

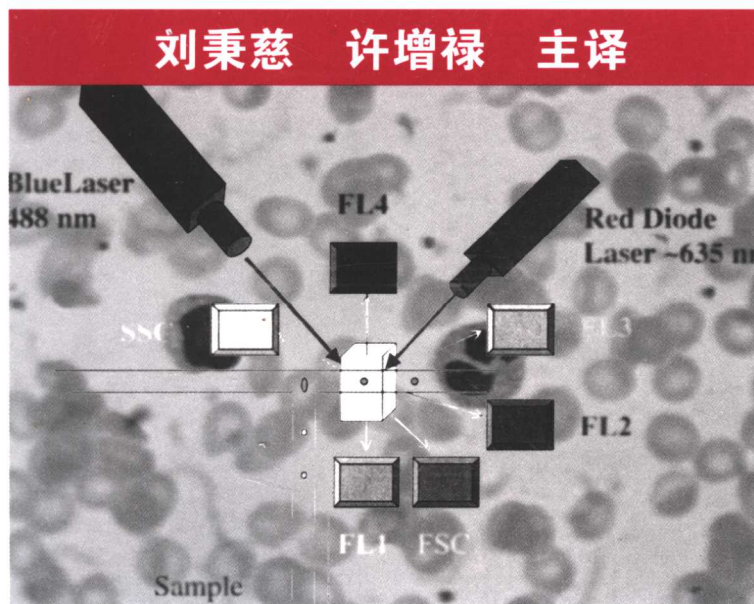
生物实验室系列

流式细胞术原理与科研应用 简明手册

Flow Cytometry for Research Scientists:
Principles and Applications

[瑞士] 瑞菲尔·努纳兹 (Rafael Nunez) 著

刘秉慈 许增禄 主译



Chemical Industry Press

62
19



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

生物实验室系列

流式细胞术原理与科研应用 简明手册

Flow Cytometry for Research Scientist:
Principles and Applications

[瑞士] 瑞菲尔·努纳兹 著

刘秉慈 许增禄 主译



化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

· 北 京 ·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

流式细胞术原理与科研应用简明手册/[瑞士] 努纳兹 (Nunez, R.) 著; 刘秉慈, 许增禄主译. —北京: 化学工业出版社, 2005. 5

书名原文: Flow Cytometry for Research Scientists: Principles and Applications

生物实验室系列

ISBN 7-5025-6915-4

I. 流… II. ①努…②刘…③许… III. 细胞学-手册 IV. Q2-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 052924 号

Flow Cytometry for Research Scientists: Principles and Applications/by Rafael Nunez
ISBN -898486-26-3

Copyright © 2001 by Horizon Scientific Press, Norwich, UK. All rights reserved.

Authorized translation from the English language edition published by Horizon Scientific Press.

本书中文简体字版由 Horizon Scientific Press 授权化学工业出版社独家出版发行。
未经许可, 不得以任何方式复制或抄袭本书的任何部分。

北京市版权局著作权合同登记号: 01-2004-4904

生物实验室系列

流式细胞术原理与科研应用简明手册

[瑞士] 瑞菲尔·努纳兹 著

刘秉慈 许增禄 主译

责任编辑: 郎红旗

文字编辑: 李植峰

责任校对: 于志岩

封面设计: 关 飞

*

化 学 工 业 出 版 社 出版发行

现代生物技术与医药科技出版中心
(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010) 64982530

(010) 64918013

购书传真: (010) 64982630

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京云浩印刷有限责任公司印装

开本 720mm×1000mm 1/16 印张 7.5 字数 105 千字

2005 年 8 月第 1 版 2005 年 8 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-6915-4

定 价: 18.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

出版者的话

21 世纪是生命科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20 世纪后叶现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为 21 世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如 17 世纪 Leeuwenhoek 等人发明并应用显微镜技术，直接催化了“细胞学说”的建立和发展；1973 年 Cohn 和 Boyer 完成了 DNA 体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988 年 Kary Mullis 发明的 PCR 技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学无时无刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和发展了实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化学工业出版社组织出版了“生物实验室系列”图书。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该

项技术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。一是强调先进性——除了系统介绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目的、方案设计以及具体步骤和结果处理，以期起到实验指南的作用。

本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。一方面，约请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

“生物实验室系列”图书的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域（如医学、药学、农学）的专业研究人员，企业或公司的生产、研发、管理技术人员，以及高校相关专业的教师、研究生等。

我们殷切希望“生物实验室系列”图书的出版能够服务于我国生命科学的发展需要，同时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提供宝贵意见和建议，也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者，以便我们能够集思广益，将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种，推陈出新。

**谨向所有关心和热爱生命科学，为生命科学的发展孜孜以求的
科学工作者致以崇高的敬意！**

祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂，欣欣向荣！

化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

译 者 的 话

细胞是生命的基本单位。在细胞水平解析生命的各种生理过程及病理改变的机制,整合从 DNA 水平到 mRNA 及蛋白质水平的研究结果,是当代生命科学基础研究的活跃领域。

目前,流式细胞术(Flow Cytometry, FCM)广为基础医学研究者、临床医生及学生使用,已发展成为临床与基础科研的常用技术。FCM 是对单个细胞或其他生物微粒(如细菌、真菌、染色体、有机体和细胞聚合体等)进行快速定量分析与分选的一门技术。在分析或分选过程中,包在液流中已处理过的单个细胞通过聚焦的光源,光敏元件对这些细胞的散射光、荧光等进行测量,以确定其化学和物理性质,还可根据这些性质分选出高纯度的细胞亚群。近年来流式细胞术的灵敏度、分辨率、分析参数等方面日趋完善,不断推动着生物医学的发展。

FCM 是集现代电子物理技术、激光技术、电子计算机技术于一身的先进科学技术,涉及多学科的高深理论。但是,作为以医学生物学为学科背景的临床医生、研究人员,没有时间也没有必要去掌握其深奥繁杂的原理及细节,使用者只需要了解其最基本的原则、应用范围及主要操作步骤,便可以将该项技术直接应用于自己的工作中。

译者正是从广大科学工作者的实际需求出发,选择并翻译了这本书,奉献给如我们一样从事科研和教学工作的同仁们。本书具有科研手册的特征,简明扼要,便于查阅。可使读者在入门时,在最短的时间内对流式细胞术有基本了解;在遇到疑问时,能方便地找到有关章节获得满意答案;在设计课题时,能顺利地确定流式细胞术在自己项目中的用途,科学地完成课题的策划。总之,本书是一本省时、高效、实用的工具书,适于广大临床医生、研究人员、研究生、大学生及实验技术人员参考使用。

由于译者学识有限,书中难免有不少缺点和错误,谨请同仁们提出宝

贵意见，以便今后进一步修正。

感谢国家科技部“973”课题及国家自然科学基金对本书的支持与资助！

刘秉慈 许增禄 于北京

2005年5月12日

致 谢

我衷心感谢 M. Ackermann 教授的支持、鼓励和建议。同时感谢 P. D. M. Suter 博士的支持和有益的建议，感谢滤过性微生物学学院 (the Institute of Virology) 的职员给予的有价值的评论和建议。我还要感谢我的同事的友好帮助和技术支持，尤其是 Steven Z. Merlin (纽约)、Mario Roederer (斯坦福大学)、Joseph Martinez (亚特兰大)、Tom Just (丹麦) 和 Michael G. Ormerod 友好地提供了论文单行本及其他参考材料。

我还要感谢 Steven Z. Merlin (纽约) 输入第 1、2、3、4、5、7 章，C. Nunez M. D. 博士 (休斯敦) 输入第 6、12 章。

Rafael Nunez

内 容 提 要

本书为“生物实验室系列”图书之一。

流式细胞术是生命科学和医学研究中常用的对单个细胞或其他生物微粒进行快速定量分析与分选的高新技术。本书从实用角度出发,简洁地介绍了新型流式细胞仪的特点和常用数据分析方法,着重阐述了流式细胞术的最新应用进展。这些应用既包括细胞倍性分析和细胞周期测定等传统领域,还包括肿瘤细胞表面特征研究、免疫表型分析和树突状细胞功能确定等特殊应用,为初学者提供了简明的入门指南。更有价值的是本书详论了流式细胞术在艾滋病(AIDS)防治、精子定量及活性分析、寄生虫药物反应和细胞毒性研究等医学临床研究领域,以及基因转移效率和细胞毒性评价等生命科学前沿领域和临床前试验中的最新应用及其实例,极大地拓展了流式细胞术的应用领域,为熟练使用流式细胞仪的研究人员开拓新的研究方向提供了重要而实用的参考。

本书是从事细胞生物学、遗传学和分子生物学等生命科学及免疫学、血液学、寄生虫学、男科学、艾滋病防治和基因治疗等医学基础与临床研究的科研人员、实验技术人员和高校学生不可缺少的指导手册。

目 录

第一章 流式细胞术对医学生物学的重要性及入门	1
一、什么是流式细胞术？流式细胞术有什么重要性？	1
二、流式细胞仪是怎样工作的？	2
参考文献	3
第二章 流式细胞仪概述	5
一、FACSCalibur™	5
二、BD LSR	9
三、细胞分选仪器的特点和应用范围	9
四、Beckman Coulter	10
五、MOFlo®细胞仪	12
六、非商业生产的流式细胞计数器	14
七、Partec™Flow Cytometers (CyFlow®和 PAS®)	15
第三章 流式细胞仪的数据分析：CellQuest 软件	17
一、设门	17
二、直方图与可信区间的设定	18
三、散点图	21
四、轮廓图和密度图	23
五、数据分析的其他软件：FlowJo™/ WinMDi™	24
参考文献	25
第四章 DNA 分析：DNA 定量与细胞周期分析	27
一、细胞 DNA 含量的流式细胞分析	27
二、细胞周期分析	28
三、DNA 含量分析	31
四、典型的细胞周期分析的实例	31
参考文献	32
第五章 分子细胞计量术	35
一、用于细胞显微操作的流式细胞术/细胞分选	35

二、FISH (荧光原位杂交) 细胞计量	37
三、分子细胞计量术中的 PCR 和实时 PCR	37
四、图像及共聚焦显微镜分析	37
参考文献	38
第六章 应用多色分析法进行表面染色和免疫表型分型	39
一、白血病和淋巴瘤样品的免疫表型分型	39
二、表面分析和免疫表型分型的其他应用	42
参考文献	47
第七章 样品处理：生物安全	49
染色	49
第八章 细胞内抗原、细胞因子及病毒抗原的研究	51
第九章 流式细胞仪评估精子质量和细胞周期分析	53
参考文献	58
第十章 用流式细胞仪检测利什曼原虫前鞭毛体对别嘌呤醇的易感性	59
参考文献	61
第十一章 流式细胞术检测 HSV-1 扩增子载体的转导效率和细胞 毒性	63
一、转导效率	66
二、载体细胞毒性作用	66
参考文献	67
第十二章 流式细胞术检测树突状细胞的免疫表型及功能性研究	69
一、用流式细胞术评价人树突状细胞的表面标志	69
二、其他流式细胞分析技术对人树突状细胞和人树突状细胞系的 研究	70
三、用流式细胞术评价 DC 细胞标志和其他功能研究	72
四、用流式细胞术检测树突状细胞免疫表型	73
五、流式细胞分析技术测定 DC 摄取的抗原	75
六、用流式细胞术评价细胞因子调节的树突状细胞分裂	75
七、用 CDSE 染色后检测树突状细胞的增殖	75
八、用流式细胞术评价体外细胞毒性实验	78
九、用流式细胞术评价体内细胞毒性实验	78
参考文献	82

第十三章 总结	85
第十四章 操作指南	89
一、蛋白质的荧光素标记	89
二、藻红蛋白结合法操作流程	90
三、多聚甲醛溶液的制备	92
四、用流式细胞仪在全血中检测白细胞表面抗原	92
参考文献	94
附录一 网络上有关流式细胞仪的商业资源	95
附录二 流式细胞术中的缩略语	97
索引	101

流式细胞术对医学生物学的重要性及入门

流式细胞术是一种对细胞特征及细胞或细胞器的组成进行定性及定量分析的方法。它的基本原理是光学和电学原理。虽然流式细胞术在一个时间点仅测定一个细胞，但是新型的流式细胞仪已能在几秒钟的时间内完成对数十万个细胞的准确分析。由于流式细胞仪还具有对细胞结构特征进行定量分析的能力，因此，流式细胞仪不仅可用来对细胞进行计数分析，还可以用来对多种细胞的混合物进行细胞类型的分类研究。流式细胞术具有大大超出传统显微镜分析技术的优越性，能在瞬间完成对巨大数量细胞的准确分析，因此深受广大生物学和医学科研工作者及临床医生的欢迎，并已广泛应用于各个研究领域。

一、什么是流式细胞术？流式细胞术有什么重要性？

在 20 世纪 70 年代初，非荧光流式细胞仪就已在市场上出现了。最初的流式细胞仪多用于临床全血细胞计数分析。由于该仪器操作简便、结果可靠，越来越多的实验室开始使用，并迅速在临床实验室达到了普及的程度。而最新型的多功能的科研用流式细胞分析仪器，由于采用了荧光技术，被命名为流式细胞荧光仪（flow cytfluorometers）。目前，流式细胞荧光仪在世界范围内被广泛应用，在与细胞生物学有关的杂志上，处处可见采用流式细胞荧光仪分析所得的细胞分析数据。不仅如此，在相当数量的生物医学及免疫学领域的科研论文中都大量报道了采用流式细胞仪分析所得的结果。截至 2000 年 7 月份，MEDLINE 收录的论文中有 43200 余篇涉及流式细胞术测定的数据。

为完成精确和高质量的分析任务，所有在生物学和医学研究领域居领先地位的研究所和大学均配备有流式细胞仪，同时，流式细胞仪也广泛地应用

于临床诊断和临床医学科学研究中，并起到了关键的作用。在世界范围内，目前用于临床诊断及治疗的流式细胞荧光仪已达数千台。流式细胞仪临床上主要用于细胞倍性分析、细胞周期测定和肿瘤表面特征的观察。流式细胞仪也大量用于淋巴瘤（lymphomas）和白血病（leukemias）细胞表面标志物的研究，而这一研究具有重大的诊断和预后价值。流式细胞术也是艾滋病（AIDS）防治所采用的主要方法之一。通过监测血中 CD4 淋巴细胞水平的改变，可以判定艾滋病患者的病情进展情况以及治疗效果的优劣。可以说，流式细胞术是当前本领域最佳的技术，没有其他的方法可以代替它并达到同样的临床和科研目的。当前细胞分类，尤其是快速细胞分类，在科学研究、临床观察、临床应用及临床教学中变得越来越重要，掌握流式细胞术的理论及应用技术已成为科技工作者的普遍需求。

二、流式细胞仪是怎样工作的？

首先，在分散器中将细胞分散成为单个细胞，并使其在测定时保持存活状态。测定时，使细胞悬浮液形成流畅、不间断的细小液流，使这些单个细胞一个一个地依次通过一个小室，进入小室的细胞被激光（laser light）激活，在散射一部分激光的同时，细胞也发射出荧光。这些散射的光信号和发射的荧光信号均被收集并进行分析。通常情况下，流式细胞仪对一个单细胞同时进行如下参数的测定：

（1）前向散射光强度（forward scatter intensity, FSC）

该值的大小几乎与细胞直径成正比。

（2）侧向散射光强度（side scatter intensity, SSC）

又称 90° 散射光（orthogonal 90 degrees），其散射强度几乎与细胞内颗粒结构的质量成正比。

（3）荧光密度（fluorescence intensities）

可在几种不同的波长下测定该值。

FSC 值是一项常用的指标。通常该值可用于从荧光数据中排除由死亡细胞、聚集细胞、细胞碎片所产生的影响。使用该值即可从血液白细胞中将淋巴细胞从单核细胞或粒细胞中区分开来。笔者所在实验室一直使用侧向散射（side scatter）值对活细胞（如树突细胞）的颗粒性进行评价。

通常情况下，在进行荧光密度分析时，对每一个细胞都进行几种不同波长条件下的测定。荧光探针可以与抗体相偶联并用于反映细胞某一组分的数

量。荧光抗体最常用于显示细胞表面特异受体的密度，从而对分化不同的细胞类型的亚群分类进行辨识，其中也包括对表达导入基因的细胞和表达特殊标志物细胞的识别。

使用荧光标记技术还可以探测病毒表面受体，以及包括激素在内的不同蛋白质与其他物质结合的情况。荧光探针也能够探测细胞内的各种组分，例如，通过测定 DNA 总量即可对细胞周期进行分析。同时，新合成 DNA 的含量及特异 DNA 或 mRNA 的核酸顺序都可以通过荧光标记法进行细胞计数分析。只要具备相对应的特异抗体，任何一种细胞结构，如纹状肌动蛋白 (filamentous actin) 都可以采用细胞计数分析法进行分析。

流式细胞术还可以用来测定细胞内钙离子、膜电位、酸碱度 (pH 值)、自由脂肪酸的快速变化。流式细胞术还可以测定细胞膜的代谢状态以及线粒体的功能。

流式细胞仪这一仪器涉及一系列高新技术及设备，例如：精细的液体流和压力控制，复杂的激光束和光学仪器，灵敏的类似于数码转化器 (digital converters) 的电子探测器，以及高速高性能电脑。光学仪器将激光射入小室，聚焦成为仅有数个细胞直径大小的光束。流控系统依据流体动力学原理对细胞流中的单个细胞直径的大小范围内进行聚焦，在分选仪中将细胞流分割为大小一致的微粒，以便将细胞逐一分开。电子控制台对微弱的散射光和荧光进行定量检测，在计算机的控制下，选取含有目的细胞的带电微粒，将其转移至独立的试管或培养孔中。计算机对每个样品中的成千上万的细胞的分析结果进行记录并以图文形式显示出来。

流式细胞术的分类技术已由先前的获取数个细胞，发展到收集若干细胞进行单细胞分析，或者（并且）收集大量的具有某一共同特征的细胞，将其发送到特定容器中进行分析。

参 考 文 献

1. Robinson, J.P. 1998. *Current Protocols in Cytometry*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
2. Coligan, J.E. 1998. *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
3. CellQuest software reference manual. 1997. Becton Dickinson immunocytometry systems.

4. Watson, J. 1998. Purdue Cytometry CD-ROM. Volume 4, Purdue University Cytometry Laboratories. <http://www.cyto.purdue.edu>
5. Ormerod, M. 1999. Flow cytometry. Bios Scientific, ISBN: 185996107X.
6. Ormerod, M. Data Analysis in Flow Cytometry: A Practical Approach. A CD-ROM.
http://ourworld.compuserve.com/homepages/Michael_Ormerod.
7. Steinkamp, J. 1984. Flow cytometry. Rev. Sci. Instrum. 55: 1375-1400.
8. The Art of Fluorescent Activated Cell Sorting: Research Notes from Becton Dickinson Order number 23-2137-00.
9. Givan, AL. 1992. Flow Cytometry: First Principles. Wiley-Liss, New York.
10. Bagwell CB. 1993. Theoretical Aspects of Data Analysis. In: Clinical Flow Cytometry Principles and Application. Ed Bauer KD, Duque RE and Shankey TV. Pages 41-61.

流式细胞仪概述

标准台式流式细胞仪与血细胞计数器非常相似。实际上，流式细胞仪的雏形可以追溯到早期的全血细胞计数器。今日的流式细胞仪已不再像早期的那样使用电子阻抗原理测量液体流中的微粒成分，而是使用照明光源，常用的光源包括激光器或弧光灯。绝大多数的计数仪器制造商使用一种空气制冷氩气激光器，它可以在 15 毫瓦功率下发射固定波长为 488nm 的单色光线。当微粒或细胞依次流出通过聚焦光线时，光线便会向各个方向发生散射。如果用荧光素标记细胞相关的单克隆抗体，激光就会激发抗体产生荧光。对有关信号结果的处理，不仅可以得到细胞结构和抗原多样性方面的信息，而且还可以得到有关细胞大小（前向散射光强度，FSC）、细胞形态或细胞内部复杂物质（侧向散射光强度，SSC）的信息。

流式细胞仪被设计成按质量控制程序进行常规的检测，该程序使用一系列未标记和荧光素标记的标准微粒作为仪器校准和敏感度方面的参照检验，因此，每一步的流式细胞程序操作都是仪器质量、样品准备情况和操作者水平的反映，并最终形成制度化。

一、FACSCalibur™

FACSCalibur 使用空气制冷的氩气激光器，固定发射波长为 488nm。该仪器能检测出六种参数：前向散射光（FSC）、侧向散射光（SSC）和使用氩气激光器产生的三种荧光发射光（绿色、橘黄色和红色）。较小的二极管激光器发出的 635nm 的红光被用来激发复合物产生 650nm 以上波长的荧光，并通过使用第四种荧光检测器（光电倍增管）来检测。图 2-1～图 2-3 列出了流式细胞仪的常规系统设计和结构组件排列的情况。其中图 2-1 说明