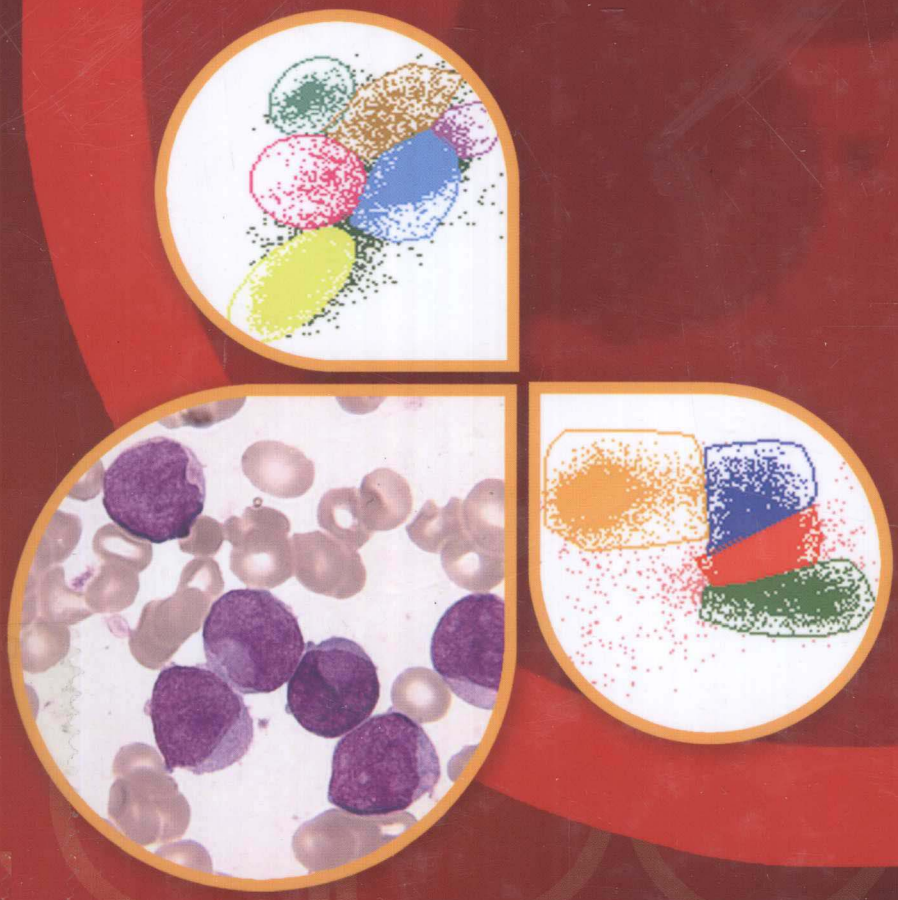
实用流式细胞术

——血液病篇

刘艳荣　主编



北京大学医学出版社

实用流式细胞术——血液病篇

主　编　刘艳荣

编　者　（按姓氏拼音排序）

常英军　河北医科大学第三医院
李建勇　苏州大学附属第一医院
刘艳荣　北京大学血液病研究所
邵宗鸿　天津医科大学总医院
万岁桂　首都医科大学宣武医院
王亚哲　北京大学血液病研究所
吴　煦　美国BD公司
徐　娟　首都医科大学宣武医院
朱焕玲　四川大学华西医院
主鸿鹄　北京大学血液病研究所

北京大学医学出版社

SHIYONG LIUSHI XIBAOSHU
——XUE YE BING PIAN

图书在版编目（CIP）数据

实用流式细胞术. 血液病篇/刘艳荣主编. —北京：北京大学医学出版社，2010.9
ISBN 978-7-81116-758-0

Ⅰ. ①实… Ⅱ. ①刘… Ⅲ. ①细胞—生物样品分析：定量分析—应用—血液病 Ⅳ. ①Q2-33

中国版本图书馆CIP数据核字（2010）第151221号

实用流式细胞术——血液病篇

主　　编：刘艳荣
出版发行：北京大学医学出版社（电话：010-82802230）
地　　址：（100191）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
印　　刷：北京圣彩虹制版印刷技术有限公司
经　　销：新华书店
责任编辑：陈　奋　　**责任校对：**金彤文　　**责任印制：**张京生
开　　本：889mm×1194mm　1/16　　**印张：**24.5　　**字数：**731千字
版　　次：2010年9月第1版　2010年9月第1次印刷　　**印数：**1-2000册
书　　号：ISBN 978-7-81116-758-0
定　　价：199.00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）

本书由
北京大学医学部科学出版基金
资助出版

前　言

流式细胞术作为一种高科技、敏感而快速分析细胞及微粒的技术，自中国引进第一台流式细胞仪以来，已经走过30余年的历程。在这期间，随着流式细胞仪结构和功能的改进和提高，流式细胞仪的应用范围越来越广，目前国内已经有越来越多的医疗和研究机构拥有了流式细胞仪。流式细胞仪在血液学、免疫学、肿瘤、干细胞和细胞治疗等领域发挥着重要的作用。

流式细胞术在血液学中的应用是一个极好的范例，其中对血液淋巴系统肿瘤的诊断、分期和疗效的评定已经成为不可缺少的依据。流式免疫分型的应用使白血病和淋巴瘤的诊断进入一个崭新的阶段，使得形态学不典型、诊断分型困难疾病的诊断变得容易了，而且还发现了一些形态学不能诊断的疾病。对目前诊断困难的骨髓增生异常综合征，免疫表型在诊断中的作用也凸显出来，其意义会越来越明确。由于血液系统疾病的复杂性，使得流式细胞术在血液病中的应用掌握起来比较困难，问题较多。本书针对这些问题进行了系统和详细的介绍。并针对目前免疫分型抗体使用不规范、报告形式混乱等问题介绍了国际上的先进经验、指南及编者的实际范例。

治疗后微量残留病（MRD）的评估也是流式细胞术在血液学中应用的另一个领域，也是本书的另一项重点内容。临床实践证明，目前所普遍采用的疗效评定标准——临床完全缓解不能有效地评估患者的预后，新的严格意义的完全缓解标准是MRD阴性。目前白血病的治疗已经进入了MRD时代，根据MRD水平评估患者的预后、进行危险度分层，指导个体化治疗成为目前白血病治疗的新策略。而MRD的检测离不开流式细胞术。

造血干细胞移植（HSCT）是治疗血液病的重要途径，是目前多种血液系统肿瘤唯一的治愈方法。流式细胞术在HSCT中发挥着重要的作用，检测采集物中造血干细胞的数量、监测治疗后免疫重建和疗效的评估均需要流式细胞术。

流式细胞术在红细胞、血小板疾病、阵发性睡眠性血红蛋白尿、自身免疫性溶血性贫血和免疫相关性血细胞减少患者的诊断中也起着重要的作用。通过对血液中淋巴细胞的检测可以反映机体的免疫功能状态，因此Th1/Th2和调节性T细胞的检测也是研究的热点。本书对这些领域均进行了介绍。

近几年来，白血病/淋巴瘤的诊断在不断变化，从WHO血液和淋巴组织肿瘤的分类标准演变中可以看出，其分类越来越细，越来越科学。其中免疫表型也越来越明确。本书主要以2008版WHO分类作为框架，力图向读者介绍最新的动态和发展趋势。本书的编者多是在相应领域有着丰富经验的专家，书中的内容汇集了他们多年工作的经验；本书也汇集了一批中青年作者，从各个方面介绍流式细胞术在血液病学中的应用和意义，内容涉及理论和实际操作。本书不仅适用于从事免疫分型和应用流式细胞术的人员，而且对临床医生、研究生等均有参考价值。

在本书的编写过程中，首先要感谢我的导师陈珊珊教授给予的亲切指导和帮助。感谢我的同事常艳、郝乐等长期以来工作上的密切配合；感谢秦亚溱、阮国瑞等提供典型的基因异常病例。感谢北京大学血液病研究所形态室、北京大学人民医院儿科形态室、河北廊坊中医医院和北京海斯特临床检验中心为本书的编写提供典型病例和形态学结果。感谢北京大学血液病研究所、北京大学人民医院儿科、中国人民解放军海军总医院、中国人民解放军空军总医院、中国人民解放军总医院（301医院）、中国人民解

试读结束：需要全本请在线购买： www.ertongbook.com

放军307医院和北京市第六医院等多家医院的临床医生对本书编写的支持。

天津医科大学总医院李丽娟、付蓉、刘慧，北京大学血液病研究所袁婷婷，德国美天旎公司的杨海霞参与了本书部分章节的编写，在此一并致谢。

由于时间紧迫，本书并未包含流式细胞术在细胞增殖、凋亡检测、信号传导分子中的作用；对于其他体液，例如脑脊液、胸腔积液、腹水和尿液中细胞的检测，基本原则和方法与血液细胞相似，本书未进行单独介绍。由于本书编者较多，写作风格和重点不尽相同，个别章节的内容有一定交叉和争议，各章内容主要代表编者的观点，对可能出现的一些问题，敬请读者、专家和同行们批评指正。

刘艳荣

2010年8月1日于北京

目　录

第一章　流式细胞仪的工作原理（吴煦　杨海霞）……1
第一节　流式细胞仪的发展史……1
第二节　流式细胞仪的基本原理……3
第三节　流式细胞仪的结构组成……3
一、激光及光束成形系统……3
二、液流系统……4
三、流式细胞仪中的光信号收集系统……5
四、电子系统……8
五、FCM测量数据的存贮、显示与分析……10
第四节　流式细胞仪的检测信号及意义……11
一、散射光信号的检测……11
二、荧光信号的检测……13
第五节　流式细胞仪的主要分析技术指标……17
一、荧光灵敏度……17
二、仪器分辨率……17
三、前向散射光灵敏度……18
四、细胞分析速度……18
第六节　细胞分选……18
一、电荷式细胞分选……18
二、捕获管分选……19
三、FCM分选指标……20
第七节　高端流式细胞仪的简介和展望……21
一、FACSCanto Ⅱ流式细胞仪……21
二、LSR Ⅱ高端生命科学研究型流式细胞仪……22
三、FACSAria Ⅱ高速流式细胞分选仪……23
四、Influx高端流式细胞分选仪……24
五、MACSQuant™流式细胞仪——细胞分析的里程碑……25

第二章　流式细胞仪的标本制备、检测及质量控制（王亚哲）……28
第一节　标本的制备及保存……28
一、标本的准备……28
二、细胞计数……29
三、荧光染色……30

目录

四、质量控制 33
第二节 荧光素的特性及应用 34
一、常用荧光素的主要特点 35
二、荧光素的选择和搭配 37
第三节 仪器调整及数据获取 40
一、仪器的校准和调整 40
二、流式细胞仪测定及数据获取 44
第四节 数据分析和报告 45
一、数据分析 45
二、数据解释及报告 49

第三章 正常血细胞发育过程的抗原表达规律（刘艳荣） 52
第一节 正常髓细胞系抗原的表达规律 52
一、正常粒系和单核细胞系抗原的表达规律 52
二、正常红系细胞的分化规律 60
三、正常巨核细胞分化发育的抗原表达规律 60
第二节 正常淋巴细胞分化发育的抗原表达规律 61
一、正常B细胞抗原的表达规律 61
二、正常T细胞抗原的表达规律 64

第四章 急性白血病的免疫表型（刘艳荣 袁婷婷） 67
第一节 急性白血病的诊断与分型 67
一、白血病的概念 67
二、急性白血病的FAB分型 67
三、急性白血病的MIC分型 69
四、急性白血病1999版WHO分类 70
五、2008版WHO血液/淋巴系统肿瘤分类 71
六、2008版与1999版WHO分类中髓系和淋巴系肿瘤分类的比较 73
第二节 急性髓细胞白血病的免疫表型分析 73
一、AML伴重现性的遗传学异常 74
二、AML 无其他特异性异常（NOS） 86
第三节 急性淋巴细胞白血病的免疫表型分析 100
一、B淋巴母细胞白血病/淋巴瘤 100
二、B淋母细胞白血病/淋巴瘤伴重现性的遗传学异常 104
三、T淋巴母细胞白血病/淋巴瘤 108
第四节 急性系列不明型白血病的免疫表型 116
一、急性未分化型白血病 118
二、混合表型急性白血病伴 t（9；22）（q34；q11.2）；BCR-ABL1 118
三、混合表型急性白血病伴 t（V；11q23）；MLL重排 118
四、混合表型急性白血病，B/髓，NOS 119
五、混合表型急性白血病，T/髓，NOS 120

六、混合表型急性白血病，NOS-罕见类型 120
七、其他混合表型急性白血病 121

第五章 髓细胞增殖性疾病的免疫表型分析（刘艳荣 徐 娟 万岁桂） 124
第一节 2008版WHO对髓细胞增殖性疾病的分类 124
一、骨髓增殖性肿瘤 124
二、骨髓增生异常/骨髓增殖性肿瘤（MDS/MPN） 124
三、骨髓增生异常综合征（MDS） 124
第二节 骨髓增殖性肿瘤 125
一、慢性粒细胞白血病，BCR-ABL1阳性 125
二、慢性嗜酸性粒细胞白血病，NOS 127
三、肥大细胞增多症 128
四、骨髓增殖性肿瘤，未分类 129
第三节 骨髓增生异常/骨髓增殖性肿瘤 129
一、慢性粒单细胞白血病 129
二、非典型慢性粒细胞白血病，BCR-ABL1阴性 131
三、幼年型粒单细胞白血病 131
四、骨髓增生异常/骨髓增殖性肿瘤，未分类 131
第四节 骨髓增生异常综合征 132
一、概述 132
二、MDS的细胞表面标记 133
三、MDS异常结果的判断 136
四、质量控制 139
五、结论 139

第六章 流式细胞术在淋巴增殖性肿瘤中的应用（朱焕玲） 141
第一节 概述 141
一、正常外周血及骨髓标本 141
二、良性/反应性实体淋巴组织（淋巴结、扁桃体） 142
第二节 成熟B细胞肿瘤 143
一、概述 143
二、FCM在成熟B淋巴细胞肿瘤中的作用 145
三、2008版WHO分类B淋巴细胞增殖性肿瘤的免疫分析 147
第三节 成熟T/NK细胞肿瘤 155
一、概述 155
二、常见的T/NK细胞肿瘤 160
第四节 病例分析 165
一、多发性骨髓瘤 165
二、脾边缘带淋巴瘤 166
三、毛细胞白血病 166
四、套细胞淋巴瘤 167

目录

五、弥漫大B细胞淋巴瘤 170
六、T大颗粒细胞白血病 171
七、NK白血病/淋巴瘤 172
八、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤 174
九、间变大细胞淋巴瘤 176
十、肝脾T细胞淋巴瘤 177

第七章 慢性淋巴细胞白血病和多发性骨髓瘤的免疫表型特点（李建勇 王亚哲） 179
第一节 慢性淋巴细胞白血病 179
一、概述 179
二、CLL的免疫表型特点 180
三、FCM检测CLL的预后指标 181
四、单克隆B淋巴细胞增多症 182
五、鉴别诊断 182
第二节 多发性骨髓瘤 188
一、区分正常和异常浆细胞的抗原 189
二、骨髓瘤细胞的设门分析 190
三、多发性骨髓瘤的抗原表达 190
四、免疫表型与预后 192
五、免疫分型与靶向治疗 192
六、用于多发性骨髓瘤免疫表型分析的抗体组合 192

第八章 急性白血病微量残留病的流式细胞术检测（刘艳荣） 196
第一节 概述 196
一、微量残留病检测的理由 196
二、微量残留病检测的方法 196
三、白血病相关的免疫表型特点 197
第二节 急性淋巴细胞白血病残存白血病检测 198
一、B系-ALL的残存白血病检测 198
二、T系-ALL的残存白血病检测 212
三、ALL微量残留病检测的临床意义 215
四、ALL微量残留病检测中FCM与PCR方法的比较 217
第三节 急性髓细胞白血病微量残留病检测 219
一、正常髓系祖细胞的抗原表达特点 219
二、AML微量残留病检测的抗体组合和LAIP特点 222
三、AML微量残留病检测的临床意义 234
四、AML微量残留病检测中FCM与PCR的比较 235

第九章 慢性淋巴细胞增殖性疾病的微量残留病检测（王亚哲） 239
第一节 慢性淋巴细胞白血病 239
一、CLL的微量残留病检测 239

二、非霍奇金淋巴瘤的微量残留病检测 242
第二节 多发性骨髓瘤 243
一、多发性骨髓瘤微量残留病的检测方法及比较 243
二、FCM检测多发性骨髓瘤微量残留病的意义 245
三、FCM检测多发性骨髓瘤微量残留病的问题和共识 246

第十章 流式细胞术分析造血干细胞（刘艳荣） 250
第一节 造血细胞的分化、发育与成熟规律 250
一、造血 250
二、造血干细胞的分化、发育、成熟 252
第二节 造血干/祖细胞的生物学特征 252
一、造血干细胞 252
二、造血干/祖细胞的实验研究 253
三、造血干祖细胞分化的等级性 255
第三节 造血干/祖细胞的免疫表型分析 256
一、造血干细胞的免疫表型特点 256
二、造血祖细胞的免疫表型特点 257
第四节 造血干/祖细胞的计数 258
一、FCM计数$CD34^+$细胞的标准化方案 260
二、ISHAGE 法检测$CD34^+$细胞 262
三、ProCOUNT™ 造血干/祖细胞计数 265

第十一章 流式细胞术在造血干细胞移植中的应用（常英军 主鸿鹄 刘艳荣） 271
第一节 造血干细胞移植后造血、免疫重建监测 271
一、HSCT后的造血重建 271
二、HSCT后的免疫重建 273
三、HSCT后造血和免疫重建的研究前景 279
第二节 造血干细胞移植后微量残留病检测 280
一、微量残留病检测在造血干细胞移植中应用的必要性 280
二、FCM检测微量残留病的方法学 280
三、HSCT前微量残留病检测的意义 281
四、HSCT后微量残留病检测的意义 282
五、HSCT后微量残留病检测的时间点 284
六、微量残留病检测对移植后供者淋巴细胞输注的疗效判断 285

第十二章 常见红细胞病的流式分析（邵宗鸿 付 蓉 李丽娟 刘 惠 刑莉民） 289
第一节 阵发性睡眠性血红蛋白尿 289
一、概述 289
二、锚连蛋白检测 289
三、嗜水气单胞菌溶素变异体检测 293
四、结语和展望 295

试读结束：需要全本请在线购买： www.ertongbook.com

目录

第二节 免疫相关性血细胞减少症 296
一、概述 296
二、骨髓单个核细胞膜抗体的检测 296
三、B淋巴细胞胞内抗体的检测 299
四、B淋巴细胞亚群的检测 300
五、骨髓B淋巴细胞凋亡相关蛋白水平 301
六、DC亚群的检测（DC_1/DC_2） 303
七、Th1细胞和Th2细胞的检测 304
八、Th17细胞的检测 306
九、Treg细胞激活状态的检测 307
十、结语和展望 308
第三节 自身免疫性溶血性贫血 308
一、概述 308
二、FC-DAT实验原理 309
三、试剂 309
四、方法 309
五、FC-DAT结果 310
六、临床意义 311
七、结语和展望 311

第十三章 流式细胞术与血小板分析（刘艳荣 王亚哲 袁婷婷） 312
第一节 概述 312
一、基本概念 312
二、血小板的生理功能 312
三、流式细胞术在血小板分析中的应用 313
第二节 血小板膜表面糖蛋白分析 314
一、血小板膜糖蛋白组成 314
二、膜糖蛋白检测 315
第三节 流式网织血小板计数 318
一、检测方法 319
二、临床意义 320
第四节 血小板自身抗体测定 321
一、检测方法 321
二、临床意义 323
第五节 流式血小板计数 323
一、红细胞与血小板比值法 324
二、荧光微粒绝对计数法（TruCOUNT 法） 324
三、临床意义 325

第十四章 免疫功能检测（万岁桂） 327
第一节 淋巴细胞亚群分析 327

一、淋巴细胞的发育及其表面标记 327
二、淋巴细胞的亚群 329
三、淋巴细胞亚群的免疫表型分析方法 333
第二节 Th1/Th2细胞 338
一、Th细胞的表型和功能特征 338
二、Th1/Th2细胞流式细胞仪检测方法 339
第三节 调节性T细胞 341
一、天然$CD4^+CD25^+$Treg 342
二、Tr1细胞 343
三、Th3细胞 343
四、Treg流式细胞术检测方法 343

第十五章 免疫分型的抗体组合原则及报告标准化（刘艳荣） 347
第一节 常用的抗体介绍 347
第二节 白血病免疫分型的抗体组合原则和实例 351
一、国际指南中抗体使用原则介绍 351
二、国际流式细胞专家的共识 352
三、笔者使用的主要抗体和组合实例 354
第三节 免疫分型报告的标准化 358

附录 《血液淋巴系统肿瘤细胞的临床流式分析指南》解读 363

1 流式细胞仪的工作原理

流式细胞技术是一种定量分析技术。想要鉴别出一个细胞群体，主要是依据细胞特殊标记物的数量，而不仅是依据标记物的存在与否，因此，使用流式细胞仪进行细胞定量分析在细胞生物学中非常重要。多参数相关分析可以对细胞固有的性质（如光散射）以及细胞的标记测定特征（如表面受体、DNA）同时进行分析。必要时还可同时测定胞浆内抗原、核内抗原等。这样，就可能从一个复杂的细胞混合体中识别出某一特定的细胞亚群。只有对大量的细胞进行测量才能发现稀有的细胞亚群，并将其分选出来，所以，必须进行快速细胞测量。使用流式细胞分选术，可以根据所测定的各种细胞性质的不同表现，从细胞群体中将某个细胞亚群分选出来，进一步对它进行功能研究、形态学研究、培养或做其他的分析。

第一节　流式细胞仪的发展史

流式细胞术（FCM）的发明、改进以及在众多应用领域的拓展，综合了多种学科，如生物学、生物技术、计算机科学、电子工程学、流体力学、激光技术、高等数学、临床医学、分子生物学、有机化学和物理学等。而现代流式细胞术更是由于结合了单克隆抗体技术、定量细胞化学和定量荧光细胞化学，使其在生物学、临床医学、药物学等众多研究领域的应用有了突飞猛进的发展。

1930年，Caspersson 和Thorell开始致力于细胞的计数。

1934年，Moldaven 成为世界上最早设想使细胞检测自动化的人，他试图用光电仪记录流过一根毛细管的红细胞和红色酵母。这为日后流式细胞仪的设计引入了细胞染色的概念，以便于进行细胞的定量分析。

1936年，Caspersson 等引入显微光度术。

1940年，Albert Coons 提出用结合了荧光素的抗体去标记细胞内的特定蛋白，免疫荧光技术问世。从此，人们可以使用荧光显微镜观察细胞，了解相关蛋白在细胞上的表达情况。免疫荧光技术的问世，为日后流式细胞仪的问世提供了思路。

1947年，Guclcer 运用层流和湍流原理研制出烟雾微粒计数器。

1949年，Wallace Coulter 提出在悬液中计数粒子的方法，并设计出血细胞分析仪。其自动快速分析细胞的想法与流式细胞仪的设计要求相一致。

1950年，Caspersson 用显微分光光度计的方法在紫外光和可见光光谱区检测细胞。

1953年，Croslannd-Taylor 应用分层鞘流原理，成功地设计出红细胞光学自动计数器。鞘液流动态聚焦原理成为流式细胞仪设计的重要原理之一。

同年，Parker 和Horst 描述一种全血细胞计数器装置，成为流式细胞仪的雏形。

1954年，Beirne 和Hutcheon 发明光电粒子计数器。

1959年，B型Coulter计数器问世。

1965年，Louis Kamemtsky等提出两个设想，一是用分光光度计定量细胞成分；二是结合测量值对细胞分类。

1967年，Kamentsky 和Melamed 在Moldaven的方法的基础上设计了细胞分选装置，通过电子脉冲控制，将细胞分离到液流外收集起来。

1969年，德国的Dittrich和Gohda提出了流动池的设计，并可以为EB染色的细胞做DNA分析的直方图。美国斯坦福大学的Sweet还发明了喷墨技术，用于打印机。而这种技术的核心是控制喷嘴震动产生液滴。这一技术日后被加以利用，形成了流式细胞仪上的高速分选功能。

同年，Marvin Van Dilla、Fulwyler及其同事在Los Alamos，New Mexicao（即现在的National Flow Cytometry Resource Labs）发明第一台荧光检测细胞计，使用了鞘液流动态聚焦原理，同时还使用了氩离子激光器作为光源。

1972年，美国斯坦福大学的Leonard Herzenberg 小组研制出一个细胞分选器的改进型，能够检测出经过荧光标记抗体染色的细胞的较弱荧光信号，实现了同时多个散射光和荧光信号参数的检测，同时可以对细胞加以分选。

1973年，Becton Dickinson（BD）公司与美国斯坦福大学合作，研制并生产了世界第一台商用流式细胞仪——FACS I。从此，流式细胞仪的研制使得这一技术更加易于操作，检测灵敏度不断提高，其应用领域也在不断拓展。

1975年，Kohler 和Milstein 提出了单克隆抗体技术，为细胞研究中大量特异的免疫试剂的应用奠定了基础。

从此，大量的厂家不断研制生产出自己的流式细胞仪，流式细胞术进入了一个空前飞速发展的时代。科学家们、仪器制造商们又纷纷将研究焦点转向荧光染料的开发、细胞的制备方法和提高电子信号的处理能力上来。进入20世纪90年代，流式细胞术作为一门生物检测技术已经日臻完善，而随之而来的就是应用领域的日趋广泛。而今，流式细胞仪已经深入到生物学、医学、药物学等各个分支领域，并将在未来为我们的科学研究发挥更大的作用。

由于早期的流式细胞仪庞大、复杂，使用起来很不方便，需要长时间手动调整。因此，商业化的厂家一直致力于操作简便、性能稳定、分析和分选功能强大的流式细胞仪的研发，还在此基础上开发了为某一应用领域而研制的专用型流式细胞仪。

1985年，世界上第一台采用石英杯固定光路的台式分析型流式细胞仪——FACScan诞生，与之前的立式仪器相比，该仪器占地面积小，性能稳定，易于操作。

1992年，第一台台式分选机——FACSort诞生。

1995年，BD公司推出第一台同时具有四色分析和分选功能的台式机——FACSCalibur诞生。

1996年，细胞高速分选仪——MoFlo诞生，分选速度可达70 000个细胞/秒。

2000年，第一台具有紫外激光的三激光台式流式细胞分析系统——BD LSR流式细胞仪诞生。

2002年，第一台可安装四根激光器的台式机——LSR Ⅱ诞生，创造性地使用了全反射光信号收集系统，最多同时检测18色荧光，被誉为分析型流式细胞仪的顶级配置。

由于分析型和分选型流式细胞仪大大简化，越来越多的人员可以很容易地操作流式细胞仪。而一直以来，高速分选型流式细胞仪都以复杂著称，需要专业人员接受专业培训，充分了解仪器结构和分选原理，才能够有效、可靠地操作仪器。

2003年，第一台装有流动池固定光路的高速细胞分选仪——FACSAria诞生，由于使用石英杯的固定光路设计，无需调整光路，采用三激光进行15参数的分析，其多色分析的灵敏度和精密度高，与分析型仪器相近，而分选速度可达70 000个细胞/秒。至此，结束了以往流式细胞高速分选仪体积庞大、耗水耗电、操作复杂的时代，使高速细胞分选实现了灵敏、简便、结果高度可重复，成为流式细胞仪发展史上

的里程碑。

第二节　流式细胞仪的基本原理

流式细胞仪安装有一根或多根激光器，一些低端的流式细胞仪还采用汞光灯作为光源。绝大多数流式细胞仪都配有氩离子气态激光器作为第一根激光，其发射波长为488nm。待测样本中的细胞经液流系统传送，形成单细胞流，依次通过流式细胞仪的流动室，在激光照射区域，细胞上标记的荧光染料受到激光的激发，产生荧光信号。在不同的实验体系中，根据细胞标记的荧光素不同，在不同波长的激光激发下，发射出不同波长的荧光，这些荧光信号可以反映不同的细胞生物学特性。细胞受到激光照射后产生的这些光信号被相应接收器（光电倍增管）接收并放大，转换为与光强度相关的电子信号，然后经计算机储存和处理分析，以图形形式（如直方图、点图、密度图等）直观地显示出细胞的分布情况。流式细胞仪产生的信号主要有散射光信号和荧光信号。这些信号可以反映相应的细胞特征，如反映细胞相对大小的前向散射光（FSC）、反映细胞内部复杂程度的侧向散射光（SSC）以及反映各种细胞功能和抗原表达的荧光信号。将图形和数据直接输入联机专用的计算机，或存入磁盘以备分析。计算机快速而精确地将所测数据进行统计计算，结合多参数分析，从而实现了细胞定量分析。

一些流式细胞仪还配有细胞分选系统，通过细胞分选系统，还可以将具有相同光信号特征，即某些特定特征的细胞群体分选出来。

第三节　流式细胞仪的结构组成

一、激光及光束成形系统

流式细胞仪的光学系统由激光器、光束成形系统以及光信号收集系统组成。我们首先介绍激光系统。

（一）激光器

激光（laser）是一种相干光源，它能提供单波长、高强度及稳定性高的光照，在单位面积、单位立体角内输出功率特别大，是细胞微弱荧光快速分析的理想光源。激光沿直线传播，发散角小，很容易聚焦到细胞通过位置。激光还具有良好的单色性。以上这些特点使激光成为流式细胞仪光源的首选。由于细胞的快速流动，每个细胞经过光照区的时间仅为1微秒左右，每个细胞所携带的荧光物质被激发出的荧光信号强弱与被照射的时间和激发光的强度有关，因此细胞必须达到足够的光照强度。

激光的种类主要有气态激光、固态激光、半导体激光和染料激光等。不同的激光器发出的激光波长不同。通常，大功率的气态激光器需要水冷设备，以维持激光的正常工作。而固态激光器具有体积小、重量轻、效率高、性能稳定、可靠性好、寿命长、光束质量高等优点。大型空气激发的高速细胞分选仪由于空气中光信号收集效率较低，因而多采用大功率的气态激光器。而新型多激光流式细胞仪越来越多地使用体积较小的空冷固态激光器。

目前，绝大多数流式细胞仪的基本配置中均有一根波长为 488nm 的氩离子激光器。氩离子激光器是目前流式细胞仪中最常使用的光源，许多不同颜色的染料都可以被 488nm 激光激发，如FITC、PE、PerCP等。

随着流式细胞分析的发展和复杂细胞分析的需要，流式细胞仪还可选配多根激光器，如产生633nm波长红色光束的氦氖激光或产生635nm波长红色光束的二极管激光器，可以配合APC、TOTO-3、TO-PRO-3

等红光激发染料的使用。多激光的使用，扩大了检测的荧光素的种类和范围；多激光同时激发，实现了同时多色分析的目的，新型流式细胞仪可以同时使用3根或3根以上激光器，进行10色以上的多色分析。

（二）激光光束成形系统

激光光束直径一般为1～2mm，在到达流动室前，需先经过透镜，将其聚焦，形成直径较小的、具有一定几何尺寸的光斑，以便将激光能量集中在细胞照射区。激光器成形后，多为椭圆形或圆形光斑，激光能量分布属正态分布，即光斑中央位置的激光能量最集中，光斑边缘激光能量下降。与光斑中央的激光能量相比，激光光斑边缘的能量大幅下降。为了保证样本中的细胞是一个一个分别受到最大光照，且受照强度十分一致，必须将样本流与激光束正交且相交于光斑中央，即激光能量分布的峰值处。在流式细胞仪中最常使用的方法是使用激光聚焦物镜和一锥形镜，形成椭圆形光斑，准确聚焦在样本细胞流通过的地方，保证单细胞检测，且激发细胞信号一致。

在多激光流式细胞仪上，每根激光都以同样的方式聚焦在样本液流上，只是空间位置不同，细胞按顺序通过每个激光光斑。

一般来讲，台式机由于使用石英杯流动池，其光路固定，对用户封闭，即安装时由工程师调试完毕后，无需用户做任何调节，所以操作十分方便。而大型细胞分选仪采用空气激发的原理，由于空气中的液流位置不固定，因此需要用户自行调节，使液流中的样本与激光束正交。

二、液流系统

液流系统的主要功能是利用鞘液和气体压力将样本细胞依次输送到测量区，使细胞逐个通过激光光斑中央，接受检测（图1-3-1）。

鞘液的作用是将样本细胞环绕，在气体压力作用下，鞘液稳定流动，在鞘液的包裹流动作用下，样本细胞稳定地沿液流中央位置流动。常使用的鞘液流为与待测细胞等张的溶液（如磷酸盐缓冲液）。

流式细胞仪的检测方式有两种，一种是稳定性光路的流动池检测，另一种是可调节光路的空气激发检测。由于流动池检测操作简便、灵敏度高、结果稳定，故大多数流式细胞仪都采用流动池设计作为流式细胞仪检测系统的核心。

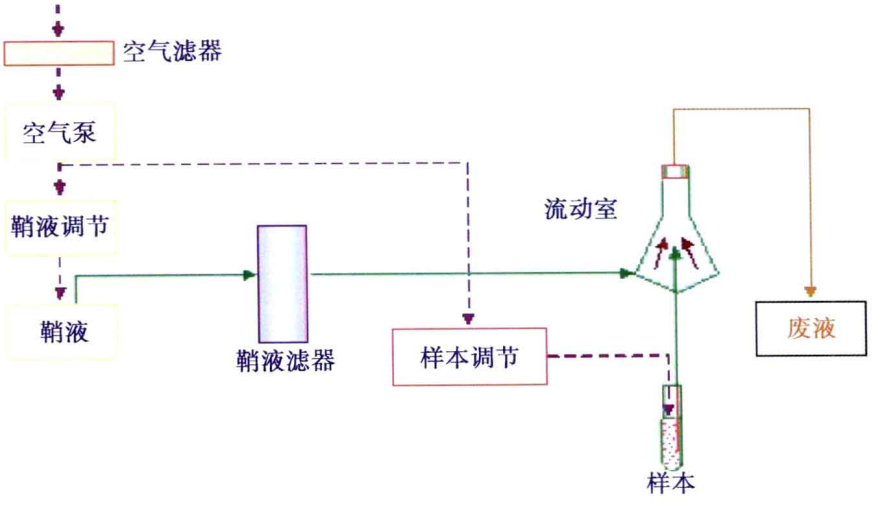


图1-3-1 液流系统示意图

试读结束：需要全本请在线购买： www.ertongbook.com