

·第2版·

流式细胞术 操作规程

Flow Cytometry Protocols

原著 Teresa S.Hawley
Robert G.Hawley

主译 邵启祥



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

Flow Cytometry Protocols

流式细胞术操作规程

(第2版)

原 著 Teresa S. Hawley
Robert G. Hawley

主 译 邵启祥
副主译 翟志敏 夏 圣
主 审 丁传林 付文先



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

北 京

图书在版编目 (CIP) 数据

流式细胞术操作规程 / (美) 霍利 (Hawley, T. S.), (美) 霍利 (Hawley, R. G.) 原著; 邵启祥主译. —2 版. —北京: 人民军医出版社, 2012. 11
ISBN 978-7-5091-5674-2

I. ①流… II. ①霍… ②霍… ③邵… 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 254660 号

The original English language work has been published by HUMANA PRESS, Totowa, New Jersey, U. S. A.

© 2004 by Humana Press, Inc. All Rights Reserved.

著作权合同登记号: 图字: 军-2006-088 号

策划编辑: 郭颖 孟凡辉 文字编辑: 胡国梁 责任审读: 张之生

出版发行: 人民军医出版社 经销: 新华书店

通信地址: 北京市 100036 信箱 188 分箱 邮编: 100036

质量反馈电话: (010) 51927290; (010) 51927283

邮购电话: (010) 51927252

策划编辑电话: (010) 51927300-8153

网址: [www. pmmp. com. cn](http://www.pmmp.com.cn)

印刷: 北京天宇星印刷厂 装订: 京兰装订有限公司

开本: 787mm × 1092mm 1/16

印张: 18.75 彩页 8 面 字数: 468 千字

版、印次: 2012 年 11 月第 2 版第 1 次印刷

印数: 0001-2500

定价: 99.00 元

版权所有 侵权必究

购买本社图书, 凡有缺、倒、脱页者, 本社负责调换

前 言

自 20 世纪 40 年代以来,流式细胞术已经发展成为一门涉及激光技术、流体动力学、电子学、光学、计算机科学、物理学、化学、生物学和数学多学科交融的科学技术。近年来,仪器的革新,小型低能量的激光器的发展,新的荧光素和荧光蛋白的发现,以及新的方法学的应用都对高速发展的流式细胞术的应用起了很大的促进作用。在流式细胞术操作规程完全修订和反映最新成果技术的第 2 版中,领衔的科学研究者们将那些已被时间证明的、前沿的关键性技术准确无误地展示给我们。编者期望最新权威性的流式技术方法汇集的本书不仅能够成为经验丰富流式细胞仪使用者的有价值的参考手册,而且也能对生物学和生物医学科学领域的新手们起到有效的指导作用。

在流式细胞仪介绍一章中,作者从流式细胞术历史开始到对该技术将来的展望结束,为我们概括地描述了流式细胞术全貌和各种不同的应用。第 2 至 22 章包括了实用性很强的详细的操作程序和最新的技术。实验设计的详细介绍,实用的设计技巧,试剂和数据分析工具的选择使得研究者不仅能够将流式技术应用于传统的表型特征分析,而且完全能应用于新出现的基因组学和蛋白组学的研究。为了使操作规程更加完善,作为补充,本书在第 23 和 24 章中前瞻性地介绍了应用未来一代的固体激光在高速分选中防止感染性气溶胶形成的快速方法。

在本书中介绍了一种最新的基于颜色的细胞设门策略,该策略使复杂的多参数资料的分析变得更加简单明了。流式细胞仪复杂的多参数描述最好地证明了在以功能为基础的分子机制的研究可以在单细胞水平进行。这是采用高度特异性抗体,通过鉴别磷酸化蛋白和非磷酸化蛋白来测定细胞内激酶信号级联反应的完美展示;结合免疫表型分型,可以解释在异质性群体中个体细胞独立的生物化学信号事件。其他的操作规程是有关 T 细胞亚群特征分析的如:细胞内细胞因子染色可以应用于对罕见的抗原特异性 T 细胞的定量;四聚体细胞示踪染料可以和细胞因子染色技术相结合,确定抗原特异性细胞前体细胞的增殖频数;抗原特异性细胞毒性 T 细胞的细胞溶解功能,也可以通过采用非核素标记的方法,测定包括不同谱系来源的原代细胞在内的靶细胞内的半胱天冬酶的活化。同时,也阐述了分析凋亡的多种方法,如同时分析半胱天冬酶活化、annexin V 结合膜磷脂酰丝氨酸残基以及 DNA 染料穿膜对 DNA 染色等方法。

我们在本书中向试图涉猎干细胞领域的研究者推荐一些检测干细胞备选的方法。有两种方法可以检测造血干细胞向胞外释放活细胞染料 Hoechst 33342 和罗丹明 123 的能力。由于这些方法避免了确认细胞表面抗原,因此,被广泛地应用于缺乏确定的细胞表面抗原的其他类型的干细胞。第三种方法可以用来研究人造血干细胞表面 CD34 抗原的生物学作用。原代细

胞如造血干细胞十分容易转导外源性基因,因而便于进行细胞研究。来源于水母的绿色荧光蛋白(GFP)和来源于珊瑚虫的 GFP 的类似物是这类研究常用的标记物。与其他的生物发光标记物不同的是,GFP 和 GFP 相关蛋白发生荧光时不需要外源性底物或者协同因子。此外,本书还介绍了一些同时检测多种荧光蛋白质的方法。

采用荧光激活细胞分选仪(FACS)分离细胞是一种非常有效的分离技术。FACS 采用微阵列技术将有助于加速对复杂组织和器官中不同类别细胞基因表达的分析。对于这些技术的最新进展,我们在微阵列和杂交技术一章节中做详细的讨论,当然,其中也包括一些检测活细胞内生物分子间相互作用的创新性方法。荧光共振能量转移(FRET)技术是利用 GFP 的二种光谱变量来确定蛋白质相关的分子。将相关的蛋白与 GFP 构成融合蛋白,使以前因抗体限制而不能采用 FRET 检测的蛋白也能采用 FRET 检测,同时发明了两种利用 FACS 高通量特点研究新蛋白间相互作用的方法。第一个方法是哺乳动物的蛋白质-蛋白质交互作用圈套(MAP-PIT)技术,这是用来筛选复杂 cDNA 文库中新蛋白间相互作用的一种双杂交检测方法;第二个方法是采用流式细胞术快速从酵母菌表面展示文库分离特异性抗原克隆。通过展示酵母菌表面的单链抗体(scFv),不需要通过亚克隆、表达和 scFv 纯化即可进行克隆的亲和力筛选,且可以通过 FACS 快速分选出亲和力最高的克隆。

在其他的章节中,从事基础和临床的科研工作者会看到一些用于细胞周期非同步群体分析,确定 DNA 倍体、RNA 含量和肿瘤细胞增殖状态的方法。书中还介绍了以 FRET 为基础的测定 HIV-1 病毒颗粒与初始 T 细胞融合的方法,这是一种原位的流式细胞染色体杂交检测技术(flow-FISH),可用于检测细胞老化和恶性化过程中端粒长度的改变,是较复杂的末端限制性片段 Southern 杂交方法的改良方法。这种方法还适合于研究其他病毒胞膜蛋白介导的病毒与细胞的融合。

对于有兴趣研究微生物的科研工作者,本书介绍了用于微生物研究的敏感的流式细胞改良检测技术和微生物特异性检测方法学的进展。在细菌多参数流式细胞术分析一章中,介绍了采用流式细胞术检测生理状态下革兰阳性和革兰阴性菌的可靠方法。实现了期待已久的多参数微生物的分析。

我们非常感谢 John Walker 邀请我们参与这项令人兴奋的工作,同时十分感谢他提供了专业的编辑帮助。感谢所有编者的真情投入,他们自愿分享各自最新研究结果的合作精神感染着整个流式细胞术学术界。

Teresa S. Hawley
Robert G. Hawley

目 录

第 1 章	流式细胞术介绍	1
1	概述	1
2	细胞(或粒子或事件)	2
3	激发光	3
4	应用流体学:细胞通过激光束	5
5	细胞信号	8
6	从信号到数据	10
7	从数据到报告	12
8	分选	15
9	结论	18
第 2 章	细菌的多参数流式细胞分析	24
1	概述	24
2	材料	26
3	方法	27
4	注释	29
第 3 章	白细胞的多参数数据的采集和分析	31
1	概述	31
2	材料	32
3	方法	32
4	注释	41
第 4 章	激酶信号级联放大的流式细胞分析	44
1	概述	44
2	材料	46
3	方法	49
4	注释	58
第 5 章	细胞因子的流式细胞术分析	63
1	概述	63
2	材料	64
3	方法	66
4	注释	68
第 6 章	利用细胞示踪染料检测抗原特异性 T 细胞前体增殖的频数	73
1	概述	73

2	材料	75
3	方法	77
4	注释	81
第7章	采用流式细胞术评估淋巴细胞介导的细胞毒作用	84
1	概述	84
2	材料	86
3	方法	87
4	注释	91
第8章	采用流式和影像细胞术多参数分析细胞调亡	94
1	概述	94
2	材料	95
3	方法	95
4	注释	103
第9章	通过边缘群细胞表型检测和富集造血干细胞	106
1	概述	106
2	材料	107
3	方法	108
4	注释	114
第10章	Hoechst 33342 和 Rhodamine123 染色分析造血干细胞特征	119
1	概述	119
2	材料	122
3	方法	124
4	注释	127
第11章	外周造血池动员的 CD34 ^{NEG} 造血前体细胞表型和功能分析	133
1	概述	133
2	材料	134
3	方法	135
4	注释	144
第12章	荧光报告蛋白的多参数流式细胞术	147
1	概述	147
2	材料	148
3	方法	148
4	注释	153
第13章	荧光蛋白表达细胞的流式细胞术分析	159
1	概述	159
2	材料	159
3	方法	160
4	注释	171
第14章	联合应用流式细胞术和基因芯片方法检测转录谱	172
1	概述	172

2 材料	176
3 方法	177
4 注释	182
第 15 章 荧光共振能量转移的流式细胞分析	187
1 概述	187
2 材料	189
3 方法	189
4 注释	192
第 16 章 以荧光激活细胞分选技术为基础的哺乳动物蛋白-蛋白相互作用陷阱系统的建立	196
1 概述	196
2 材料	199
3 方法	199
4 注释	206
第 17 章 流式细胞术筛查酵母菌表面展示文库	209
1 概述	209
2 材料	212
3 方法	214
4 注释	224
第 18 章 基于荧光共振能量转移的 HIV-1 病毒的融合分析	226
1 概述	226
2 材料	227
3 方法	228
4 注释	231
第 19 章 非同步化细胞群体的细胞周期分析	234
1 概述	234
2 材料	235
3 方法	235
4 注释	236
第 20 章 实体瘤 DNA 含量分析	241
1 概述	241
2 材料	242
3 方法	242
4 注释	248
第 21 章 DNA 和 RNA 的同步流式分析	253
1 概述	253
2 材料	253
3 方法	254
4 注释	257

第 22 章	荧光原位杂交和流式细胞术测定端粒长度	262
1	概述	262
2	材料	263
3	方法	263
4	注释	269
第 23 章	小型激光器在流式细胞仪上的应用	273
1	概述	273
2	材料	275
3	方法	279
4	注释	284
第 24 章	通过 BSL-3 实验室分选活的、传染性细胞	287
1	引言(见注释 4.1)	287
2	材料	288
3	方法	288
4	注释	290

第 1 章 流式细胞术介绍

Alice L. Givan

摘 要

流式细胞仪是一类描述细胞(或者其他粒子)的仪器。当细胞一个接一个地从激光光源前通过时,流式细胞仪检测来自于细胞的信号,并把这些相关的信号通过处理形成细胞的特征性描述。在这一章节中,我们将对每一个概念的特征进行描述:细胞适合于流式细胞仪检测的特征;描述细胞特征的方法;应用流体力学的原理使细胞呈单个状态通过激发光源;细胞释放的信号类型以及这些信号的检测;光信号向数码信号的转换;当数据被保存为数据文件后,应用计算机关联和分析参数。在章节的最后,将会讨论应用流式细胞仪分选细胞。本章可以作为全书概要浏览,也可以作为进入本领域的一块敲门砖。本书的其他章节将对特定的主题进行更多的细节性描述、提供更多的参考资料、甚至是一些学术争论的问题。

关键词 流式细胞术,应用流体学,荧光,激光

1 概述

作为流式细胞术的引言章节,首先要介绍流式细胞仪的艰难发展历程。1934年 Andrew Moldavan 描述的一种仪器可以看作为流式细胞仪的一个雏形。尽管它可能从来没有被制造出来过,从该仪器的设计看,它更像一台显微镜,但它在其载物台上有一根毛细管,细胞以单细胞形式在光线前通过物镜时,细胞可以逐个地接受光线的照射。细胞来源的信号可以被附在目镜上的光感应器接受分析。在后来的数十年中,Coulter 和其他研究者发展该仪器,并用其计数悬液中的颗粒,1965年和1967年 Kamentsky 和 Melamed 设计并制造了基于显微镜的流式细胞仪,实现了通过检测光信号鉴别异常的宫颈细胞。在 Kamentsky 论文发表后的数年间,Fulwyler、Dittrich、Göhde、Van Dilla 和 Herzenberg 引领了全新的设计改革,成功制造了一种流式细胞仪,其很大程度上类似于当今的流式细胞仪。和现在的流式细胞仪一样,1969年时的流式细胞仪根本不像显微镜,而是在 Moldavan 的流式细胞仪原型基础上设计的,在 Kamentsky 流式细胞仪上,当单细胞流从激光束前经过时,激光就照射到细胞,然后用光感检测器检测来自细胞的信号(Shapiro 和 Melamed)主编的两本书中更为详细地描述了流式细胞仪的发展历史。即使在今天,流式细胞仪仍然是带有一个照射装置的仪器,当细胞一个一个地通过光源前方,激光照射到细胞上,然后检测和收集激光照射到细胞上所产生的信号。

在这一章中,我们将描述流式细胞仪相关的每一个方面:细胞,照射细胞的方法,应用流体力学的原理确定细胞呈单个地通过照射光束,采用检测仪测量细胞信号,以及最后在信号采集储存为数据文件后,使用计算机将相关信号相互关联起来。作为内容介绍,这一章可作为对流

式细胞术的一个概述来浏览;也可作为本领域的入门教材来阅读。在本书的其他章节(和在其他的书中,例如参考文献第12,第15~24),为一些专题提供了更为详尽的内容,更多的参考资料,甚至一些相关的争论。

2 细胞(或粒子或事件)

在讨论“细胞”之前,我们首先需要介绍一下一些基本的词义。“Cytometer”起源于希腊中的二个字,“κντοζ”意思是容器或身体(以现代的意思就是指细胞)和“μετρον”意谓测量。今天 Cytometers 的意思通常已不再局限于细胞的测量了。“粒子”已作为术语,习惯性地被用来描述任何一个能通过流式细胞仪的物质。“事件”是一个术语,用来描述被仪器诠释的正确的或者不正确的任何单个粒子。更为确切地说,如果细胞计数仪速度不够快,2个粒子非常接近时,就有可能被当做一个事件检测。事实上,大部分的粒子通过细胞计数仪时,被作为单个细胞事件来检测,因此这些概念在这里是可以互换使用的。

因为流式细胞术是针对单个细胞(粒子)的分析技术,因此流式细胞分析人员首先必须获得单个细胞(粒子)悬液。以往采用流式细胞术分析的细胞(粒子)通常是来源于血液的细胞;因为它们以单个细胞的形式存在,而且在进行流式细胞术分析前不需要任何的处理,所以它们是适合该技术的理想材料。尽管黏附细胞需要通过某些处理,使它们与支持它们生长的培养基表面分离,但人工培养的细胞或细胞系也可以进行流式细胞术分析。最近,细菌、精液和浮游生物也可以采用流式细胞术分析。流式技术也被用来分析一些不是细胞的单个粒子(例如病毒、细胞核、细胞染色体、DNA 片段和乳胶颗粒)。此外,当细胞不是以单个状态存在时,可以采用机械分离和酶消化的方式将其变成单个细胞状态以适合于流式细胞仪的分析。组织也可以被解聚形成单个细胞,然后这些细胞就能通过流式细胞仪进行检测。采用单个细胞分析方法的好处就是能高速扫描检测细胞(其速率在每秒500到>5000个粒子),大量细胞的个体特征被扫描、收集、关联和分析出来。单细胞技术的缺点是当细胞不是以单个粒子的形式存在时,需要采用各种方法使其分散;而当组织细胞被分散后,单细胞的某些特征就会被改变,组织细胞的结构和分布的信息就遗失了。

在流式细胞术中,细胞(粒子)是处于一个狭窄的液流中流动,并于一个狭窄激光光束前通过,因此流式细胞仪分析的细胞(粒子)大小是有限制的。一般而言,细胞或粒子的直径必须在 $1\sim 30\mu\text{m}$ 。特殊的流式细胞仪能够增加处理较小的粒子(如DNA片段或较小的细菌)的敏感性,或者通过宏大的流控技术处理较大的粒子(如植物细胞)。但是普通的流式细胞仪,一方面没有足够的敏感性来检测十分小的单个粒子,另一方面如果粒子非常大,会造成仪器液流通道的阻塞。

流式细胞术分析的细胞(粒子)应该悬在缓冲液中,浓度在 $5\times 10^5/\text{ml}\sim 5\times 10^6/\text{ml}$ 。在悬液中,它们通过流式细胞仪几乎是一个接着一个的。从每个粒子散射出来的光被检测并以文件的形式储存起来,以便随后的分析。术语发射光是指细胞(粒子)在接受激光束照射后发出散射光,然后这些散射光线会被检测到。粒子发射出的光有些不是散射光,而是荧光。许多粒子(特别是浮游生物)有自然的背景(自发的)荧光,而且可以被流式细胞仪检测到。在大多数情形下,没有实质性有意义的自发荧光的粒子将会在样品准备的时候被荧光染料染色,从而使本来没有荧光的化合物被流式细胞仪所“看见”。荧光染料是一种吸收某种特定颜色的光,然后发出不同颜色的光(通常是比较吸收光波长更长的光)。荧光染料可以与抗体耦联结合,在这种情况下,通过对细胞荧光的检测即可确定与抗体相结合的蛋白或抗原的数量(位于细胞表

面上或细胞质或核)。一些荧光染料耦联的分子能用来检测细胞凋亡。此外染料在与细胞成分结合的时候本身可能发出荧光。例如,以 DNA 敏感的荧光染料对细胞进行染色,就可以从恶性细胞和正常细胞混合群体中区分出多倍体的恶性细胞;结合数学算法可以研究在细胞周期的不同阶段中细胞的比例;也可以采用限制酶切的方法,依照细菌的 DNA 片段的大小对细菌进行分型。有些荧光染料它们所发出的荧光的差异与细胞质中的钙离子或质子浓度,甚至是跨膜或细胞器膜电位相关。在这些情况下,细胞的荧光可能表明细胞对刺激的应答。还有一些染料因其能在子代细胞中均匀分布,所以可以用来对分裂中的细胞进行染色分析,细胞的荧光强度表明细胞发生分裂的数量。在本书的许多章节中我们将详细介绍各种荧光染料以及它们的应用。此外,Richard Haugland 的分子探针(Eugene,奥勒冈州)手册是很好的一本指南,其中包括了大量的关于荧光分子的信息。

重要的是要知道用于细胞荧光染色的染料本身必须要适合于流式细胞仪的检测。这就需要掌握荧光染料激发光波长、仪器的光电检测器前方的滤镜的特定波长和染料本身吸收光和发射光谱特性等方面的知识。常用于细胞染色的荧光染料必须要能够吸收特定波长的激发光,且检测器必须配置合适的滤镜确保能够检测到荧光染料发出的荧光。为了有利于本章节描述,我们假设我们现在已经有浓度约为 $10^6/\text{ml}$ 细胞(粒子)悬液,而且已经过具有合适波长光谱特征的荧光染料染色(或带有自发荧光)。

3 激发光

对于大多数的流式细胞仪,荧光染色的细胞的激发光通常来源于激光光源。由于它们能提供狭窄而强烈的光束,因此激光很适合于此。含有粒子的液流能够快速通过这个激光束,在理想的状态下,在一个时间点只有一个细胞(粒子)将会被激光照射到,且激发光足以使细胞(粒子)产生散射光,且荧光的强度足以被检测到。

当今的流式细胞仪其激光主要采用气体激光(如氩离子激光或氦-氖激光)或固体激光(如红色或绿色的二极管激光或相对较新的蓝色和紫色激光)。这些激光通常产生特定波长的激光(表 1-1)。基于激光媒介的特性,对于一个给定的激光光源来说,其激光的波长是确定的,而且是不能改变的。当代采用光学分光棱镜的流式细胞仪最常采用的激光是氩离子激光;它被早期流式细胞仪所采用的激光器,因为它发射的蓝绿色激光(488nm)能够被一种长期应用于荧光显微镜的荧光染料荧光黄很好地吸收。氩离子激光也能产生绿色荧光(514nm)、紫外激光(波长为 351nm 和 364nm)和一些低能量的其他颜色的激光。有些流式细胞仪还仅采用氩离子激光器产生的 488nm 的激光;也有一些流式细胞仪允许选择氩离子激光器发射的其他波长的激光。

表 1-1 现今使用的激光器常见类型

激 光 器	产生的激光波长(nm)
氩离子	通常产生 488,514,UV(351/364)
红色 氦-氖(He-Ne)	633
绿色 氦-氖(He-Ne)	543
氩离子	通常产生 568,647
紫色二极管	408
蓝色固体	488
红色二极管	635

然而早期的流式细胞仪采用单个氩离子激光器,用 488nm 激光从荧光黄[以及稍后采用的其他荧光染料如:藻红蛋白、碘化丙啶、多甲藻素叶绿素蛋白质(PerCP),和各种不同串联组合荧光染料—都能吸收 488nm 的激光]激发出荧光,这就增加对能够激发出不同光谱的荧光染料的需求,从而使得具有各种不同特征(抗原)的细胞能够同时染上多种荧光染料,通过荧光颜色区别不同的荧光染料,从而区别细胞的不同特征。这些需求导致了对不同波长的激发光的需求,因此流式细胞仪上的激光光源也随之而增加。例如现在的研究型流式细胞仪一般都拥有如表 1-1 所列的 2 个或者 3 个激光器。

拥有一个以上激光器的流式细胞仪,在沿着液流的方向上,其来自每个激光的光束能聚焦在不同位点的细胞上(图 1-1)。每个细胞依次经过每个激光光束。这样,不同激光激发细胞产生的不同的散射光和荧光信号到达光电检测器时,就存在着确定的空间和时间的顺序。因此,来自细胞的信号就能与一个特定的激发光波长相关联。

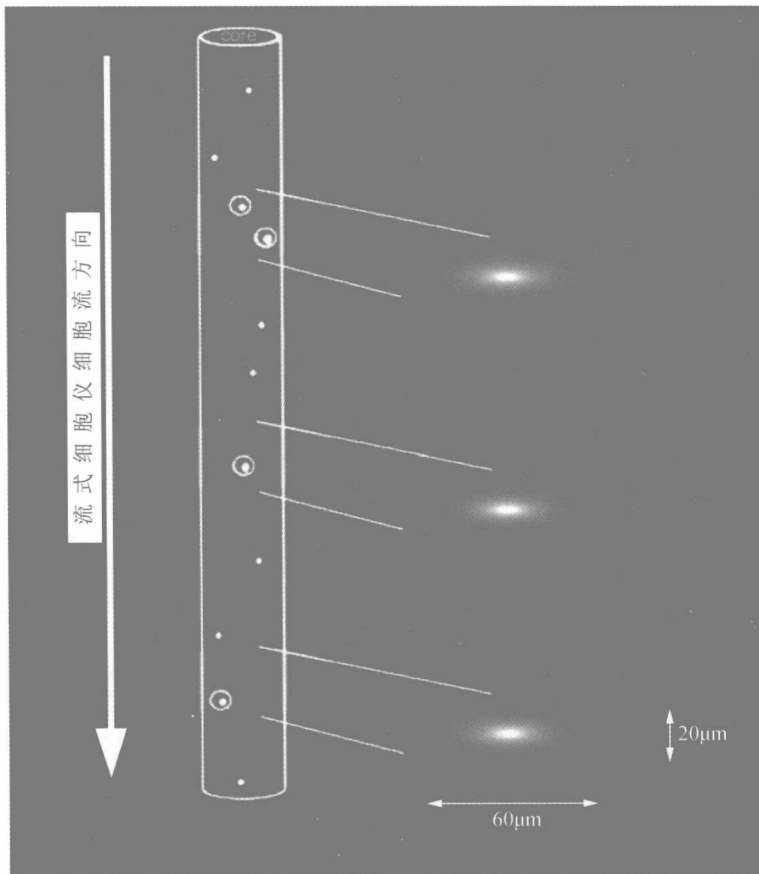


图 1-1 流式细胞分析仪中流过激光束分析点的细胞(三激光流式分析仪)

激光束的椭圆形横断面允许细胞快速进入该断面,主要是要避免两个细胞同时进入激光束(但可在第 1 个分析点中见到两个重叠的细胞),另外,椭圆形的光束提供了更均质的光度,以免细胞偏离光束中心后形成的偏差

流式细胞仪揭示细胞的所有信息来源于细胞在激光束中的那段时间。这段时间开始于细胞进入激光束的前沿到其离开激光束另外一侧边缘为止。在这个位置,激光束横断流动细胞

流称为“探测点”“分析点”或“观察点”。如果仪器有一个以上的激光器,那么就会有多个分析点。在标准的流式细胞仪中,激光束将会有个椭圆的横切面区域,其中央区亮度最高,测量的区域范围大概在 $(10 \sim 20\mu\text{m}) \times 60\mu\text{m}$ 。激光光束的高度范围 $(10 \sim 20\mu\text{m})$ 标志着分析点的高度范围,也是细胞通过的范围。在商用型和研究型流式细胞仪中,细胞以 $5 \sim 50\text{m/s}$ 的速度流过每个分析点。因此细胞通过激光束的时间大概 $0.2 \sim 4\mu\text{s}$ 。因为荧光染料通常吸收光,然后在几个纳秒的时间范围内发出光,因此,细胞处于每个分析点的时间是细胞吸收光和发出光的时间的几千倍。

4 应用流体学:细胞通过激光束

与传统的显微镜相反,在流式细胞仪中,细胞(粒子)是流动的。换句话说,细胞(粒子)需要被混悬在液体中,每个细胞(粒子)在一个短暂和确定的时间段中接受激光照射,激发并通过分析点,然后被检测和分析。这就意味着在一个很短的时间段中,有许多细胞可被分析,且获得大量细胞的统计信息。单一细胞流的缺点,就是前文中提到的细胞(粒子)需要分散和悬浮在液体中。但是,如果细胞具有聚集的倾向,那么理论上的单一细胞悬液往往会含有细胞团,或细胞在浓缩的悬液中可能有假性的细胞团,那么这些细胞就能与其他细胞一起同时到达流式细胞仪的分析点。即使悬液中细胞浓度很低,总还是有可能发生多个细胞同时到达分析点这种巧合事件(图 1-2)。因此,流式细胞仪在设计中会尽可能避免多个细胞同时到达分析点;此外,应用流体学设计还必须使得每个细胞很容易接受相似的激光照射,结构上要避免流体管道被阻塞,而且要保证细胞液流尽可能快速地进出分析点(使得细胞通过分析点时,能产生足够强的散射光和荧光,从而提高检测的灵敏度)。

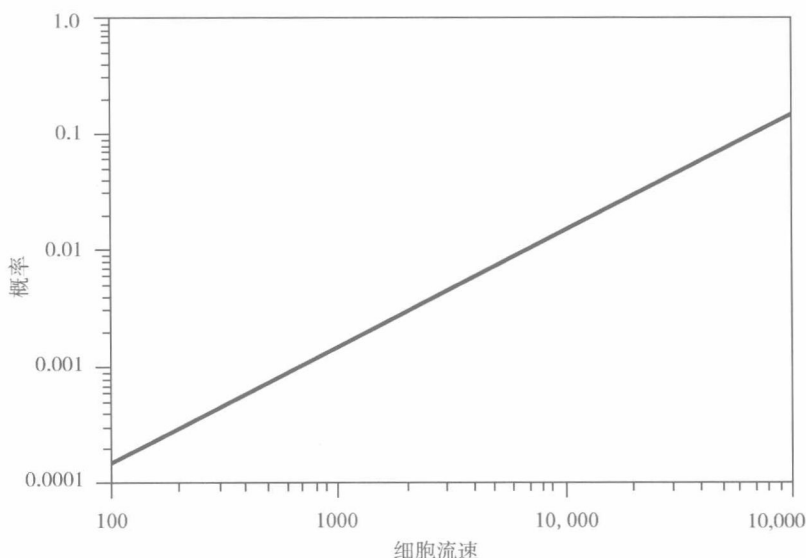


图 1-2 当多个细胞在某个分析点重叠时可引起流式细胞仪只能检出一个信号

针对此模式,激光束应被调整到 $30\mu\text{m}$,同时液流应达到 10m/s 。(重版获 John Wiley & Sons 同意, Givan, A. L. 版权, *Flow Cytometry: First Principles*, 2nd edit. Wiley-Liss, New York.)

要使细胞只通过激光束均一亮度的中心,一种方法是采用一个带有很狭窄内径的透光小室,或者选择一个带有很小孔径的喷嘴来迫使细胞通过光束中心。而细胞通过小孔径喷嘴或者狭窄内径的小室所面临的主要问题是如果细胞较大或者聚集容易阻塞通路。使得细胞集中液流不堵

塞的设计是基于1953年 Crosland-Taylor 研究结果所总结的流体力学原理。他强调“迄今为止, 尝试计算通过小管的悬液中的小粒子还并不十分成功。对于像红细胞一样的粒子, 实验者一定要选择一个相对较宽的小管, 使得两个甚至更多的粒子能够并排通过一个特别区段, 否则狭窄的小管, 其内容物因小管和悬液间不同的折射率而难以被精细地观察到。除此之外, 狭窄小管还容易被阻塞。”Crosland-Taylor 将细胞限制在集中液流中的策略是把采取预防阻塞措施的细小液流通过狭窄的小管或小孔, 把细胞悬液喷射入一个直径较宽的快速流动的液流中央(鞘液流), 而根据流体力学的原理, 细胞在较宽的水流的中心自然将被限制在一个狭窄的核心。这种流体力学的液流集中导致轴流(在一条较宽的鞘液流核心中流动的一条细胞的狭窄液流)的形成; 这个原理首先被应用于 Crosland-Taylor 设计的流式细胞仪中, 他意识到这是一种能把细胞限制在精确位置, 而又不需要容易阻塞的狭窄液流的一种方法。“细胞液流”在流式细胞仪中的位置就是射入鞘液流的样本液流(图 1-3 和图 1-4)。在进入鞘液流之后, 细胞悬液的速度(m/s)增加或减少与鞘液流的速度相等, 其结果是当维持相同的样品液流体积与流速比值(ml/s)时, 核心所包含细胞液流的直径的增加或减少将会导致液流速度的改变。因此, 细胞悬液被注入的比率将会直接影响限制在激光束中央的细胞核心液流的宽度和强度。

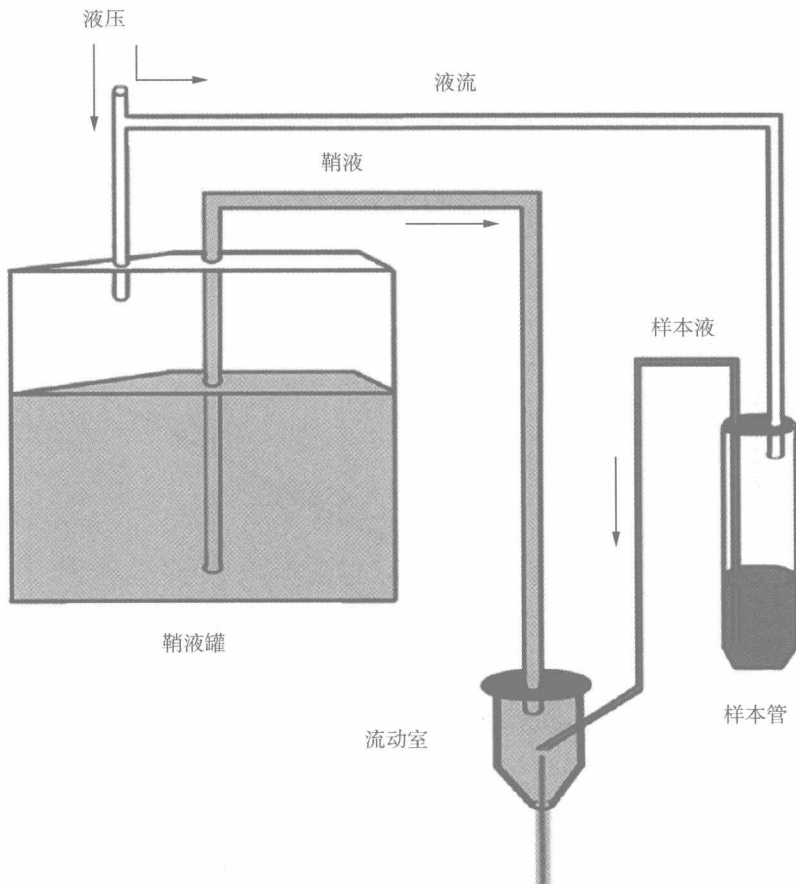


图 1-3 流式细胞仪的液流系统利用气压推动样本悬液中的细胞和鞘液进入流动室

(重版获 John Wiley & Sons 同意, Givan, A. L. 版权, Flow Cytometry: First Principles, 2nd edit. Wiley-Liss, New York; Principles of flow cytometry: an overview, in Cytometry, 3rd edit. [Darzynkiewicz, Z., et al., eds.], Academic Press, San Diego, CA, pp. 415-444.)

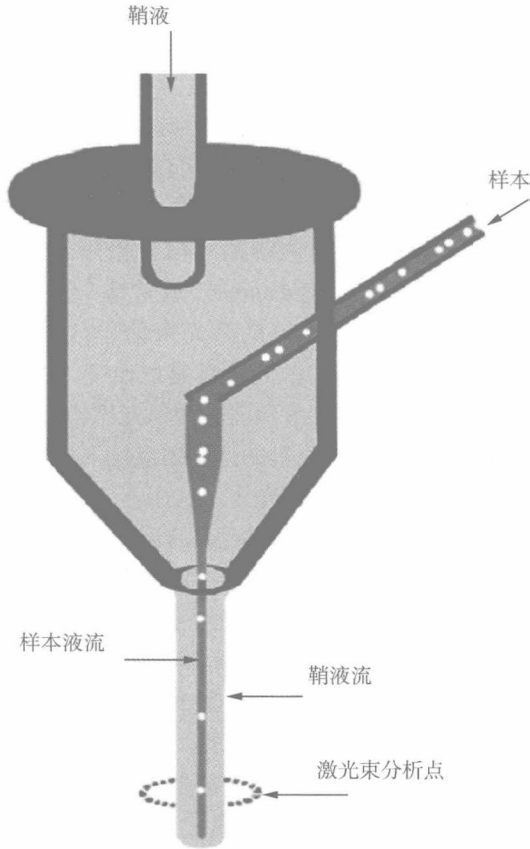


图 1-4 流动室,细胞随着鞘液流动并在鞘液中形成中心细胞液柱
流动室出口的小口径使得鞘液和细胞液柱非常细并快速流动,同时也使细胞相互分开以避免在同一分析点上同时出现

当采用液流的力量使细胞在较宽的鞘液流中聚集并逐个排列,可以使细胞阻塞很少发生。但为了很好地把细胞限制在激光束最亮的中心,并避免多个细胞同时处于分析点,仍然需要对细胞进行快速的分析。这些特性是为了细胞流而设计的。一些流式细胞仪的激光照射细胞流时,是当细胞流处于一个透光区域中(就像在一个透明的玻璃小室中,即流动室),而其他流式细胞仪系统采用细胞流从一个孔口(即喷嘴)喷出的位置上采用激光束从液流的横断方向检测细胞流。在所有的流式系统中,细胞流藉由一个出口直径比入口直径狭窄的方式增加液流的速度。这两个不同的直径通常相差 10~40 倍,其所导致速度的增加达 100~1600 倍。当整个水流(在鞘液流中心含有细胞悬液)向细胞流出口处前行时,管腔的直径越狭窄速率增加越快。伴随着管腔逐渐变窄,液体的速率逐渐增快,细胞的路径被紧紧地约束在激光束的中央,以便在所有的细胞快速地通过激光束时,受到同样的激光均衡地照射。除此之外,细胞在这样很狭窄的液流中相互之间的距离更大,因此细胞就不可能同时到达分析点。

总之,关于流式细胞仪的应用流体学是通过水的动力学使细胞聚集在一条较宽的鞘流中央的轴流中,加上液流通过狭窄的小管和喷嘴,从而使得细胞在激光束的中心位置容易排列成队而不存在黏堵的问题。除此之外,细胞流自身也增加水流的速度,同时增加细胞被分析的比率,而这种增加的速度也使得轴流变窄,进而使细胞在亮度均一的激光束中央更精确地排列成

队。同时,增加液流中细胞之间的距离,也减少了细胞同时达到分析点的巧合事件的概率。

5 细胞信号

在分析点周围的透镜收集来自受到激光照射后的细胞光信号。典型的流式细胞仪带有 2 个透镜,一个位于与激光束路径相同方向上(译者注:前向),另外一个位于与激光束成直角的方向上(译者注:垂直向,也称侧向)(图 1-5)。当细胞通过分析点的时候,这些透镜收集每个细胞被激光照射后发出的光信号,通过前向透镜把光信号聚焦到光电二极管上。在前向透镜的前方有个阻断(或者“暗化”)光栅,大概有 1mm 宽,放置这个光栅的主要目的是阻断激光照射液流时自身透过(译者注:而非经细胞折射)的激光束信号。只有当激光束照射液流时,被液流中的颗粒(译者注:细胞)折射或散射的激光信号是以改变方向上绕过阻断光栅,才被前向放置的透镜和其后的光电二极管收集到。光落到前向散射光感检测器上是由于光束被细胞折射后小角度地改变了光的方向:被光电二极管收集的这个角度的三维空间范围内,光线是来自介于被光栅阻挡的光线和超出透镜直径光线之间的光线。这个落到光检测器上的光线称为前向散射光(“fsc”)或前角散射光(“fals”)。然而对于任何给定的流式细胞仪来说,要精确地对其所收集的光进行光学定义的话,前向散射光无论是从细胞生物学或者从细胞化学都很难准确定义。一个细胞有很大的界面区域会折射大量的光线到光感检测器上。但是当一个大细胞的折射指数十分接近介质(例如,一个死细胞有一个通透的细胞膜),其所折射的光线要少于折射指数与介质完全不同的同样大小的细胞。由于大量通过光栅的折射光与颗粒的大小之间的粗略的关系,前向散射光信号有时(误导)反映了“体积”的信号,所以这个术语的含义很复杂。

在激光束垂直角方向的透镜收集的光,是那些已经散射到与原来方向有较大角度方向的光。这个透镜收集的光由透镜的直径和光线与分析点之间的距离所定义,被称为侧向散射光(“ssc”)或垂直(90°)散射光。激光主要是被细胞不规则的表面或细胞质散射到这些区域的。粒细胞因为有不规则的核,因而比球形核的淋巴细胞散射更多的光线到侧向。同样地,纤维母细胞与单核细胞相比会产生更多的侧向散射光。

到目前为止,所描述的光信号(前向散射和侧向散射)是与激发细胞的激光相同颜色的光信号。在单激光系统中,这种光信号通常是来源于氩离子激光器 488nm 的激光;而在双激光系统中散射光通常也来源于 488nm 激光器,因为光信号的采集来源于主激光。正如我们已经描述的那样,散射光主要反映了细胞的物理学特征信息。除了散射光之外,细胞也可能发出荧光:荧光的定义是当一种物质吸收较高能量光照射后,以一种相对较长的波长和较低能量光子形式释放来自高能量光源的能量。荧光素(译者注:通常是指异硫氰酸荧光素, FITC)吸收 488nm 的光然后发出大约 530nm 的荧光。藻红蛋白(译者注:Phycoerythrin, PE)吸收 488nm 的光然后发出大约 580nm 的荧光。因此,如果一个细胞采用异硫氰酸荧光素标记的特异性抗体和藻红蛋白标记的另一特异性抗体染色后通过 488nm 的激光束,那么它将会发出 530nm 和 580nm 的荧光。一些细胞也可能带有自发荧光的分子(像是叶绿素、吡啶或核黄素)。除此之外,细胞能被其他探针染色,其荧光的多少取决于细胞内的 DNA 或钙离子的量。所有这些情况,来自细胞的荧光强度在可测定的范围内与抗原的表达丰度、细胞内 DNA 或内源性(荧光)分子或钙离子浓度相关。荧光强度的测定对通过激光束的细胞的表型和功能有所提示。

对荧光的检测和侧向散射光的检测一样,但附加了波长特异性的棱镜和滤光器。这些棱镜和滤光器的设计,使它们能传输和反射确定波长的光。从分析点向一侧发出的光线被透镜聚焦到一系列的分色棱镜和带通滤光片上,分成多种颜色的光线,根据光线的颜色,分别照射