

流式细胞术广泛应用于生物学和基础医学如免疫学、细胞生物学和微生物学等，成为这些领域研究的重要技术，而且流式细胞术还应用于临床医学的许多方面，如白血病的临床分型、感染的早期诊断等。此外，流式细胞术还成功应用于环境监测、食品卫生防疫等方面，并且其应用还在不断地向各个领域扩展延伸……

流式细胞术

——原理、操作及应用

陈朱波 曹雪涛 著



科学出版社

www.sciencep.com

流式细胞术

——原理、操作及应用

陈朱波 曹雪涛 著

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书主要介绍流式细胞术的原理、操作及应用,分为概述、流式细胞仪的原理、流式图、流式细胞术的基本操作与技巧、流式分析术的应用和流式分选术的应用6个部分。概述部分介绍基本概念和几款常见的流式细胞仪;原理部分具体介绍流式细胞仪的液流系统、光路系统、检测分析系统和分选系统;流式图部分主要介绍了流式通道、流式直方图、流式散点图和流式等高线图;操作部分介绍了样品制备、荧光素偶联抗体及标记、光电倍增管电压设定、对照设置、补偿调节、阈值设定、死细胞问题处理、分选模式选择、上样速度控制、分选设门原则、分选基本步骤等内容;流式分析术的应用部分具体介绍了流式细胞术在免疫学方面的应用,并且扩展到基础医学和生物学方面的应用;流式分选术的应用部分阐述了不同条件下流式分选的策略选择和注意事项,同时还介绍了各种干细胞包括肿瘤干细胞等的流式分选方法。

本书特别适合于免疫学研究者和流式细胞术的初学者,也可以作为有一定经验的操作者的参考书,对其他领域研究者也具有很好的参考价值。

图书在版编目(CIP)数据

流式细胞术:原理、操作及应用/陈朱波,曹雪涛著. —北京:科学出版社,2010

ISBN 978-7-03-029171-4

I. ①流… II. ①陈… ②曹… 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(2010)第195241号

责任编辑:罗静 王静 / 责任校对:桂伟利

责任印制:钱玉芬 / 封面设计:美光制版

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

天时彩色印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2010年10月第 一 版 开本: B5 (787×1092)

2010年10月第一次印刷 印张: 14 1/2

印数: 1—3000 字数: 272 000

定价: 48.00元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

序

流式细胞术是20世纪60年代末发展起来的细胞定性和定量的技术,通过收集激光照射到细胞后的散射光信号和荧光信号反映细胞的物理化学特征,并且根据细胞的物理化学特征分选得到感兴趣的细胞。流式细胞术的出现与发展涉及很多学科和技术,包括细胞与分子生物学、流体力学、电磁理论和生物技术、激光技术、荧光技术、光电子技术、单克隆抗体技术、计算机技术、纳米技术等。可以说,像流式细胞术这样涉及这么多学科领域的一种技术并不多见。流式细胞术是现代科学技术发展的综合交叉的产物,是集多种技术发展于一体的“大成者”。流式细胞术也是一个高速发展的技术,从最初只配备1个激光器、只有1个散射光通道和1个荧光通道发展到现在的可以配备4个激光器并同时16色18参数进行分析或者分选,这个发展历程也只经历了不到半个世纪。而且,流式细胞术更是一个应用特别广泛的技术,不仅应用于基础医学和生物学如免疫学、细胞生物学和微生物学等的各个领域,并已成为这些领域研究不可或缺的基本技术方法,而且现在的流式细胞术更是广泛应用于临床的各个方面,如血常规检测、白血病的临床分型、急性感染的早期诊断等。此外,流式细胞术还成功应用于环境监测、食品卫生防疫等各个方面,而且其应用还在不断地向各个领域扩展延伸。可以说,流式细胞术具有广泛的应用价值和应用前景。

流式细胞仪自动化程度已经很高,但是要想用得好,用得巧,其操作依然非常复杂。操作者必须熟悉流式细胞仪的原理,不断积累实际操作经验,才能有效地使用流式细胞仪,以满足不同实验需求。初学者常会因为光电倍增管电压设置不当、对照设置错误、补偿调节不当等原因得到错误的结果。即使是经验丰富的操作者,往往也会由于对流式细胞术或者流式细胞仪某一方面不甚了解而经常得到错误的结果。为了让流式细胞仪使用者能够全面地了解流式细胞术的原理、掌握其基本操作和技术、全方位地掌握流式分析和流式分选的应用,使流式细胞术更好地服务于基础和临床研究,也为了在全国更好地普及这项重要的技术,让更多的科技工作者掌握和使用流式细胞术,《流式细胞术——原理、操作及应用》应运而生。

该书的第一个特点是深入浅出,通俗易懂。该书著者对流式细胞术的原理理解透彻,对流式细胞术的操作和应用具有非常丰富的经验,对流式细胞术有自己独特的理解,所以著者能够深入浅出、舍弃晦涩难懂的术语和词汇、根据自己的经验和理解用最为平实的语言重新诠释流式细胞术的原理、技巧和应用等各个方面,即使是从未接触过流式细胞术的初学者,通过阅读本书也能完全读懂和较为深刻地了解流式细胞术。该书的第二个特点是操作的全面性。该书全面介绍了流式细胞术操作的基本方法以及著者的心得体会和技巧,帮助操作者进一步提高自己的操作水平,从而更好地利用流式细胞术。该书的第三个特点是理论联系实际。该书用大量的实例和示意图具体而形象地阐述流式细胞术的应用,以流式细胞术在免疫学上的应用为基础,同时扩展到基础医学和生物学应用的多个方面。该书的第四个特点是重点加强了流式分选的相关内容。与其他只简单介绍流式分选原理的书籍不同,该书不仅介绍了流式分选的原理,还重点介绍了流式分选的基本操作和各种实用的操作技巧,尤其是突出了流式分选的具体应用,阐述了不同条件下流式分选的策略选择和注意事项,最后还介绍了各种干细胞包括肿瘤干细胞等的流式分选的方法。

全书从原理到技巧再到应用,层次分明,特别适合于流式细胞术的

初学者,当然有一定经验的操作者也可查缺补漏,进一步加深对流式细胞术的全面理解、更好地使用流式细胞术。该书有关应用实例的介绍主要以免疫学应用为基础,但是其原理、技巧和流式分选应用则是面向流式细胞术的各个方面,其中介绍的内容适用于各相关研究领域的操作者。该书特别适用于生物医学领域研究者参考使用。

巴德年
中国工程院院士
中国医学科学院
2010年7月

前 言

流式细胞术是20世纪60年代末开始发展起来的技术,经过40多年来的发展,其应用越来越广泛,不仅广泛应用于基础医学和生物学的各个领域,尤其是免疫学和细胞生物学等,而且还广泛应用于临床,如血常规检测和艾滋病病情监测等,此外,流式细胞术也已应用于环境卫生监测等领域。应用的广泛势必要求技术运用的灵活性,流式细胞术就是一门应用非常广泛、操作非常灵活的技术,所以,流式操作者不仅需要透彻理解流式细胞术的原理,而且还需要具有丰富的实际操作经验,才能较为准确地利用流式细胞术得到正确的结果,否则很可能会由于某种原因得到错误的结果。这就是本书编写的主要原因和目的,本书从流式细胞术的原理、操作和应用三方面全方位地阐述流式细胞术这门新兴的技术,著者希望通过本书,使流式细胞术的使用者能够更好地利用这门技术获得正确的实验结果,也希望借此为我国基础和临床研究贡献一份力量。

本书分为概述、原理、流式图、基本操作与技巧、流式分析术的应用和流式分选术的应用6个部分。概述部分在介绍流式细胞术基本概念的基础上,介绍了几款常用的分析型和分选型流式细胞仪;原理部分着重阐述了流式细胞仪的液流系统、光路系统、检测分析系统和分选系统;流式图部分主要介绍了流式直方图、流式散点图和流式等高线图

这3种最常用的流式图；基本操作与技巧部分则强调理论结合实践，以典型实验为例，从样品制备、荧光抗体的标记、光电倍增管的电压设定、对照设置、补偿调节、阈值设定、死细胞处理、分选模式的选择、速度的控制、分选设门原则和分选基本步骤等各个方面详细阐述。流式分析技术的应用部分以流式细胞术的免疫学应用为基础，扩展到基础医学和生物学的各个方面，内容上点、面结合，立足于流式分析最前沿的应用。流式分选术的应用部分，著者根据自己多年的经验和体会，有针对性地阐述了独立群体细胞、非独立细胞群体和低比例细胞的分选方法和策略，此外，还介绍了各种干细胞包括造血干细胞、侧群干细胞、间充质干细胞和肿瘤干细胞的分选方法。

本书在编写和修改过程中得到了韩岩梅副教授、徐红梅博士和顾炎博士的大力支持，在此深表感谢。感谢BD公司和贝克曼公司提供流式细胞仪的图片。本书力求全面准确地阐述流式细胞术的原理、操作技巧和应用，但囿于学术水平和实验技术等限制，虽全书的内容经再三推敲和反复求证最终完成，但毕竟难以尽善尽美，书中存在缺点和错误在所难免，敬请各位专家和广大读者批评和指正。

陈朱波 曹雪涛
第二军医大学免疫学研究所
医学免疫学国家重点实验室
2010年6月

目 录

序

前言

1 概述	1
1.1 流式细胞术基本概念.....	2
1.2 分析型流式细胞仪介绍.....	5
1.3 分选型流式细胞仪介绍.....	9
参考文献.....	13
2 流式细胞仪的原理	14
2.1 液流系统.....	15
2.2 光路系统.....	18
2.3 检测分析系统.....	28
2.4 分选系统.....	31
参考文献.....	36
3 流式图	37
3.1 流式通道.....	38

3.2	流式直方图	39
3.3	流式散点图	42
3.4	流式等高线图	44
	参考文献	46
4	流式细胞术的基本操作与技巧	48
4.1	样品制备	49
4.1.1	独立细胞样品制备	49
4.1.2	免疫器官样品制备	51
4.1.3	实体脏器样品制备	52
4.2	荧光素偶联抗体及其标记方法	53
4.2.1	荧光素	53
4.2.2	荧光素偶联抗体	57
4.2.3	样品封闭	58
4.2.4	荧光素偶联抗体标记	60
4.3	光电倍增管电压设定	62
4.4	对照的设置	65
4.4.1	阴性对照的设置	65
4.4.2	FMO对照	68
4.4.3	阳性对照的设置	68
4.5	补偿调节	69
4.5.1	补偿调节的原理	70
4.5.2	调节补偿的具体方法	71
4.5.3	三色和四色分析补偿调节方法	74
4.5.4	影响补偿大小的因素	76
4.6	阈值设定	78
4.7	流式分析中的死细胞问题	79
4.7.1	减少样品中死细胞比例的方法	79
4.7.2	流式分析时区分死细胞和活细胞的方法	80

4.8	流式分选模式选择	85
4.8.1	纯化模式	86
4.8.2	富集模式	87
4.8.3	单细胞模式	87
4.9	上样速度控制	88
4.9.1	流式分析速度控制	89
4.9.2	流式分选速度控制	89
4.10	分选设门基本原则	91
4.11	流式分选基本步骤	93
	参考文献	94
5	流式分析术的应用	96
5.1	细胞群比例测定	97
5.2	表型测定	101
5.3	检测细胞因子	106
5.3.1	胞内染色法检测细胞因子	107
5.3.2	胞内染色法与ELISA法比较	112
5.3.3	CBA法测定细胞因子	114
5.3.4	CBA法与ELISA法比较	116
5.4	检测细胞增殖	117
5.4.1	相对计数法	118
5.4.2	示踪染料标记法	122
5.4.3	Brdu标记法	127
5.4.4	其他方法	129
5.5	检测细胞凋亡	130
5.5.1	annexin V/PI双染色法	131
5.5.2	SYTO/PI双染色法	133
5.5.3	细胞DNA含量分析法检测细胞凋亡	134
5.5.4	线粒体损伤检测法	135

5.5.5	活化的caspase-3检测法	139
5.5.6	荧光素偶联的caspase抑制剂(FLICA)标记法	139
5.5.7	甲酰胺诱导ssDNA单抗检测法	140
5.5.8	TUNEL法	141
5.6	检测细胞周期	142
5.6.1	非特异性核酸荧光染料标记法	142
5.6.2	特异性细胞周期调节蛋白检测法	147
5.7	检测细胞杀伤能力	148
5.8	检测细胞吞噬功能	151
5.9	检测胞内活化的激酶	153
5.10	检测基因表达	154
5.10.1	GFP报道基因系统	155
5.10.2	<i>lacZ</i> 报道基因系统	156
5.10.3	β -内酰胺酶报道基因系统	157
5.11	微生物学中的应用	157
5.11.1	荧光素偶联抗体直接检测法	158
5.11.2	抗体结合人工荧光微球直接检测法	159
5.11.3	微生物活性流式检测	160
5.11.4	人工微球荧光免疫试验检测抗体	160
5.11.5	荧光原位杂交流式检测法	161
5.11.6	PCR免疫微珠法	162
5.11.7	原位PCR杂交流式检测法	163
5.12	检测钙相关分子	163
5.12.1	检测细胞内游离的钙离子水平	163
5.12.2	检测钙蛋白酶活性	164
5.12.3	检测细胞膜钙泵活性	166
5.13	表观遗传学中的应用	168
5.13.1	ChIP-on-beads法	169
5.13.2	检测细胞水平组蛋白修饰情况	171

5.14	检测缝隙连接介导的细胞通讯	172
5.15	检测细胞内pH和钠氢转运体活性	175
5.15.1	检测细胞内pH	175
5.15.2	检测钠氢转运体活性	176
5.16	其他应用	177
5.16.1	检测活性氧簇	177
5.16.2	检测细胞内游离的锌离子水平	178
5.16.3	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	180
5.16.4	检测端粒长度	181
5.16.5	检测脂筏结合蛋白	183
	引文目录	185
	参考文献	188
6	流式分选术的应用	193
6.1	流式分选与磁性分选	194
6.2	流式分选独立群体细胞	196
6.3	流式分选非独立细胞群体	198
6.4	流式分选低比例细胞群体	202
6.4.1	强势细胞群的辐射影响	202
6.4.2	流式分选结合磁性分选	203
6.4.3	二次分选法	204
6.5	流式分选干细胞	206
6.5.1	流式分选造血干细胞	206
6.5.2	流式分选侧群干细胞	211
6.5.3	流式分选间充质干细胞	213
6.5.4	流式分选肿瘤干细胞	214
	参考文献	216

1 概 述

流式细胞术(flow cytometry)是20世纪60年代后期开始发展起来的利用流式细胞仪(flow cytometer)快速定量分析细胞群的物理化学特征以及根据这些物理化学特征精确分选细胞的新技术,主要分为流式分析和流式分选两部分。流式细胞仪通过接收激光照射后液流内细胞的散射光信号和荧光信号反映细胞的物理化学特征,如细胞的大小、颗粒度和抗原分子的表达情况等。流式细胞仪的出现和流式细胞术的发展是多学科领域共同发展的结晶,其中涉及细胞与分子生物学和生物技术、单克隆抗体技术、激光技术、荧光化学、光电子物理、流体力学、计算机技术等。

流式细胞术主要应用于生命科学的基础研究,尤其是免疫学、细胞生物学和分子生物学。80年代后期开始应用于临床,应用流式细胞术测定外周血CD4⁺T细胞的数量能用于监测HIV患者疾病的进展,开启了流式细胞术应用于临床的新纪元。随后,利用流式分选干细胞过继回输用于疾病的治疗,更加开拓了流式细胞术的临床应用。现在,流式细胞术还能辅助多种疾病的诊断,尤其是白血病的诊断和分型。

1.1 流式细胞术基本概念

1. 原理

特定波长的激光束直接照射到高压驱动的液流,产生的光信号被多个接收器接收,一个是在激光束直线方向上接收到的散射光信号(前向角散射),其他是在激光束垂直方向上接收到的光信号,包括散射光信号(侧向角散射)和荧光信号。液流中悬浮的直径从0.2~150 μm 的细胞能够使激光束发生散射光,细胞上结合的荧光素被激光激发后能够发射荧光。散射光信号和荧光信号被相应的接收器接收,根据信号的强弱波动就能反映出每个细胞的物理化学特征。

2. 流式细胞术的三大要素

流式细胞术有三大要素,分别为流式细胞仪、样品细胞和荧光染料或者荧光素偶联抗体。流式细胞术是在流式细胞仪上操作的,流式细胞仪根据其功能的不同可以分为分析型流式细胞仪和分选型流式细胞仪,前者只能流式分析,不能分选纯化目标细胞,后者能够同时进行流式分析和流式分选。

流式细胞术检测的对象是细胞,而且是呈独立状态的悬浮于液体中的细胞,即单细胞悬液。流式细胞术不能直接检测组织块中的细胞,要检测脏器或组织中的细胞,必须先用各种方法将脏器或组织制备成单细胞悬液,然后标记上荧光素偶联抗体,才能被流式细胞仪检测。流式细胞术不能直接检测分子,但是用人工合成的颗粒代替细胞,然后将该分子的抗体与人工颗粒结合,可以间接检测分子,如用CBA法检测细胞因子等。

流式细胞术可以定量检测样品细胞的物理化学特征,其定量是以光信号为基础的,通过分析接收到的激光照射到细胞后的散射光信号和荧光信号完成定量分析。样品细胞只有标记荧光染料或者荧光素偶联抗体进而被激光照射后才能发射荧光信号,从而得到样品细胞表达某抗原分子强弱情况等化学特征,否则只能通过分析散射光信号得到

样品细胞体积大小和颗粒度等物理特征。

3. 光指示系统

流式细胞术是一种定量技术,任何一种定量技术都有其指示系统,流式细胞术的指示系统是光信号,流式细胞术通过检测细胞经激光照射后收集到的光信号间接反映细胞的物理化学特征。接收到的光信号主要有散射光信号和荧光信号两种,散射光信号是激光照射到细胞后发生散射形成的,散射光的波长与激光的波长相同;荧光信号是细胞上结合的荧光素被激光激发后产生的,一般荧光信号的波长要长于激发它的激光的波长,流式细胞仪通过光路系统将荧光信号根据波长的不同分成不同的部分,不同波长的荧光分别进入各自的接收器被流式细胞仪接收和分析。流式细胞术通过分析散射光信号来反映细胞大小和颗粒度等物理特征;通过分析荧光信号来反映细胞表达抗原、合成细胞因子等化学特征。

4. 群体信息

流式细胞术关注的是细胞的群体信息,如有多少比例的细胞表达某重要的抗原分子或者合成某重要的细胞因子等,而较少关注其中某一个细胞的特性。所以,流式细胞术得到的经常是一个比例值,或者平均荧光强度等群体信息。

5. FACS

荧光驱动的细胞分选(fluorescence-activated cell sorting, FACS)最初于1972年提出,指的是荧光驱动的细胞分选的新技术。FACS后来被BD公司(第一个将流式细胞仪商业化的公司)注册为商标,用于标识与流式细胞术相关的设备和试剂。现在,FACS已经被广泛接受,其含义也已经发生了变化,目前FACS通常指流式细胞仪和流式细胞术。

6. Hi-D FACS

高维流式细胞术(high-dimensional FACS, Hi-D FACS)是指多参数同时使用的流式细胞术。最初的流式细胞仪只配备有1个激光器,