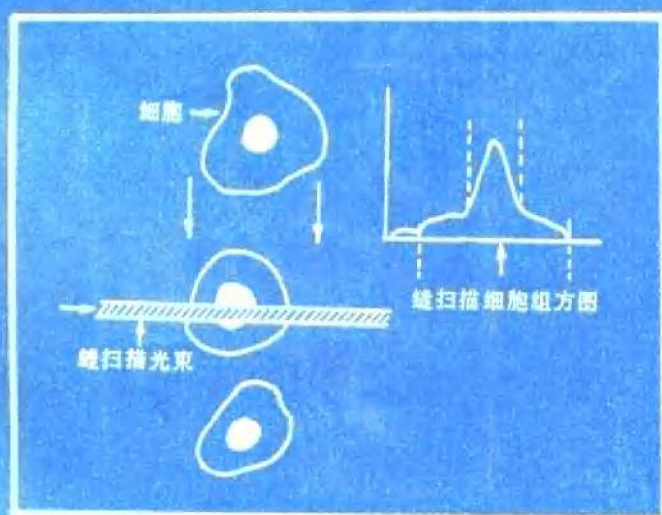


# 流式细胞术 样品制备技术

左连富 主编



华夏出版社

# 流式细胞术样品 制备技术

左连富 主编

王凤荣 张祥宏  
郭建文 谢同欣 编写

华夏出版社

1991年·北京

# 流式细胞术样品制备技术

左连富 主编

王凤荣 张祥宏 编写  
郭建文 谢同欣

华夏出版社出版发行

(北京东直门外香河园北里4号)

新华书店经销

北京市双桥印刷厂印刷

787×1092毫米32开本 5.25印张 107千字

1991年8月北京第1版 1991年8月北京第1次印刷

印数1—700册

ISBN7-80053-936-9/R·075

定价：3.80元

# 前 言

流式细胞术 (Flow Cytometry, FCM) 是70年代发展起来的一种快速的单细胞定量分析和分选的新技术, 能定量分析细胞的生物化学成分。其检测速度之快, 统计学精度之高, 是其它的方法无可比拟的。可同时从一个细胞中测得多种参数 (如 DNA、RNA、蛋白质、细胞体积等) 进行多信息分析, 为细胞生物学和生物医学的研究提供了强有力的手段。在80年代, 流式细胞术已较广泛地应用于基础和临床医学的研究, 使之成为切实可行的有效研究方法。在医学领域中已得到推广应用, 在免疫学、体细胞遗传学、临床肿瘤学、病理学、放射生物学等学科, 已形成了独特的学科分支, 诸如流式免疫学、流式遗传学、流式细胞病理学、流式细胞酶学等。FCM 主要用于定量分析细胞表面和细胞内抗原, 以及细胞分子水平的核酸含量。这些参数的定量变化已被用于确定正常和异常细胞的分化和生长, 预示各种病理状态下细胞的生物学行为。

近年来, 随着科学技术的进展, 多种新的荧光探针不断出现, 使 FCM 技术的应用范围不断扩大, 特别是各种各样的荧光探针标记的单克隆抗体和其它蛋白质出现, 为 FCM 研究各种细胞膜抗原和细胞内抗原、肿瘤性蛋白、致癌基因开辟了新途径。一代新的肿瘤标记物的出现, 大大推动了 FCM 在肿瘤学中的研究水平, 其发展速度很快, 应用层出不穷。

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，开创了荧光技术的又一个崭新领域，近年来此技术发展十分迅速，具有更高灵敏度、高分辨率、双激光、多参数分析的仪器不断问世，并朝着经济实用、操作简便、小巧精制、自动化程度高的方向发展。确信流式细胞术进一步与其它技术的结合，将极大地推动生物医学的发展。

本书以国内外和我室实际工作中所采用的流式细胞分析样品制备技术为基础，可供流式分析技术人员参考与推广应用。由于编者学识有限、经验不足，书中难免有不少缺点和错误，务请同仁不吝赐教，提出宝贵意见，以便今后进一步修正提高。

编者谨志

1991年2月

# 目 录

第一节 流式细胞术基本原理简介.....	1
一、概念.....	1
二、流式细胞术的工作原理.....	1
三、流式细胞术的特点.....	4
四、流式细胞术可测量的参数.....	4
五、影响流式细胞术定量分析的因素.....	5
六、狭缝扫描流式细胞计.....	6
第二节 流式细胞术的样品制备技术概论.....	8
一、酶学法.....	9
二、化学法.....	10
三、物理法.....	10
第三节 新鲜实体瘤组织单细胞悬液的制备.....	11
一、酶消化法.....	12
二、机械法.....	13
三、化学法.....	15
四、低渗组织液处理法.....	17
第四节 石蜡包埋组织单细胞悬液的制备.....	19
第五节 脱落细胞样品单细胞悬液的制备.....	24
第六节 血液单细胞样品的制备.....	27
一、淋巴细胞的制备.....	28
二、粒细胞的制备.....	32
三、单核细胞的制备.....	32

四、白血病细胞的制备	34
五、流式细胞术检测血中网织红细胞的样品制备	34
第七节 细胞培养及单细胞悬液的制备	38
一、细胞培养	38
二、单细胞悬液的制备	39
第八节 单细胞悬液的保存	42
一、深低温保存	42
二、70%乙醇或75%甲醇固定保存	44
三、其他固定剂保存	45
第九节 流式细胞术定量细胞学荧光染色技术	46
一、定量细胞学染色原理	46
二、定量荧光细胞染色技术的评价标准	48
三、定量 DNA 荧光染色技术	48
四、定量 RNA 荧光染色技术	53
第十节 影响定量细胞学荧光染色的因素	59
一、温度的影响	59
二、pH 的影响	61
三、荧光染料浓度的影响	62
四、杂质对细胞荧光染色的影响	63
五、细胞固定剂对细胞荧光染色的影响	64
六、其他影响因素	65
第十一节 流式细胞术参考标准样品的制备	67
一、使用参考标准样品的意义	67
二、参考标准样品的性质	68
三、参考标准样品的制备	68
四、石蜡包埋肿瘤 DNA 倍体分析的二倍体参	

考标准样品的选择 .....	75
<b>第十二节 流式细胞术免疫学样品的制备 .....</b>	<b>79</b>
一、流式细胞术免疫学样品制备的基本原理和常用方法 .....	80
二、流式细胞术检测造血系统恶性肿瘤细胞表面标记抗原的样品制备 .....	81
三、流式细胞术检测癌基因蛋白及其它细胞内抗原的样品制备 .....	89
四、流式细胞术进行抗细胞表面抗原的单克隆抗体制备的初筛 .....	98
五、流式细胞术检测石蜡包埋组织细胞表面植物凝集素受体的样品制备 .....	100
六、流式细胞术免疫荧光染色样品制备过程中一些人工假象的分析及处理 .....	102
七、流式细胞术在其它方面的一些应用 .....	104
<b>第十三节 流式细胞术分析染色体组型的样品制备 .....</b>	<b>108</b>
<b>第十四节 流式细胞酶学方法 .....</b>	<b>113</b>
一、流式细胞酶学方法的条件 .....	114
二、用荧光底物可能测定的酶活性 .....	115
三、常见的几种酶及其相应的荧光底物配方 .....	115
四、酶活性检测的样品处理及注意事项 .....	115
<b>第十五节 流式细胞术定量检测雌激素受体的方法 .....</b>	<b>117</b>
<b>第十六节 流式细胞术检测E-玫瑰花环实验方法 .....</b>	<b>121</b>
<b>第十七节 流式细胞术检测血液红细胞感染疟原虫的方法 .....</b>	<b>125</b>
<b>第十八节 流式细胞术鉴别死活细胞的 PI 荧光染</b>	



色法 .....	127
第十九节 荧光显微镜技术简介 .....	130
一、基本原理 .....	130
二、荧光显微镜的基本结构 .....	132
三、荧光显微镜的使用方法 .....	135
第二十节 用荧光显微术观察 FITC 和 PI	
对固定细胞的蛋白和 DNA 的双染色 .....	136
第二十一节 荧光显微术观察活细胞的线粒体和细	
胞核 .....	138
第二十二节 实验溶液的配制 .....	140
一、荧光染色液的配制 .....	140
二、酶类溶液的配制 .....	141
三、平衡盐溶液的配制 .....	143
四、磷酸缓冲液的配制 .....	144
五、细胞生长培养液的配制 .....	146
六、其它溶液的配制 .....	153
第二十三节 流式细胞仪的操作程序及注意事项 .....	156

# 第一节 流式细胞术基本原理简介

## 一、概 念

制备合格的单细胞悬液，在悬液中的细胞以很高的流速通过光照区，其产生的光学或电子信号被敏感的探测器接受，并测得细胞或亚细胞成分的重要生物学性质，这些被测得的生物学性质的信号被定量分析。

## 二、流式细胞术的工作原理

流式细胞仪具有对细胞分析和分选的功用，是近年来荧光细胞分析技术的创举，开创了生物细胞研究的新领域，其主要原理见图1。

### (一) 流式细胞仪的细胞分析原理

将制备好的单细胞悬液通过样品管被压进喷嘴的中央，同时无细胞的鞘液通过鞘液管也被压入喷嘴，形成包绕细胞悬液的壳液流，这种同轴流动的设计使得样品流和鞘液流形成的流束始终保持着一种分层鞘流的状态，样品流呈中心轴流状态，通过调节液流的气体压力装置系统，使壳液的直径保持在 $50\sim 100\mu\text{m}$ 左右，使样品流的直径在 $30\mu\text{m}$ 左右，鞘液和样品流组成一个圆形的流束，一起自喷嘴的圆形宝石

孔喷射出来，进入流动室，与水平方向的激光光束（一般为氩离子激光器）垂直相交。稳定的液流推动装置一般采用纯净的氮气为动力，使细胞样品依次排列成单行，每个细胞以均等的时间依次通过激光照射区，被荧光染色的细胞受强烈的激光照射后发出荧光，同时产生光散射，荧光信号的收集可在激光光束垂直的 $90^\circ$ 方向距喷嘴顶部 0.25mm 的地方进行探测。光散射信号在前向小角（ $0.5\sim 2.0^\circ$ ）进行探测，这种测量称“近前向小角光散射”。在这种情况下产生的光散射信号基本上反映了细胞体积的大小。细胞发出的荧光信号和光散射信号同时被呈 $90^\circ$ 角方向的荧光光电倍增管和前向光电二极管接收，被积分放大后转换为电子信号输入电子讯息接收器，在多道（512道）脉冲高度分析仪的荧光屏上，以一维组方图或二维点阵图以及数据表或三维图形显示出来，并由 X-Y 轴打印机将资料打印出来。或将图形和数据直接输入联机专用的计算机，或存入磁盘，以备分析。计算机快速而精确地将所测数据计算出来，结合多参数分析，从而实现了细胞定量分析。

## （二）细胞分选的原理

细胞的分选是通过流束形成含有细胞的带电液滴而实现的。在流动室的喷嘴上装配有一个超声振荡压晶体片，这个振荡装置在充电后，以每秒钟 4 万次的振动频率，使自喷嘴喷射出的液束破碎成上万个小滴/秒。流动的细胞就被分散在这些小水滴中，小水滴的形成是在对细胞的荧光和光散射被测量之后形成的。这时给流束一个充电脉冲信号，使整个滴流被充以电流，这样，小水滴就全部带上了电荷。从细胞被测量到细胞形成小水滴都有一定的时间延迟。当充有不同

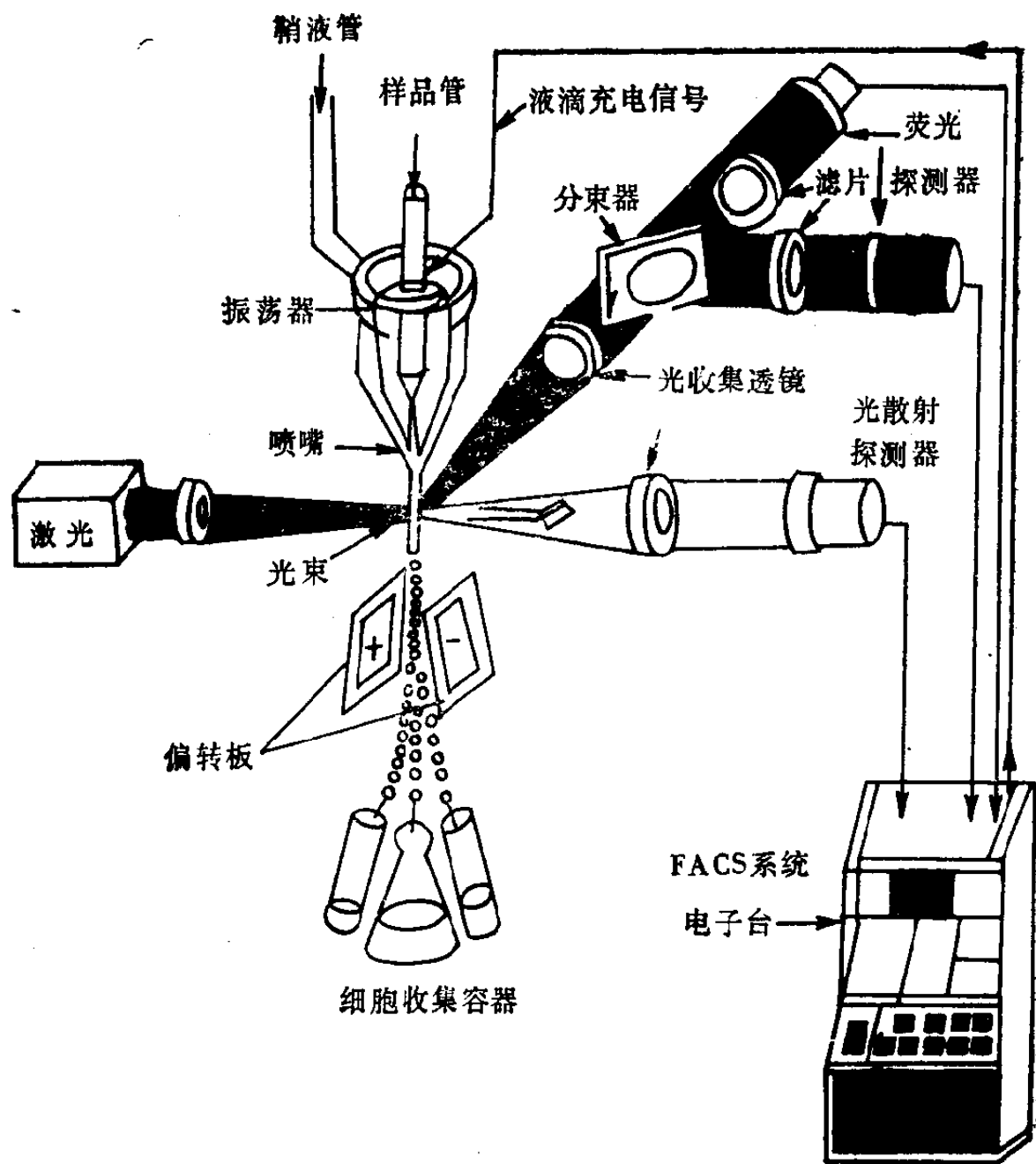


图 1 FCM 主要原理示意图

电荷的细胞液流经一对带有正、负几千伏恒定静电电场的偏转板时，带电的小水滴就根据自身所带的电荷性质产生偏

转，落入各自的收集容器中，不带电荷的水滴就进入中间废液容器中，从而实现了细胞的分选。至于小液滴被充以正或负电荷，则根据被测细胞的荧光和光散射信号预先选定的脉冲高度进行比较决定的，对于分类无意义的细胞或碎片或与预选值相当接近而很难分类的细胞不予以充电。

### 三、流式细胞术的特点

流式细胞术与其他细胞分析技术相比有以下特点：

1. 高速度，每秒钟可检测1000~5000个细胞。
2. 高灵敏度，每个细胞只要带有1000~3000个荧光分子就能检出，两个细胞之间有5%的差别就可区别出来，光散射的灵敏度为  $0.3\mu\text{m}$ 。
3. 高精度，在细胞悬液中测量细胞，比其它分析技术的变异系数更小，分辨率高。
4. 高纯度，分选细胞的纯度可达99%以上。
5. 多参数，从一个细胞中同时可定量检测 DNA、RNA 等多个参量。
6. 在适当的条件下，可对活细胞进行无害性的分析和分选。

### 四、流式细胞术可测量的参数

主要参数可分为结构和功能两部分（表1—1）：

表 1—1 流式细胞术可测量的主要参数

主要参数	结构	①细胞大小、形态 ②胞核与浆比值 ③色素颗粒	④亚细胞形态 ⑤DNA、RNA、蛋白质含量 ⑥细胞表面抗原	⑦硷性蛋白 ⑧染色体结构 ⑨细胞表面糖原等
	功能	①氧化还原酶状态 ②表面电荷 ③ pH 值 ④膜电位	⑤酶活性 ⑥ DNA 合成能力 ⑦膜的流动性 ⑧细胞内受体	⑨线粒体膜电位 ⑩细胞浆和膜的钙离子活性 ⑪细胞膜受体等

## 五、影响流式细胞术定量分析的因素

从以上流式细胞术的原理的叙述来看，定量分析的成败关键在于各个环节的稳定性，那么有哪些因素可以影响 FCM 分析的稳定性呢？

1. 细胞的荧光染色 对细胞的荧光染色保证相对一致性是重要因素之一，在同类细胞样品中，保证每个细胞对荧光染料分子的亲合性是相对均匀一致的，以 DNA 染色为例，DNA 含量多的细胞，吸收染料分子亦多，反之则少，染色技术应做到吸收染料分子与 DNA 量成正比，荧光强度与吸收染料分子成正比，荧光脉冲的幅度与荧光强度成正比。还应做到染色的浓度、时间、温度、pH 值、细胞数相对一致性。但更要避免细胞染色发生饱和效应，因此染液浓度要合适。

2. 激光光源的稳定性 不仅要求激发光束的功率高，稳定性好，还要求光场分布一致，为保证同一细胞群荧光脉冲呈单峰的正态分布，要求激光的工作状态呈 TEM<sub>00</sub> 模式，其光场为单一的高斯分布。

3. 细胞流速的稳定性 流速稳定性的控制是极其重要的，必须保证通过光学检测区的每个细胞流速相等，这是因为每个细胞发射荧光强度与细胞受照时间有关。为保证荧光强度与细胞 DNA 含量成正比关系，就须使液流的流动，时刻处于稳定的分层鞘流和流速通过检测区。

4. 细胞悬液样品的影响 流式分析与分选的成败与否，悬液样品的制备质量是极为重要的环节，细胞粘连、团块常造成管道阻塞，重叠细胞可造成分析误差，也可引起分选失败，造成分选脉冲的自动消失。样品中的杂质碎片过多，噪音大于信号，可造成分析失败。

## 六、狭缝扫描流式细胞计

狭缝扫描流式细胞计 (Slit-Scan Flow Cytometer) 与一般流式细胞计的基本结构相同，一般流式细胞计的激光光斑为椭圆形，光斑直径大于被检细胞体积，只能提供细胞内某种生物化学成分的参数，而不能对细胞形态以及亚细胞形态进行分辨，所以称一般流式细胞计为零分辨率的流式系统。为此，Whleeless 等在一般流式细胞计的基础上，又致力于发展了窄缝扫描流式细胞计，它与一般现有的商品化流式细胞仪不同之处有以下几点：

1. 一般流式细胞仪是零分辨力的检测技术，而狭缝扫描流式计是一种低分辨率的检测技术，激光光束为一条线状扁平的光斑，直径在  $3\sim 5\mu\text{m}$ 。

2. 被检细胞直径大于激光光斑直径 (图 2)，当细胞通过光束时，细胞各部分被依次先后扫描，各部分的荧光信号

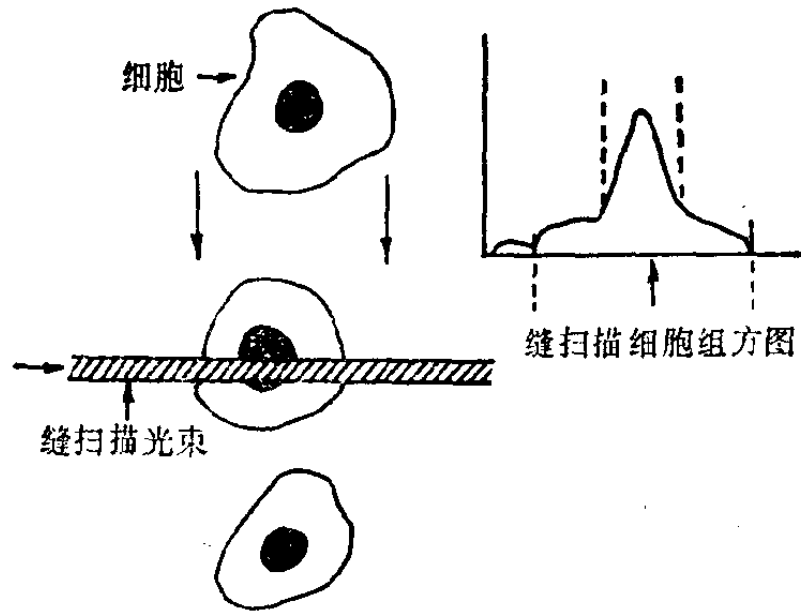


图 2 狭缝扫描流式细胞计示意图

有先后之分，就可得到一维的细胞轮廓组方图，可计算出细胞直径大小、核直径大小、核浆比例等一系列的形态学信息的定量资料。

3. 狭缝扫描流式细胞计的光信号探测装置与一般流式细胞计有所不同。探测器分别在 X、Y、Z 轴三个方向设置，Z 轴的探测器是浸没在流动室的，面对液流方向。激光照射的正前方为 X 轴探测器，Y 轴探测器设置在激光照射的反方向。X、Y 轴的探测器是在细胞成象的平面上设置一组光电半导体列阵，以检测 X、Y 两个方向的荧光信号。由于不同方向设置的探测器，就得到细胞的三维轮廓图。由于半导体列阵光电器输出信号有些延迟，表现在细胞轮廓图上也表现延迟。由于胞浆结合荧光染料分子少，发出的荧光弱，细胞核与荧光染料结合多，发出荧光强，从组方图上看到中心峰为核荧光，两边为胞浆荧光（见图 2），这样就可以测得细胞直径、核直径、核浆比、核荧光、胞浆荧光强度等形态学



信息。除以上信号外，还可得到核形、核在细胞中的位置。狭缝扫描流式细胞计在定量研究、细胞形态研究具有很大的应用前景，为体细胞遗传学的研究提供了更精良的技术。

(左连富)

### 参 考 文 献

1. 许松林, 等: 激光流动细胞分析实验, 应用激光杂志 1981; 1(6):12
2. Melamed MR, et al: Flow cytometry and sorting. John Wiley & Sons New York 1979.
3. Shapiro HM, et al: Practical flow cytometry. Alan R. Liss, Inc, New York 1985.
4. Van Dilla MA, et al: Flow cytometry: Instrumentation and data analysis. Academic Press London 1985.
5. Cambier JL, et al: A multidimensional slit-scan flow system. J Histochem & Cytochem 1979; 27(1):321
6. Shapiro HM, et al: Technical developments in flow cytometry. Human Pathol 1986; 17:649
7. Wheelless LL, et al: Wheelless and patten developed resolution slit-scan technique to provide limited morphological information on cell. Acta Cytology 1971; 15:111

## 第二节 流式细胞术的样品 制备技术概论

流式细胞术是近年来发展起来的细胞学分析技术。它对细胞的分析检测必须基于单细胞的基础上，这是流式细胞术