据,每一个细胞亚群的荧光染色有助于确定样本中哪类细胞群所占比例为多少。

3 色或 4 色流式检测最为常见,复杂的实验则需要更多色的检测。多色流式细胞仪有三个要素:①有高荧光强度的荧光素,易于连接到单克隆抗体上,相互之间发射波长重叠少;②有多个激光激发不同的荧光素,有可选择的滤光片限制不同检测器所检测波长的重叠;③有分析软件能对荧光素之间的干扰进行补偿。

流式细胞仪的光学系统由光学激发系统和光学收集系统组成。光学激发系统由激光和透镜组成,透镜使激光束成形并聚焦,使激光束恒定于固定的检测点。光学收集系统由收集透镜和一系列光镜及光学滤片组成的光学系统构成,收集透镜收集激光激发颗粒后发出的光信号,光镜和滤片将不同波长的光引入指定的光学检测器。

当颗粒/细胞被激光所激发,沿着激光方向正前方的光由收集透镜收集,收集的光信号被送至光电二极管,光电二极管将光信号转换成电流,电流由电子系统依次记录,这类光信号是前向散射光信号,与细胞的大小成比例。与激光束垂直方向的光也被收集,这部分光由侧向散射光和被激发的荧光组成。侧向散射光和荧光由收集透镜收集,通过分色镜和光学滤片,改变光前进的方向,进入不同的光电倍增管(PMT)。光电倍增管通常用于检测较弱的荧光信号,光学滤片放在光电倍增管前面,只让合适波长的光进入相应的光电倍增管。滤片是特制的,只允许很窄波宽的光通过,相当于荧光素发射波的峰值。只允许特定波宽的光通过的滤片叫带通滤片(band pass, BP)。比如,放在 FITC 检测器前面的滤片标记为 530/30,即是 515 ~ 545nm 波长的光可以通过。

流式细胞仪还会用到其他两类滤片:短通滤片和长通滤片。短通滤片(short pass, SP)只允许短于或等于设定波长的光通过;长通滤片(long pass, LP)只允许长于或等于设定波长的光通过。

流式细胞仪上用的光镜是光束分光镜,用于反射一定波长的光,并让其他一定波长的光通过。与滤片相同,二向色镜可以是短通或长通,比如,一个 510LP 的二向色镜允许长于或等于 510nm 的光通过,同时将低于 510nm 的光反射到滤片或另一个分光镜上。流式细胞仪光路图见图 1-1-2。

总结来说,激发光学系统的激光和透镜产生一束光,在一个固定的点与细胞/颗粒交汇,细胞/激光交汇产生的光信号由收集透镜收集,或者引导至检测器-光电二极管(FSC),或者经由光镜和滤片组成的收集系统将信号(SSC 和荧光信号)引导至合适的检测器——光电倍增管(PMT)。检测器将光信号转变成电流,然后进入电子系统。

3. 检测分析系统 流式细胞仪的电子系统的作用是:将光信号转换成电信号(电压),再进行数据分析。前者由两种光电检测器——光电二极管和光电倍增管完成。光电二极管对光的灵敏度较低,主要用于检测较强的前向散射光信号;光电倍增管能识别较弱的光信号,因此用于检测侧向散射光信号和荧光信号。

当细胞/颗粒进入激光检测区,被激光激发后发出散射光或荧光信号。光信号进入光学检测器(光电二极管或光电倍增管),被转换成电子。电子成倍放大后形成更大的电流。随之,电流被放大转变成电压脉冲。随着细胞进入激光检测区,电压脉冲跟着发生变化:细胞

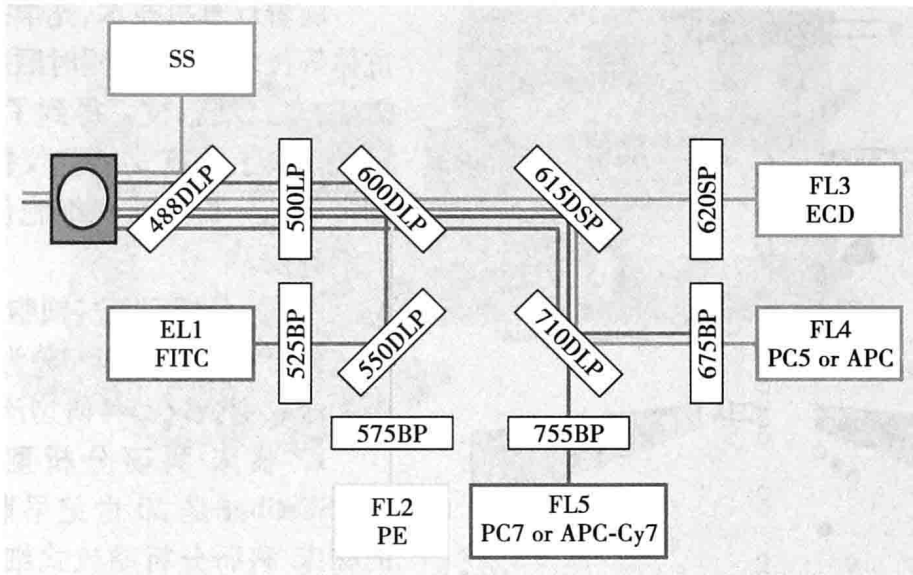


图 1-1-2 流式细胞仪光路图

位于激光检测区的中心时,电压脉冲信号达到峰值;随着细胞完全离开激光检测区,脉冲信号降到最低值(图 1-1-3)。

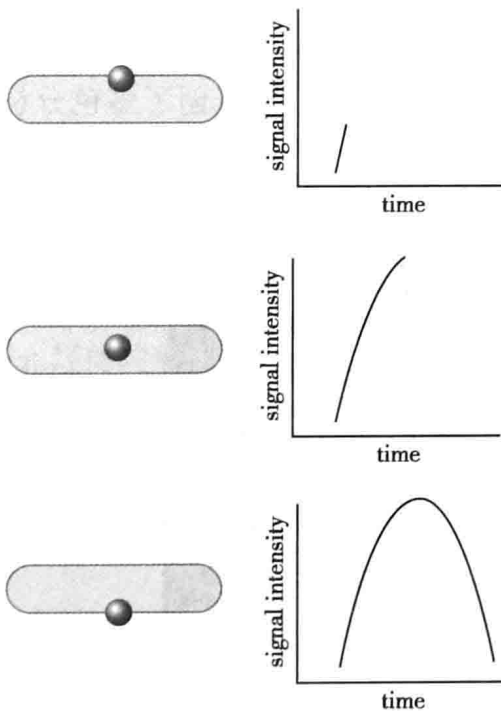


图 1-1-3 从颗粒进入-离开激光光斑,电压脉冲信号随之改变

最后,电脉冲信号由信号处理器把脉冲信号高度(height)、面积(area)和宽度(width)定量为一定数值。这些数据传递到流式细胞仪的计算机工作站储存并作进一步分析。

4. 分选系统 在分析型流式细胞仪上,细胞/颗粒经过激光束被检测后进入废液管道;在分选型流式细胞仪,满足设定条件的细胞可以被捕获,重新收集起来以作进一步的研究(比如显微镜观察、细胞培养等)。

分选细胞前,在流式细胞仪上采集样本时,要在软件上先设一个门,圈定待分选的靶细胞。细胞流经激光束时,流式细胞仪软件可以识别符合分选门条件的靶细胞。含离子的鞘液包裹着样本流经喷嘴时受到震荡的外力,断成大小均一的液滴,液滴中包含细胞,含有满足分选条件细胞的液滴被充电。震荡液流的两边分别是阳性和阴性偏转板,当充电的液滴流经偏转板中间时,充电的液滴根据所

充电荷的极性,向不同的方向偏转进入相应的收集管(图 1-1-4)。进行流式分选时,检测目标与分选目标是否一致是影响分选效率的一个重要因素,由于在石英流动室中检测后再进行空气中分选容易导致信号的误差,近年来在空气中对目标进行激发分析再进一步进行分选(jet-in-air)逐渐成为分选型流式细胞仪的标准技术。

流式细胞仪的分选可以将复杂样本中细胞/颗粒亚群高纯度的筛选出来,极大拓展了流式细胞仪的研究及诊断能力。

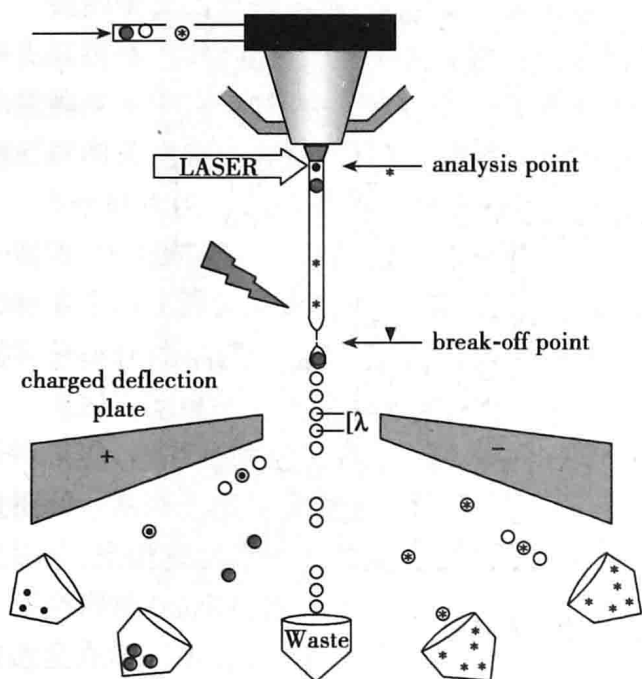


图 1-1-4 流式分选示意图

随着计算机技术、光学技术及单克隆抗体等技术的发展,同时顺应科学研究的需要,流式细胞技术得到了极大的提高。目前市场上的流式细胞仪按照其应用范围可分为分析型流式细胞仪和分选型流式细胞仪。

(三) 分析型流式细胞仪介绍

分析型流式细胞仪分为临床/科研分析型流式细胞仪和科研型流式细胞仪。

1. 临床/科研分析型流式细胞仪
 FACSCalibur 是 20 世纪早期市场上经典的临床/科研分析型流式细胞仪,仪器采用空间立体激发技术,配置双激光,可同时检测 4 色荧光(图 1-1-5)。仪器的检测速度达到 10 000 细胞/秒。

Epics XL ADC 是世界上首台单激光激发 4 色荧光的数字化流式细胞仪(图 1-1-6)。它结合科研型流式的高度分析功能以及临床型分析仪可快速便捷进行大量样本的诊断分析的特点,极大地满足了科研人员的要求,其成熟的软件平台、尖端的数字化技术和直观的分析方式开创了多色分析的新时代。

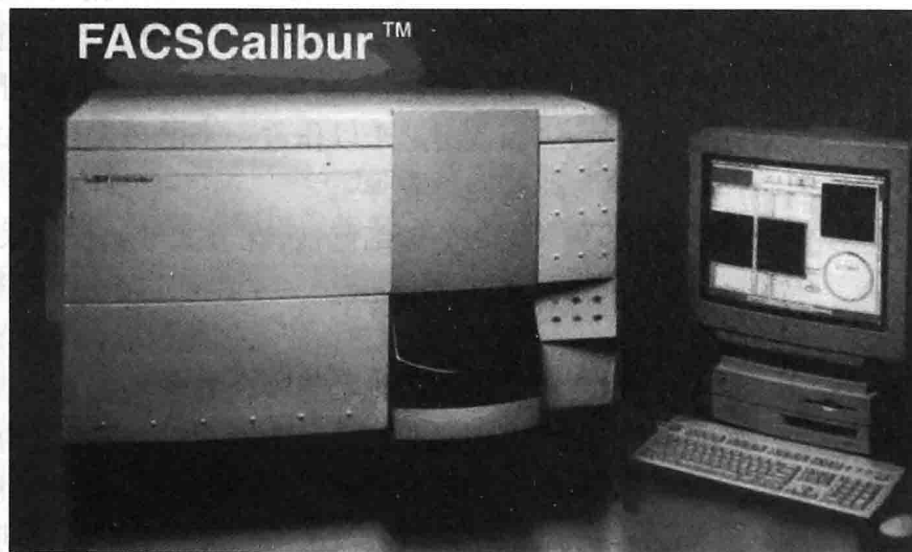


图 1-1-5 FACSCalibur

Cytomics FC 500 作为第 2 代数字化流式细胞仪,以其精巧的设计、强大的功能以及高度自动化技术而深受赞誉(图 1-1-7)。FC 500 具有两个前向检测角度,颗粒区分度好;可配置单激光或者双激光同时进行 5 色荧光分析。其 20 比特数码处理系统保证了结果的精度,独特的全矩阵自动荧光补偿技术和自动上样装置使流式分析简单化、高效化。

FACSCanto II 属于高端临床/科研分析型流式细胞仪,仪器在光学系统作了极大改进,