



宋平根 李素文 主编

流式细胞术 的原理和应用

Q2-33
SPG

北京师范大学出版社

122357

流式细胞术的原理和应用

宋平根 李素文 主编

北京师范大学出版社

(京) 新登字 160 号

流式细胞术的原理和应用

宋孚根 李素文 主编

*

北京师范大学出版社出版发行

全国新华书店经销

中国科学院印刷厂印刷

开本: 787×1092 1/32 印张: 8.5 字数: 173 千

1992 年 3 月第 1 版 1992 年 3 月第 1 次印刷

印数: 1—2 000

ISBN 7-303-01335-0/Q·26

定价: 5.20 元

本书作者

(按各章顺序排列)

宋平根	北京师范大学
李素文	北京师范大学
刘洪祥	卫生部工业卫生实验所
高凤鸣	卫生部工业卫生实验所
薛绍白	北京师范大学
刘成贵	解放军总医院基础所
左连富	河北省肿瘤研究所
陈珊珊	北京医科大学人民医院

序

流式细胞术是本世纪 70 年代发展起来的一种对细胞的物理或化学性质,如小大、内部结构、DNA、RNA、蛋白质、抗原等进行快速测量并可分类收集的高技术,它综合了激光技术、计算机技术、半导体技术、流体力学、细胞化学等各门学科。其特点是:快速,最高每秒可测数万个细胞,并在短时间内得到大量数据,统计学意义明显;能进行多参数相关测量,以获得参数间大量的相关信息;能依据测量的信息,对细胞群体的各种亚群进行分类收集,即分选,如对人类不同染色体的分选,做成每条染色体的 DNA 文库,为人类染色体基因组的研究提供重要条件。

在 80 年代中后期,流式细胞术由基础转到临床应用。对肿瘤 DNA 倍性的测定可用于肿瘤的诊断、治疗和预后上。此外,还用到了—些血液病的分型和肿瘤的抗药性研究等方面。在单克隆技术与流式细胞术相结合后,建立了检测抗原相关表达的新技术,也已应用到临床中。80 年代末,更在植物杂种育种、家畜的 X、Y 精子分选以实现性别控制等方面得到了发展。总之,这是一项颇有生命力的新技术,是还在不断发展的新技术。

我国在 70 年代末,上海第二医学院、北京师范大学等单位已开展了这方面的工作,1981 年国内引进了第一台商品仪器,到现在,10 年间已发展到 70 多台,中国大陆和中国台湾

大约各占一半。应用领域也从细胞生物学基础研究扩大到肿瘤学、血液学、免疫学、药理学、临床检验等各方面，学术活动和国际交流也日益频繁。但是，国内尚无一本全面介绍流式细胞术的书籍，因此，我们在多次讲授流式细胞术的教学基础上，早在1986年已开始编写此书。但因种种原因，时至今日，在北京师范大学出版社的大力支持下，此书才得以出版。

本书的目的是向读者较全面地介绍流式细胞术的仪器原理、测量方法、样品制备、数据分析以及主要的应用领域。参与编写者都是国内有关专家，都有使用这项技术的经验，因而能兼顾到理论与实践并重的原则。本书在注重基础性的同时，还注意到内容的新颖，如对植物育种、胞内钙离子测量等新技术也做了介绍，文献则一直引到1990年，以供读者进一步深入了解时查阅。相信本书对推进我国发展、推广流式细胞术可起到促进作用。

本书的第一、二、五章由宋平根编写，第三、四章由李素文编写，第六章内容涉及面较广，由宋平根、刘洪祥、高凤鸣、薛绍白共同编写，第七章由左连富、刘洪祥编写，第八章由刘成贵编写，第九章由陈珊珊编写。

对认真协助审阅本书有关章节的中国中医研究院基础所医学工程室庞大本主任和池旭生副研究员致以谢意。

鉴于流式细胞术是一门较新的技术，涉及面很广，本书很可能存在这样或那样的问题，希望读者能提出批评、建议，俾便今后有机会时能加以修改。

薛绍白 宋平根

1991年4月于北京师范大学生物系

目 录

第 1 章 流式细胞术的发展简史	1
第 2 章 仪器原理	7
2.1. 概述	7
2.2. 流式细胞计的工作原理	8
2.3. 散射光的测量	10
2.3.1. 前向角散射	11
2.3.2. 侧向散射	13
2.4 荧光测量	16
2.4.1. 光源	17
2.4.2. 滤片	19
2.4.3. 检测器——光电倍增管和硅光电二极管	20
2.4.4. 光谱重叠的校正	23
2.4.5. 自发荧光	23
2.4.6. 荧光的线性测量和对数测量	24
2.4.7. 细胞群体的 DNA 直方图和变异系数	25
2.5. 液流系统	29
2.5.1 稳流和雷诺数	30
2.5.2. 喷嘴	31
2.5.3. 流动室	33
2.5.4. Coulter 效应	35
2.6 细胞分选器	36
2.6.1. 小水滴的形成	36
2.6.2. 水滴的充电与偏转	38

2.6.3. 决定逻辑.....	39
2.7. 缝扫描.....	39
2.8. 流式细胞计的技术指标.....	41
2.9. 标准样品.....	44
2.9.1. 标准样品的性质.....	46
2.9.2. 非生物学标准样品荧光微球.....	46
2.9.3. 生物学标准样品.....	47
第3章 细胞的参量和荧光探针.....	52
3.1. DNA、RNA 含量.....	52
3.1.1. PI 和 EB.....	54
3.1.2. MI 和 CA ₁ 和 Olivomycin.....	56
3.1.3. HO33342、HO33258 和 DAPI.....	56
3.1.4. 7-AAD.....	58
3.1.5. AO 和 PY.....	58
3.2. DNA 碱基组成.....	61
3.3. 染色质结构.....	62
3.4. 总蛋白含量.....	63
3.5. 抗体和其他分子的共价标记.....	64
3.6. 细胞的活性.....	69
3.7. DNA 合成.....	70
3.8. 细胞膜电位.....	70
3.9. 细胞内 pH.....	75
3.10. 细胞内的钙.....	78
3.11. 细胞膜的流动性或微粘度.....	84
3.12. 流式细胞术荧光探针的发展前景.....	85
第4章 流式细胞术的样品制备.....	88
4.1. 单层培养细胞分散为单个细胞.....	88
4.2. 实体组织分散为单个细胞.....	89

4.2.1.	实体组织分散为单个细胞的原则	89
4.2.2.	实体组织分散为单个细胞的方法	91
4.2.3.	实体组织分散为单个细胞的实例	95
4.3.	流式细胞术进行 DNA 分析时样品的长期保存方法	97
4.4.	实体瘤细胞脱核制备	98
4.4.1.	一步快速核分离和染色程序	98
4.4.2.	多步核分离和染色程序	100
4.5.	石蜡包埋组织的流式细胞样品制备	102
4.5.1.	石蜡包埋组织的流式细胞样品制备	103
4.5.2.	从石蜡包埋组织分离细胞核的另一个方法	103
4.5.3.	石蜡包埋组织脱核的参考标准——切片厚度和荧光染色	104
4.5.4.	对石蜡包埋组织脱核的分析	105
4.6.	染色体悬浮液的制备	105
第 5 章 数据的获取与分析		108
5.1.	数据的显示	109
5.1.1.	单参数直方图	109
5.1.2.	二维点图	110
5.1.3.	二维等高图	111
5.1.4.	假三维图	112
5.1.5.	多维数据的显示	113
5.2.	数据分析	115
5.2.1.	非参数分析	115
5.2.2.	DNA 直方图的比较分析	116
5.3.	DNA 直方图的定量分析	118
5.3.1.	矩形作图法	119
5.3.2.	峰反射作图法	120
5.3.3.	作图法的误差	121

5.4.	DNA 直方图的参数分析	123
5.4.1.	二阶多项式拟合法	124
5.4.2.	多正态拟合法	127
5.4.3	DNA 直方图参数拟合分析的误差	129
5.5.	细胞周期各时相的时间	130
5.6.	双参数图分析	131
5.7.	多参数数据分析	133
第 6 章	流式细胞术在细胞生物学中的应用	140
6.1.	细胞群体的各周期时相百分比	140
6.2.	DNA 合成速率	142
6.3.	细胞周期参数的测定	145
6.4.	用溴脱氧腺嘌呤核苷单克隆抗体研究细胞周期	147
6.5.	用多参数流式细胞术研究细胞周期	151
6.5.1.	多参数流式细胞术	151
6.5.2.	DNA 含量及细胞大小	152
6.5.3.	DNA 含量和 RNA 含量双参数相关测量	154
6.5.4.	由双参数图分析细胞周期各亚时相	156
6.6.	药物对细胞周期的影响	159
6.7.	流式细胞核型分析	162
6.8.	在分子遗传学领域中的应用	165
6.9.	精子和雄性生殖细胞的研究	166
6.9.1.	DNA 含量的高分辨率测量及分选	167
6.9.2.	用于精细胞的研究	168
6.10.	在微生物学中的应用	171
6.10.1.	仪器、方法与技术关键	171
6.10.2.	细菌的细胞周期	173
6.10.3.	病毒与细胞的相互作用	174
6.11.	测量细胞突变作用	175

6.11.1.	对致突作用的测定	175
6.11.2.	对体外细胞突变的测定	175
6.11.3.	基因扩增	176
6.11.4.	致丝裂性的测定	176
6.11.5.	次黄嘌呤鸟嘌呤核糖基转移酶 (HGPRT)	176
6.11.6.	血色蛋白变异株	177
6.11.7.	血型蛋白 A 变异株	177
6.12.	流式细胞术在植物细胞中的应用	177
6.13.	细胞内游离钙的流式测定	185
第 7 章 流式细胞术在免疫学中的应用		187
7.1.	流式细胞术应用于免疫研究中的技术问题	187
7.1.1.	流式细胞术在免疫研究中的多功能特点	187
7.1.2.	荧光滤片	189
7.1.3.	免疫技术用荧光染料	190
7.1.4.	阳性细胞群体标准及荧光强度的判定	193
7.1.5.	免疫荧光标本的制备	195
7.1.6.	免疫荧光标本的特殊处理技术	196
7.1.7.	设备消毒	199
7.2.	流式细胞术在免疫生物学和免疫技术研究上的应用	199
7.2.1.	细胞表面标记及抗原决定簇性质的研究	199
7.2.2.	细胞抗原表达的研究	201
7.2.3.	免疫和肿瘤细胞测定及分选中的应用	203
7.2.4.	克隆细胞及杂交瘤的选择和鉴定	204
7.3.	FCM 在免疫功能测定中的应用	205
7.3.1.	细胞介导细胞毒试验	205
7.3.2.	吞噬功能实验	206
7.3.3.	循环免疫复合物的测定	207
7.3.4.	其他免疫指标的检查	207

第 8 章 流式细胞术在肿瘤学中的应用	210
8.1. 实体肿瘤组织单细胞悬液样品制备方法	210
8.1.1. 酶学方法	210
8.1.2. 化学方法	212
8.1.3. 机械性方法	213
8.2. 实体肿瘤组织单细胞核(裸核)悬液样品的制备	214
8.3. 石蜡包埋肿瘤组织单细胞样品制备	215
8.3.1. 石蜡包埋组织单细胞分散的方法和步骤	216
8.3.2. 石蜡包埋组织单细胞样品制备方法存在的问题	218
8.4. 流式细胞术在肿瘤学中的应用	220
8.4.1. 流式细胞术在检测癌前病变和协助 肿瘤早期诊断中的应用	220
8.4.2. 流式细胞术在肿瘤细胞学诊断中的应用	223
8.4.3. 流式肿瘤 DNA 异倍体	225
8.4.4. 流式 DNA 异倍体对交界性肿瘤诊断的意义	226
8.4.5. 流式 DNA 倍体分析在恶性肿瘤预后估价中的 作用	226
8.4.6. 流式细胞术评价肿瘤化疗疗效的作用	228
第 9 章 流式细胞术在血液学中的应用	232
9.1. DNA 倍体分析	232
9.2. 细胞增殖周期分析	234
9.2.1. 细胞周期分析的方法	234
9.2.2. 细胞周期分析的意义	235
9.3. 血细胞免疫学研究	239
9.3.1. 正常血细胞分化成熟的研究	240
9.3.2. 在急性白血病免疫分型中的应用	246
9.4. 残存白血病的研究	248
9.5. 血小板病的研究	251

9.6. FCM 在分子生物学研究中的应用	252
9.7. 几种染色方法	254
9.7.1. 蛋白质-DNA 染色法	254
9.7.2. 吖啶橙(AO)染色法	255
9.7.3. 免疫抗体标记与 DNA 双染色法	255
9.7.4. DNA 与 ras 基因蛋白检测法	255
9.7.5. PCNA与 DNA 双染色法	256

第 1 章 流式细胞术的发展简史

流式细胞术(Flow Cytometry, 简称 FCM) 是对细胞或细胞器快速测量的高技术。依赖测量的参数, 还可以用物理的方法将一个群体中的亚群分选出来, 这就是流式细胞分选术。上述的“流式”, 指的是在测量过程中细胞是流动的, 不是静止的, 这是与在此以前对细胞测量技术的最大差异之处。流式细胞术目前在国外的一些有关实验室、医院已发展成常规技术, 在我国, 经过十年的推广也逐渐普及。经过数十年的努力, 流式细胞术从一个只能计数, 稍后可测粒子大小的仪器, 发展到今天可快速定量测定同一个细胞的多种化学的和物理的特性, 这中间凝集着许多人的心血, 既有成功, 也有失败。

第一个报道自动计数细胞的是 Moldavan(1934年), 他描述了一个装置: 悬浮的血红细胞或是用中性红染色的酵母, 在显微镜的载物台上从一个毛细玻璃管中流过, 每个通过的细胞可被一个光电装置纪录下来。他注意到了一系列技术上的细节。但此后一直没有进一步的报道。现在, 人们都把这个实验看成是有关流式细胞术的第一个尝试。1941年, Kielland 申请了一个专利, 大体上与 Moldavan 差不多, 没有什么更新的内容。

通过这些实验, 人们发现, 在流式细胞计细胞要流过的狭窄管道中存在的最大问题是大细胞或细胞团阻塞通道, 为解决这个困难, 人们不禁想起 1883年 Reynolds 用来研究管子

中层流时使用的鞘液原理。Gucker 等人在 1947 年就是用这个原理和光电技术结合起来对气溶胶中的粒子进行计数。随后，Grosland-Taylor 利用同一原理在 1953 年设计了一个流动室，用光学方法来计数血细胞。他让悬浮的细胞慢慢地注入快速流动的液柱中，这个液柱外面被层流鞘液包围着，粒子在轴心流动。这样做有两个好处：一是消除了大个颗粒阻塞现象；二是它可精确控制粒子进入液柱的位置，使之在轴心上，这样就建立了流体动力聚焦的原理。今天，几乎所有流式细胞术的液流原理都采用了上述技术。

1949 年，Wallance Coulter 申请了一个名叫“流动的悬浮粒子计数方法”的专利，在专利的方法中，他使粒子通过一个小孔。只要粒子与悬浮的介质间在电导率上有差异，小孔中粒子的存在与否即能引起可检测出的电特性变化，此现象通常这被称为 Coulter 效应，他在此基础上生产了 Coulter 计数器(1956 年)。此后，还有一些人发展了各种粒子测量设备，但原理上都差不多。其中 Parker 和 Horst 在 1953 年申请的专利“同时计数红、白血细胞的方法”，是用稀释的血细胞悬浮在等渗液中，白细胞染成蓝色，红细胞仍为红色，细胞通过一根导管再被一束光照射，透射光被分成红、蓝两个成分并分别送到光电池上，这样就可纪录通过的细胞是吸收了蓝光还是红光。于是，不但纪录了通过的细胞数目，还识别了通过的细胞是白细胞还是红细胞，这已经有点今日流式细胞术的意思了。此后，直到 60 年代中期，流式细胞术始终无多大进展。

1965 年，Kamentsky 提出两个新概念：一是用分光光度学定量测量细胞组分；另一个是细胞的不同组分可以被同

时多参数测量,用以给细胞分类。最初曾用核酸的紫外吸收和可见光散射两个参数同时测量未染色的细胞,测量的速度大约是每秒测 500 个细胞。他同时也是第一个用二维直方图显示并分析多参数流式细胞术的人。他也是第一个用计算机接口到仪器上,纪录并分析多参数数据的人。他的这个装置随后改装成商品仪器,商品名为 Ortho Cytograph 和 Cytofluorograph。

1968 年, Dittrich 和 Göhde 在英国申请了一个专利,名称是“在分散体系中自动测量和计数粒子的装置”。他们在测量粒子的荧光或磷光时,让粒子平行于透镜光轴的方向运动,并通过大数值孔径物镜的焦面,粒子通过焦面后再用一个冲洗液使之偏转。该装置使用了 Köhler 照明,因而在粒子运动的出口处可得到均匀的照明,这就免去了聚焦的问题。这样一个设备可以用 Köhler 照明进行荧光的激发,也可以收集发射的荧光,光源使用氙灯或高压汞灯。采用大的数值孔径透镜保证了激发光和收集发射光都有大的立体角,而较大的立体角又可在测量非对称细胞时细胞不同的取向不致使信号发生变化。Göhde 以很小的变异系数测量了细胞群体的 DNA。按上述原理制成的商品名称为 Phywe Impulscytophotometer 简称 ICP,随后生产的 ICP22,直到今天还有人仍在使用。

在 1967 年, Van Dilla 和 Los Alamos 小组率先发展了一种液流束、照明光轴,检测系统光轴三者互相垂直的流式细胞计。这种不依赖显微镜的设备采用了由 Crosland-Taylor 设计的层流流动室并使用氙离子激光器为照明光源。这种垂直相交的系统以后更进一步发展,除了可测荧光外还可测量

散射光,后来还把 Coulter 计数器也安装进去。他们第一个用荧光 Feulgen 反应对细胞 DNA 染色,展示了 DNA 倍性和荧光间的线性关系,他们的 DNA 直方图第一个清楚地显示出细胞周期的 G₁ 时相、S 时相, G₂ 和 M 时相。他们第一个用同步培养的细胞论述了定量细胞动力学,而 Göhde 和 Dittrich 则是第一个用流式细胞术测量 DNA 以确定细胞周期变化来研究药物影响细胞周期动力学的人。

至于流式细胞分选术,则首先是由 Fulwyler 在 1965 提出的,其改进型是在 1969 年。他使用了 Sweet 在 1965 年使用的一个静电墨水喷射液滴偏转技术。这个技术原来装在 Coulter 计数器上可使细胞按体积大小分类。与此同时,也是在 1965 年, Kamentsky 独立地申请了一个专利,这是一个在液流中经过光度学或电学测量后分选细胞的方法。在此方法中利用了气体动力学、水力学和静电学的技术。后来 Friedman 曾设计过一个用液流开关分选的装置,但较少使用,直到今天分选用的大部分仍然是电子学的方法,如 Becton Dickinson 公司的各种可供使用的 FACS 仪器仍然在应用液滴偏转的原理。

60 年代和 70 年代,还有一些人在流式细胞术上做了不少的改进,有代表性的是 Ehrlich 和 Wheelless。他们用飞点扫描技术或缝扫描技术得到了细胞形态学方面低分辨率的信息,从而改变了流式细胞术范畴的仪器都是零分辨率仪器的传统观点。

经过上述一系列研究者的努力,到 80 年代,世界上流式细胞计的生产厂家已基本形成格局,在美国,以 Becton-Dickinson 公司和 Coulter 公司两家为代表,各生产了一系列流式