

FLOW CYTOMETRY

流式细胞术

第二版

杜立颖 冯仁青 编著



北京大学出版社
PEKING UNIVERSITY PRESS

流式细胞术

(第二版)

杜立颖 冯仁青 编著



北京大学出版社
PEKING UNIVERSITY PRESS

内容简介

流式细胞术是现代生物学和医学的常用技术,一经发明就被逐渐应用到细胞生物学、免疫学、发育生物学、生理学、植物学、分子生物学等基础研究,医学的临床诊断和治疗,以及农林畜牧养殖、药品检验、食品检验、环境检测等广泛的领域。

作者结合十多年的流式经验,注重理论和实际、基础和应用相结合,重点介绍了流式细胞术的原理、技术及方法,及时跟踪展现了其最新成果和发展趋势。书中列举了大量有代表性的应用实例,详细描述了其操作过程、实验结果及详尽的分析方法等,可为相关领域的科研和技术人员提供有力的技术支持。本书可操作性强,图文并茂。在第一版基础上,(1)新版的部分章节改用了彩色图谱,更便于读者使用;(2)增加了“细胞增殖与死亡的检测”一章,详细描述流式细胞术在具体实验中的应用方法;(3)各章节中都及时添加了最新进展和方法。

本书可作为高校生物、医学、农林等高年级本科生、研究生教材,也可供科研人员和检验人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

流式细胞术/杜立颖,冯仁青编著. —2版. —北京:北京大学出版社,2014.1
ISBN 978-7-301-23631-4

I. ①流… II. ①杜…②冯… 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(2013)第 308784 号

书 名: 流式细胞术(第二版)

著作责任者: 杜立颖 冯仁青 编著

责任编辑: 郑月娥

标准书号: ISBN 978-7-301-23631-4/Q·0144

出版发行: 北京大学出版社

地 址: 北京市海淀区成府路 205 号 100871

网 址: <http://www.pup.cn> 新浪官方微博: @北京大学出版社

电子信箱: zye@pup.pku.edu.cn

电 话: 邮购部 62752015 发行部 62750672 编辑部 62767347 出版部 62754962

印刷者: 北京大学印刷厂

经销者: 新华书店

787 毫米×980 毫米 16 开本 15.75 印张 350 千字

2008 年 7 月第 1 版

2014 年 1 月第 2 版 2014 年 1 月第 1 次印刷

定 价: 58.00 元

未经许可,不得以任何方式复制或抄袭本书之部分或全部内容。

版权所有,侵权必究

举报电话: 010-62752024 电子信箱: fd@pup.pku.edu.cn

前 言

流式细胞术是 20 世纪 70 年代发展起来的一种对悬浮的单细胞进行高速分析和分选的技术。它融合了计算机技术、电子工程、光学、流体动力学、有机化学和细胞荧光染色技术,把不同科学背景的人联系在一起,开创了一个不同寻常的领域,第一次能够快速地从大量细胞群体中精准地挑选出单个的、稀有的目标,并能保持细胞活性,针对单个活细胞做进一步功能、特性研究。流式细胞术为生物学、医学以及其他领域打开了崭新的视野。

流式细胞术是现代生物学和医学的常用技术,一经发明就很快地应用到细胞生物学、免疫学、发育生物学、细胞动力学、生理学、植物学、分子生物学等基础研究,同时也被用于医学的临床诊断和治疗方面,例如,血液学、细菌学、病理学、肿瘤学、产科学和外科手术。逐步地,它在农林畜牧养殖、药品检验、食品检验、环境检测等与人们日常生活紧密相关的领域也得到了广泛的应用。

流式细胞术的广泛应用也带动了流式细胞仪制造业的蓬勃发展,世界上流式细胞仪生产制造商有美国的 BD 公司、Beckman Coulter 公司、ABI 公司、Union Biometrica 公司等,也有英国的 Apogee 公司、德国的 Partec 公司和 Merck Millipore 公司等。近年来,流式细胞术与显微技术结合,发展了成像流式细胞术(imaging flow cytometry,IFC);流式细胞术与质谱技术结合,发展了质谱细胞术(mass cytometry),延伸了流式细胞术本身的范围,开拓了更加广泛的应用前景。因此,流式细胞术从一开始出现就是一个有无限延展性、有长久生命力的技术,是人类的伟大创举。

本书的出版正是为了及时跟踪流式细胞术技术的发展,展现最新的技术成果和发展趋势。重点介绍了流式细胞术原理、更新的技术及相关的新方法。作者结合十多年的流式经验,查阅本领域的最新进展,在本书中列举了大量有代表性的应用实例,这些实例几乎涵盖了前面所述的各个领域,系统地介绍了相关的操作过程,展示了实验结果和详尽的分析方法等。本书特别注重理论和实际、基础和应用相结合,同时兼顾各领域。

本书特点是图文并茂,可操作性强,努力营造“悦”读的氛围,为生物、医学等相关领

域的本科生、研究生、科研人员提供一些技术支持。作者能力有限,本书的错误或不足之处,请读者不吝斧正。

在《流式细胞术》第二版出版之际,作者特别感谢北京大学生命科学学院的王广文博士、胡建军博士、曲秀霞博士、尹晓磊博士、任立晨博士、尹申意博士、刘洋博士对本书提出的很好建议,他们提供了重要的图谱,还逐字逐句地帮助校对书稿。书中所有的示意图都是尹晓磊博士绘制完成的。此外,感谢北京大学出版社郑月娥老师的大力支持。对所有帮助我们的人们也一并表示诚挚的谢意!

杜立颖 冯仁青

2013 年 12 月

目 录

第一章 概述	(1)
第一节 什么是流式细胞术?	(1)
第二节 流式细胞术能做什么?	(1)
第三节 背景与回顾	(2)
第四节 仪器简介	(4)
一、BD 公司	(4)
二、Beckman Coulter 公司	(7)
三、ABI 公司	(12)
四、Union Biometrica 公司	(12)
五、Apogee 公司	(14)
六、Partec 公司	(15)
七、Merck Millipore 公司	(16)
第五节 前景与展望	(19)
一、流式细胞术与显微技术结合	(20)
二、流式细胞术与质谱技术结合	(21)
参考文献	(21)
第二章 流式细胞术原理	(22)
第一节 工作原理	(22)
第二节 液流系统	(23)
一、鞘液	(23)
二、喷嘴	(24)
三、流式照射室	(25)
第三节 光学检测系统	(25)
一、激光和荧光	(25)
二、激光照射液流	(31)
三、光学信号	(33)
四、光学元件	(36)
五、光学信号检测系统	(36)
第四节 电子控制系统	(40)
一、光电检测器	(40)

二、通道	(41)
三、阈值	(42)
小结	(42)
参考文献	(42)
第三章 数据储存与分析系统	(43)
第一节 数据储存	(43)
第二节 数据分析	(43)
一、常用术语	(44)
二、流式图谱的表现形式	(47)
三、荧光补偿	(55)
第三节 数据分析实例	(63)
实例一：双参数 FSC/SSC 分析	(63)
实例二：三参数 FSC/SSC/FL1 分析	(63)
实例三：四参数 FSC/SSC/FL1/FL2 简单样本分析	(64)
实例四：四参数 FSC/SSC/FL1/FL2 复杂样本分析	(65)
小结	(67)
参考文献	(68)
第四章 细胞分选	(69)
第一节 细胞分选的原理	(69)
一、液滴形成	(69)
二、延迟时间	(70)
三、液滴充电与偏转	(72)
四、液滴的收集	(72)
第二节 影响分选的因素	(73)
一、分选速度	(73)
二、分选门的设定	(75)
三、分选模式	(77)
第三节 分选的质量控制与评价	(78)
一、分选的准确性	(78)
二、分选的效率	(80)
三、无菌分选	(80)
四、分选对细胞活性的影响	(81)
第四节 分选前的准备	(81)
一、分选用细胞的制备要求	(81)
二、准备的材料	(82)

三、分选时需要考虑的几个问题	(83)
第五节 细胞分选的应用实例	(83)
实例一：单细胞分选	(83)
实例二：回收极低比例($<0.01\%$)的细胞	(84)
实例三：纯化稳定的细胞系	(85)
实例四：淋巴细胞分选	(87)
实例五：组织特异性干细胞分选	(87)
实例六：染料排斥性干细胞分选	(90)
实例七：精子分选	(94)
小结	(96)
参考文献	(97)
第五章 细胞表面标志的检测	(98)
第一节 血液细胞的检测	(98)
第二节 细胞表面标志的染色技术	(100)
一、细胞表面分化抗原	(100)
二、直接染色法和间接染色法	(102)
第三节 对照的设置	(102)
一、阴性对照	(103)
二、同型对照	(105)
三、阳性对照	(106)
四、荧光补偿	(106)
第四节 定量测定	(107)
一、外标法	(108)
二、内标法	(108)
三、标准曲线法	(108)
四、分辨率	(109)
第五节 设门的策略	(111)
一、设门	(111)
二、检验门	(112)
三、荧光设门	(116)
四、多色流式分析实例	(117)
小结	(118)
参考文献	(119)
第六章 细胞内成分的检测	(120)
第一节 流式细胞术检测细胞内蛋白的特点	(120)

第二节 细胞内蛋白染色通则	(122)
一、细胞内蛋白染色的步骤	(122)
二、细胞内蛋白染色应遵循的原则	(123)
第三节 磷酸化蛋白的检测	(123)
一、固定和通透细胞	(124)
二、荧光抗体染色	(125)
三、优化染色方法	(127)
四、多种磷酸化蛋白同时检测	(127)
第四节 细胞因子的检测	(129)
一、T 淋巴细胞的细胞因子检测	(129)
二、单核细胞的细胞因子检测	(130)
三、细胞内蛋白检测的优缺点	(131)
第五节 微球免疫测定法	(131)
一、CBA 方法的原理	(132)
二、CBA 方法的流程	(132)
三、CBA 方法的检测范围	(135)
四、CBA 方法的优缺点	(136)
第六节 磷酸化蛋白与 DNA 同时检测	(137)
小结	(137)
参考文献	(138)
第七章 细胞核成分的检测	(139)
第一节 常用的 DNA 染料	(139)
第二节 细胞周期	(141)
一、细胞周期的定量分析方法	(142)
二、粘连细胞的分析	(144)
三、画门方法	(145)
四、BrdU/PI 双参数分析细胞周期	(146)
第三节 细胞周期的动态分析	(147)
一、BrdU/PI 双参数检测	(147)
二、Hoechst/PI 双参数检测	(148)
第四节 DNA 总量分析和倍体分析	(149)
一、DNA 总量分析	(149)
二、正常生物体的倍体分析	(150)
三、肿瘤细胞的非整倍体分析	(150)
四、植物倍体的分析	(151)

第五节 细胞同步化	(153)
一、自然同步化	(154)
二、人工同步化	(154)
第六节 DNA 与 RNA 同时检测	(155)
一、吖啶橙(AO)同时检测 DNA 与 RNA	(155)
二、Hoechst 33342/Pyronin Y 同时检测 DNA 和 RNA	(156)
第七节 DNA 与蛋白质同时检测	(157)
一、DNA 和总蛋白同时检测	(157)
二、DNA 和细胞周期蛋白同时检测	(157)
第八节 染色体分析	(159)
小结	(160)
参考文献	(161)
第八章 细胞增殖与死亡的检测	(163)
第一节 细胞增殖的检测	(163)
第二节 细胞凋亡的检测	(167)
一、散射光的检测	(167)
二、caspases 酶检测	(168)
三、线粒体膜电位的检测	(169)
四、质膜的检测	(172)
五、DNA 检测	(173)
六、细胞衰老与端粒测定	(175)
第三节 坏死细胞的检测	(177)
一、散射光的检测	(177)
二、膜通透性的检测	(178)
第四节 细胞凋亡、死亡检测中存在的问题	(178)
一、细胞凋亡的频率可能与细胞死亡的发生率无关	(178)
二、以 DNA 片段来估计细胞凋亡频率的困难	(179)
三、将凋亡小体或核碎片误判为凋亡细胞	(179)
四、细胞凋亡、细胞坏死、细胞凋亡的“坏死阶段”	(180)
五、样品制备过程中凋亡细胞的选择性丢失	(180)
六、吞噬凋亡小体的活细胞伪装成凋亡细胞	(181)
七、商业试剂/试剂盒存在的问题	(181)
八、细胞形态仍然是鉴定凋亡细胞的黄金标准	(181)
小结	(182)
参考文献	(182)

第九章 流式细胞术的应用概述	(184)
第一节 流式细胞术在生物学研究中的应用	(184)
一、在细胞生物学中的应用	(184)
二、在细胞周期研究和 DNA 倍体分析中的应用	(185)
三、在细胞凋亡分析中的应用	(185)
四、在染色体核型分析中的应用	(185)
五、在分子遗传学中的应用	(185)
六、在免疫学中的应用	(185)
七、在植物学中的应用	(186)
第二节 流式细胞术在医学研究及临床中的应用	(186)
一、在肿瘤学中的应用	(186)
二、在临床细胞免疫学中的应用	(187)
三、在血液病治疗中的应用	(190)
四、在血栓与出血性疾病治疗中的应用	(191)
五、生物学领域的其他应用	(192)
第三节 流式细胞术在农林畜牧养殖业中的应用	(193)
一、在农林业中的应用	(193)
二、在家畜性别控制中的应用	(193)
三、在家畜疾病监控与预防中的应用	(193)
第四节 流式细胞术在微生物学中的应用	(194)
一、在病原微生物研究中的应用	(194)
二、在环境微生物研究中的应用	(195)
第五节 流式细胞术在食品、药品检测方面的应用	(196)
一、在食品检测中的应用	(196)
二、在药品检测中的应用	(197)
第六节 流式细胞术新技术的应用	(199)
一、CBA 方法	(199)
二、定量流式细胞术	(200)
小结	(200)
参考文献	(201)
第十章 样本制备和染色方法	(203)
第一节 单细胞悬液的制备	(203)
一、小鼠末梢血的采集和单细胞悬液的制备	(203)
二、小鼠胸腺的分离和单细胞悬液的制备	(204)
三、小鼠骨髓的采集和单细胞悬液的制备	(204)

四、密度梯度离心法制备外周血单个核细胞悬液	(205)
五、小鼠脾脏的分离和单细胞悬液的制备	(206)
六、小鼠成体乳腺单细胞悬液的制备	(207)
七、小鼠胰腺单细胞悬液的制备	(207)
第二节 荧光素标记抗体的制备	(208)
一、FITC/Texas Red 标记	(208)
二、生物素标记	(209)
三、Allophycocyanin(APC)或者 Phycoerythrin(PE)标记	(210)
第三节 分析和分选用的细胞染色	(211)
一、流式分析用的细胞染色方法	(211)
二、流式分选用的细胞染色方法	(212)
三、SP 细胞的染色方法	(213)
四、流式分选用的精子染色方法	(214)
第四节 细胞内分子染色	(214)
一、常用的细胞固定方法	(215)
二、细胞内分子的染色方法	(215)
三、细胞内和细胞外分子同时染色的方法	(216)
第五节 细胞周期染色	(216)
一、固定全细胞的 PI 染色方法	(217)
二、非固定细胞的无洗染色方法	(218)
三、BrdU 染色方法	(219)
四、植物细胞的 DNA 染色方法	(220)
第六节 细胞同步化实验方法	(220)
一、过剩胸腺嘧啶脱氧核苷法——S 期细胞同步化	(221)
二、羟基脲法——S 期细胞同步化	(221)
三、秋水仙胺法——M 期细胞同步化	(222)
四、血清饥饿法——G ₀ 期细胞同步化	(222)
五、G ₁ 期和 G ₂ 期细胞同步化实验方法	(223)
第七节 DNA 和 RNA 同时染色	(223)
一、Hoechst 33342/PY 同时检测 DNA 和 RNA	(223)
二、吖啶橙(AO)同时检测 DNA 和 RNA	(224)
第八节 细胞凋亡染色	(224)
一、PI 染色法——DNA 凋亡峰的检测	(225)
二、Annexin V/PI 双染色法	(226)
三、Hoechst 33342/PI 双染色法	(226)

四、TUNEL 染色法	(227)
小结	(228)
参考文献	(229)
附录	(230)
一、流式细胞术相关网址	(230)
二、流式细胞术相关实验方法网址	(231)
三、荧光素试剂公司	(231)
四、荧光光谱网址	(232)
五、荧光素激发和发射光谱一览表	(233)

第一章 概 述

第一节 什么是流式细胞术？

流式细胞术研究的范围包括动物细胞、植物细胞、细菌、病毒、微生物、寄生虫等生物体以及其中的 DNA、蛋白或其他分子，还可以研究塑料微球或其他悬浮于液体中的微粒，是对处于液流中的细胞或其他各种微粒进行多参数快速分析和分选的技术。

具体地说，流式细胞术可以对细胞膜上、细胞质中的蛋白、细胞因子和其他各种特异标志，以及细胞核中的 DNA、RNA 和蛋白等进行分析，上述所要分析的各种细胞成分需要用带有荧光素的特异抗体或染料进行染色才能检测到。流式细胞仪在收集大量细胞的基础上，可以根据细胞荧光强度的差异，从混合细胞群中鉴别出不同亚群，并对每一亚群的比例做出精确定量。流式细胞术不仅具有分析功能，尤为重要，还具有高速分选功能，可以从大量细胞中挑选出感兴趣的目标细胞，因此，这一技术不仅为科研、临床医学，而且为农林畜牧养殖、食品、药品检验以及环境监测等提供了强有力的工具。

流式细胞术的工作原理是：在一定压力下，鞘液带着细胞或微粒通过喷嘴中心进入到流式照射室，在流式照射室的分析点，激光照射到细胞发生散射和折射，发射出散射光；同时，细胞所携带的荧光素被激光激发并发射出荧光。前向散射光(FSC)和侧向散射光(SSC)检测器把散射光转换成电信号，荧光则被聚光器收集，不同颜色的荧光被双色反光镜转向不同的光电倍增管检测器，把荧光转换成电信号。散射光信号和荧光信号经过放大后，再经过数据化处理输入电脑并储存，根据细胞的散射光和荧光进行分析或分选。

第二节 流式细胞术能做什么？

了解了流式细胞术的原理，可以知道流式细胞术能够做下面的工作：

- 检测悬浮的动物细胞、植物细胞、细菌、病毒、微生物、寄生虫或其他微粒等。只要是悬浮的单细胞，都可用于分析或分选，如血液、骨髓、体液中的细胞和培养的细胞等，实体组织只要经处理后制成单细胞悬液也能分析，实际上所有的组织细胞均可用于分析或分选。不仅如此，借助流式微球免疫定量技术，还可以通过在特制的微球上包被抗体、抗原或核酸探针等，同时测定细胞中的多种成分，比如各种细胞因子、自身抗体、特定的核酸序列等。

- 区分“活细胞”和“死细胞”。活细胞膜是完整的,激光照射到活细胞上会发生一定的散射、反射、折射等现象,因此,活细胞的散射光信号强。死细胞膜不完整,激光照射到死细胞则不能发生散射等现象,因此,死细胞的散射光信号很弱。所以,根据散射光信号的不同能够区分活细胞和死细胞。
- 鉴别“生物样本”与“非生物样本”。生物样本一般来说是不均一的,即使是同一种细胞,其大小和粒度都不同,在流式图谱中显示结果是前向散射光和侧向散射光分布比较广泛。而非生物样本,比如塑料微球,一般大小比较均一,是实心的或是空心的,微球内部不像细胞那么复杂,因此,散射光非常简单均一,在流式图谱中分布比较集中。所以,根据散射光分布的不同来鉴别生物样本和非生物样本。
- 测定细胞的散射光、染色荧光及自发荧光。流式细胞术可以同时分析单个细胞的多种特征,如果用不同荧光素标记的不同单克隆抗体对细胞进行多种荧光染色,可获得一种细胞的多种信息,使细胞亚群的识别、计数和功能分析更为准确。通过荧光染色对单细胞的某些成分如 DNA 含量、抗原或受体表达量、离子浓度、酶活性等均可进行单细胞水平的定性与定量分析。
- 分析速度快,储存信息量大。每秒测定 $10^3 \sim 5 \times 10^4$ 个细胞,极短时间内可分析大量细胞,只要样本中的细胞数量足够,流式细胞仪可以每秒钟数千、数万个细胞的速率进行测量,储存信息量可达数亿,因此,可以在极短的时间内从大量细胞中寻找出稀有的、感兴趣的目标细胞。
- 挑选出目标细胞。这是流式细胞术最核心也是最与众不同之处,在短时间从大量细胞群体中挑选出目标细胞。

流式细胞术不仅已经广泛地应用于免疫学、细胞生物学、发育生物学、细胞动力学、生理学、分子生物学等生物学和医学研究的各个领域,也成为临床医学方面的疾病诊断和治疗的必要工具,而且在农林畜牧养殖、药品检验、食品检验、环境检测等人们日常生活中也得到了广泛的应用。

流式细胞术开辟了一个不同寻常的领域,它是如何发生、发展的?它又是如何把计算机技术、电子工程、数学、光学、流体动力学和有机化学等多种学科巧妙地融合在一起,把不同科学背景的人联系在一起共同研究,发展成为一个专门的领域,为生命科学研究提供了强有力的工具?下面回顾一下科学工作者们的奇思妙想、互相借鉴、孜孜追求,最后化茧为蝶的艰难历程。

第三节 背景与回顾

正如大多数科学技术的进步一样,流式细胞术的发生与发展也是与特定的历史背景密切相关的。它的灵感来自于显微镜技术、血细胞计数仪和喷墨技术,正是这三种技术的共同发展奠定了世界上第一台流式细胞仪产生的基础。下面,简单地回顾历史,以便

全面了解流式细胞术的发展及演变历程。

早在 17 世纪,显微镜技术就用于细胞和组织切片的检查,到了 19 世纪末,通过对细胞染色,人们可以在显微镜下清晰地看见细胞的结构。20 世纪 40~50 年代,有了荧光显微镜,这时抗体技术也有了很大发展,Albert Coons 发展了在抗体上交联荧光标记物的技术,荧光标记的抗体技术获得了广泛的应用。Köhler 和 Milstein 又发展了单克隆抗体技术,单克隆抗体被大量地用于标记细胞的特异抗原,并以特异标志的不同对细胞进行分类,这样,细胞的亚型越分越细。不同类型细胞的特异标志用结合了荧光素的特异抗体染色,把细胞放在荧光显微镜的载玻片上,用适当的光源照射,细胞上的荧光素被激发,透过合适的滤光片即可以判断细胞的不同亚型。如果在显微镜上安装一个摄像头记录当时看到的荧光信号,再把视野中的细胞的荧光强度精确地定量,并用数据输出,这项技术的逻辑延伸就是流式细胞术产生的基础。

1934 年,Andrew Moldaran 迈出了从显微镜技术向流式细胞术发展的第一步。他发明了一个仪器,能让细胞一个接着一个地通过毛细管,在显微镜的目镜上安装光电检测器能记录通过的每一个细胞,即这个仪器能够对细胞进行计数。20 世纪 60 年代,Louis Kamentsky 在显微镜的基础上发展了分光光度计,当细胞以 500 个/s 的速度通过显微镜物镜时,分光光度计能测量和记录细胞的紫外吸收和蓝光的散射。1967 年,Kamentsky 和 Melamed 设计了分选仪器,它能给注射器提供电刺激,从液流中拉出感兴趣的目标细胞,然后收集这些特殊的细胞并拿到显微镜下观察分析,这便是流式分选的雏形。

在流式显微技术发展期间,Wallace Coulter 发明了血细胞计数仪,用于血细胞分析。20 世纪 50 年代,血细胞计数仪用于记录细胞数量,能快速、自动计数白细胞和红细胞,这个仪器很快成为医院血液实验室必备的仪器,它结合了很多分析仪器的特性,例如单个细胞快速通过喷嘴的技术、电子检测技术以及信号自动分析技术等,这是流式细胞仪具有的基本技术。

Mack Fulwyler 结合了 Coulter 的方法学与喷墨技术,进一步发展了流式细胞术。在喷墨技术中,通过喷嘴的快速振动,可以使液流断开形成均匀的、单一的液滴,这样就可以在适当的时间给特定的液滴充电并收集它。1953 年,P. J. Crosland-Taylor 把流体动力学聚焦原理引入流式细胞仪的液流系统,对该领域的进一步发展起到了至关重要的作用,至此,流式细胞术的基本原理已经形成。

1969 年,Marvin van Dilla 和同事们报道了第一台荧光检测的流式细胞仪,它使用了 Kamentsky 设计的照射系统和电子检测系统,以及 Fulwyler 分选仪的快速流动和振动的液流系统,并利用了动力学聚焦的原理,这样,仪器有了轴流、照射系统和直角形光学检测系统,并用氩离子激光作为光源。Herzenberg 小组也用类似的仪器根据细胞所染的荧光素不同来分选小鼠脾细胞。流式细胞术从一开始,就引导着向多参数分析的方向发展。

现在,流式细胞仪同时向两个方向发展:一方面,分选型仪器越来越复杂,能检测和分选不同类型的细胞,也能检测一个细胞的多种信息,而且仪器越来越灵敏,分选速度越

来越快。尽管如此,分选型仪器仍然在继续发展,它的进步始终标志着该技术和方法学发展的最前沿。另一方面,分析型仪器外形越来越小巧,功能越来越强大,光学系统和液流系统更稳定,更易于操作,已经成为实验室必备的分析仪器。

第四节 仪器简介

目前,世界上流式细胞仪生产制造商不仅有美国的 BD 公司、Beckman Coulter 公司、ABI 公司、Union Biometrica 公司,还有英国的 Apogee 公司,以及德国的 Partec 公司和 Merck Millipore 公司。下面对不同公司具有代表性的仪器及其特点作简要介绍。

一、BD 公司

BD 公司一直致力于研究生产最先进的流式细胞仪。自从 1974 年,BD 公司与美国斯坦福大学合作研制出商用流式细胞分选仪(FACSTTM),BD 公司就不断推陈出新,在流式细胞术领域中始终保持领先地位。BD 公司生产的仪器型号较多。

1. BD FACSCalibur

BD FACSCalibur(图 1.1)是全自动台式机,配置一个氩离子激光(激发波长 488 nm, 15 mW)和一个二极管红激光(激发波长 635 nm, 5 mW),能同时做四色分析;分析速度 10 000 个细胞/s;检测灵敏度小于 100 MESF;8 种自动化软件获取和分析系统,按钮式液流控制,操作方便。

仪器特点

- (1) 开机无需等待:预热 5 min 即可上机检测。
- (2) 自动化程度高: FACSCalibur 按以用户为中心的系统设计,从自动化样本处理、自动上样,到按钮式液流控制、8 种自动化软件获取和分析,每个环节都保证操作简便快捷,并提供准确客观且具重复性的实验结果。

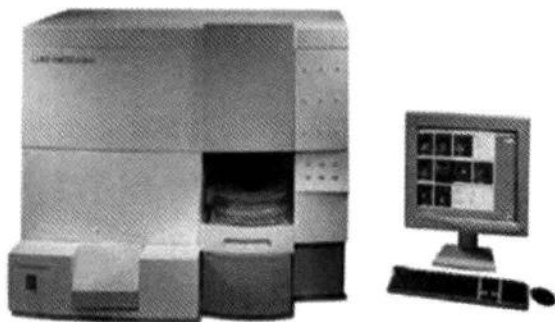


图 1.1 BD FACSCalibur 流式细胞仪

- (3) 分析速度快: 荧光检测全部采用光电倍增器(PMT),以保证最快的分析速度(10 000 个细胞/s)。

- (4) 四色分析系统: BD 专利的立体空间激发系统通过双激光实现四色分析,最大限度地减少荧光信号之间的补偿,提高检测灵敏度;扩展了染料的选择范围,拓宽了仪器的应用领域,为流式细胞仪四色分析设立了行业标准。