

Clinical Flow Cytometry in Practice



实用流式细胞分析技术

主 编 郑卫东 周茂华 主 审 刘艳辉

广东省出版集团

广东科技出版社 || 全国优秀出版社

014009283
C14009283

R446
19

Clinical Flow Cytometry in Practice

实用流式细胞分析技术

主 编 郑卫东 周茂华 主 审 刘艳辉



北航

C1695441

广东省出版集团 广东科技出版社
· 广 州 ·

R446

19

图书在版编目 (CIP) 数据

实用流式细胞分析技术 / 郑卫东, 周茂华主编. —广州:
广东科技出版社, 2013. 10

ISBN 978 - 7 - 5359 - 6109 - 9

I. ①实… II. ①郑…②周… III. ①细胞—生物样
品分析—定量分析—应用—医学检验 IV. ①R446

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 053489 号

责任编辑: 周良曾冲

封面设计: 林少娟

责任校对: 黄慧怡

责任印制: 任建强

出版发行: 广东科技出版社

(广州市环市东路水荫路 11 号 邮政编码: 510075)

http: //www. gdstp. com. cn

E-mail: gdkjyxb@gdstp. com. cn (营销中心)

E-mail: gdkjzbb@gdstp. com. cn (总编办)

经 销: 广东新华发行集团股份有限公司

印 刷: 广州嘉正印刷包装有限公司

(广州市番禺区大龙街大龙工业区新凌路边 C 号 邮政编码: 511450)

规 格: 889mm × 1 194mm 1/16 印张 14. 75 字数 360 千

版 次: 2013 年 10 月第 1 版

2013 年 10 月第 1 次印刷

定 价: 138. 00 元

如发现因印装质量问题影响阅读, 请与承印厂联系调换。

《实用流式细胞分析技术》编写人员名单

主审 刘艳辉

主编 郑卫东 周茂华

编写人员（以姓名汉语拼音为序）

方 伟 广东省人民医院/广东省医学科学院

韩晓燕 中山大学附属第三医院

刘艳辉 广东省人民医院/广东省医学科学院

罗 盈 广东省人民医院/广东省医学科学院

欧阳涓 中山大学附属第一医院

Sophie Song 美国加州大学洛杉矶医学中心病理系

张富程 中山大学附属第三医院

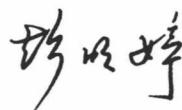
郑卫东 广东省人民医院/广东省医学科学院

周茂华 广东省人民医院/广东省医学科学院

序

流式细胞术是 20 世纪 70 年代发展起来的一种可以对细胞或亚细胞结构进行快速测量的新型分析技术和分选技术。该检测技术因具有分析速度快、精度高、结果可靠，以及能同时进行多参数分析等优点而得以在多学科广泛使用。现阶段流式细胞术已普遍用于免疫学、血液学、肿瘤学、细胞生物学、细胞遗传学、生物化学等临床医学和基础医学研究领域。临床应用方面，该技术主要用于血液病、肿瘤、感染性疾病、过敏性疾病、自身免疫性疾病、梗塞性疾病的诊断和治疗监测以及组织器官移植排斥的监控等。

广东省人民医院检验科郑卫东和周茂华主编的《实用流式细胞分析技术》一书介绍了流式细胞术的分析原理、标本处理、临床常用流式细胞分析仪的操作程序，以及目前国内流式细胞术实验室常规开展检测项目的原理、操作方法及临床意义，包括淋巴细胞亚群分析、淋巴造血系统肿瘤的免疫分型、HLA - B27 的流式检测、PNH 阳性克隆的筛查、细胞因子的检测、造血干细胞的流式分析以及细胞凋亡的检测等。该书内容全面、务实，理论联系实际。编者们在查阅国内外文献的基础上，结合各自在临床工作中的经验体会，对相关内容进行了很好的诠释。同时配以大量的临床图例，便于读者更好地学习理解。该书不仅适用于从事临床流式细胞术应用的专业人员，而且可用于检验医学专业人员、临床医生和医学研究人员的教学、科研和继续教育等工作。



2013 年 5 月

前 言

近年来,随着我国综合实力的不断增强以及不同型号的临床流式细胞仪的不断推出,流式细胞术在临床医学中的应用越来越广泛。目前,国内多数大型三甲医院都已购买了流式细胞仪,并用于临床检验。流式细胞术不仅可以分析细胞膜、细胞质和细胞核内的成分,而且还能定量分析液体中的可溶性物质。它具有分析速度快、精度高、准确性好以及能同时进行多参数分析等优点。但是,由于流式细胞仪的工作原理涉及光电学、流体动力学、单克隆抗体技术、免疫荧光技术、激光技术以及计算机专业软件等诸多高新技术知识,这使得流式细胞分析的仪器操作人员不易较快掌握其工作原理以及操作技术。再者,由于流式细胞术在临床医学中的应用涉及免疫学、血液学、肿瘤学、细胞生物学、细胞遗传学、生物化学等临床医学和基础医学相关知识,这也要求流式分析人员具有广博的多学科的相关知识。

广东省人民医院检验科流式细胞室自1997年购进第一台流式细胞仪后即开展了临床流式细胞术的相关检查。十几年来,科室已培养出多位具有丰富临床使用经验的中青年流式细胞术专业人员。这次我们组织科室有关流式细胞术专业人员,同时邀请中山大学附属医院的流式细胞分析专家共同编写此书,一方面向读者介绍流式细胞术的分析原理、标本处理、临床常用流式细胞分析仪的操作程序;另一方面主要介绍目前国内流式细胞术实验室常规开展的检测项目的原理、操作方法及临床意义,包括淋巴细胞亚群分析、白血病免疫分型、淋巴增殖性肿瘤免疫分型及多发性骨髓瘤的免疫分型、HLA-B27的流式检测、PNH阳性克隆的筛查、细胞因子的检测、造血干细胞的流式分析以及细胞凋亡的检测等。编者在查阅国内外文献的基础上,结合各自在临床实际工作中的经验体会,理论联系实际,对相关的内容进行了很好的阐述。同时配以大量的临床图例,便于读者更好地理解相关内容。该书不仅适用于从事临床流式细胞术应用的专业技术人员,而且对于检验医学专业人员、临床医生和医学研究人员更好地应用流式细胞分析技术也有促进作用。

在此,我们衷心感谢广东省人民医院病理医学部病理科的刘艳辉教授和美国加州大学洛杉矶医学中心病理系的流式细胞专家 Sophie Song 教授,感谢他们在百忙之中抽出宝贵的时间参与本书审校或编写工作!

由于时间紧迫,同时由于编者水平有限,书中可能存在疏忽及错漏之处,敬请读者、专家和同行批评指正!

本书编写组

2013年5月于广州

目 录

第一章 流式细胞分析技术原理	1
第一节 流式细胞仪的组成部件和工作原理	1
一、流式细胞仪的组成部件	1
二、流式细胞仪的工作原理	2
第二节 流式细胞分析技术的相关概念	3
一、前向散射与侧向散射	3
二、荧光信号	3
三、流式通道	4
四、流式图	5
五、光谱重叠与荧光补偿	6
第三节 流式细胞分析技术的基本原理	7
一、阈值设定	7
二、光电倍增管电压设定	8
三、补偿调节	9
四、门与设门	10
五、分析原理	11
第二章 流式细胞分析标本处理	12
第一节 流式细胞分析标本来源与制备	12
一、外周血标本	12
二、骨髓标本	13
三、实体瘤组织标本	13
四、脱落细胞标本	14
五、培养细胞标本	14
第二节 流式细胞分析对照的设置	14
一、阴性对照的设置	14
二、阳性对照的设置	16
三、空白对照的设置	16

四、补偿对照的设置	17
第三节 流式细胞分析标记抗体的选择	17
一、荧光染料	17
二、荧光抗体	19
三、荧光抗体的选择	19
四、荧光抗体滴度的选择	20
第三章 流式细胞分析仪操作规程	21
第一节 FACSCalibur 流式细胞仪的操作规程	21
一、开机	21
二、校准	21
三、运行软件	24
四、样品检测	26
五、关机	29
六、仪器保养	30
七、数据分析	31
第二节 FACSCanto II 流式细胞仪的操作规程	32
一、开机	32
二、校准	33
三、FACSCanto Clinical 六色免洗淋巴细胞亚群 检测及 HLA - B27 分析	35
四、BD FACSDiva 软件进行多色获取和分析	38
五、关机	40
六、仪器保养	41
第四章 急性白血病免疫分型及应用	42
第一节 急性白血病诊断及分型	42
一、急性白血病的 FAB 分型	42
二、急性白血病的 MIC 分型	43
三、急性白血病 2008 版 WHO 分类	43
第二节 正常骨髓造血细胞分化发育的抗原表达规律	45
一、正常粒系细胞和单核系细胞的抗原表达规律	45
二、正常红系细胞的抗原表达规律	46
三、正常巨核细胞的抗原表达规律	46
四、正常 B 淋巴细胞的抗原表达规律	46
五、正常 T 淋巴细胞的抗原表达规律	46
第三节 急性白血病免疫分型的基本原理及检测方法	47
一、急性白血病免疫分型的基本原理	47
二、急性白血病免疫分型的检测方法	52
三、样本	55
四、细胞标记	55
五、流式细胞仪检测	56
六、数据分析及结果解读	56

七、临床意义	58
第四节 急性髓系白血病的免疫表型	58
一、急性髓系白血病伴重现性细胞遗传学异常	58
二、急性髓系白血病（非特指）	62
三、原始浆细胞样树突细胞肿瘤	73
第五节 急性淋巴细胞白血病的免疫表型	73
一、B 淋巴母细胞白血病/淋巴瘤	74
二、T 淋巴母细胞白血病/淋巴瘤	79
第六节 急性系列不明型白血病的免疫表型	82
一、急性未分化型白血病	83
二、混合表型急性白血病伴 t (9; 22) (q34; q11.2); BCR - ABL1	83
三、混合表型急性白血病伴 t (v; 11q23); MLL 重排	84
四、混合表型急性白血病, B/髓, 非特殊类型	84
五、混合表型急性白血病, T/髓, 非特殊类型	84
六、NK 细胞淋巴母细胞白血病/淋巴瘤	85
第七节 流式细胞术检测急性白血病微小残留	85
一、流式细胞术检测微小残留病的方法学特点	85
二、流式细胞术检测微小残留病的方法	86
三、微小残留病检测的临床应用	87
第五章 淋巴细胞增殖性肿瘤的免疫分型及应用	91
第一节 淋巴细胞增殖性肿瘤流式免疫分型的检测方法	91
一、主要仪器	91
二、主要试剂	91
三、样本	92
四、细胞标记	92
五、流式细胞仪检测	92
六、数据分析及结果解读	92
第二节 成熟 B 细胞肿瘤	93
一、2008 版 WHO 对成熟 B 细胞肿瘤的分类	93
二、成熟 B 细胞肿瘤免疫表型分析的基本思路及策略	94
三、常见的成熟 B 细胞肿瘤的免疫表型	95
第三节 成熟 T/NK 细胞肿瘤	107
一、2008 版 WHO 对成熟 T/NK 细胞肿瘤的分类	107
二、成熟 T/NK 细胞肿瘤免疫表型分析的基本思路及 策略.....	108
三、常见的成熟 T/NK 细胞肿瘤的免疫表型	109

第六章 多发性骨髓瘤免疫分型及应用	122
第一节 多发性骨髓瘤概述及流式细胞术免疫分型的应用	122
第二节 多发性骨髓瘤免疫分型	125
一、多发性骨髓瘤 FCM 检测样本的制备	125
二、多发性骨髓瘤 FCM 检测	125
三、多发性骨髓瘤 FCM 免疫表型	130
第三节 多发性骨髓瘤微量残留病流式细胞术检测	134
一、流式细胞术检测 MM 微小残留病变	134
二、MRD FCM 检测注意事项	135
三、与其他 MRD 检测方法的比较	136
第四节 多发性骨髓瘤免疫表型流式细胞术检测结果评估	137
一、浆细胞比例问题	137
二、恶性浆细胞病的临床分类问题	137
第七章 细胞凋亡的检测与应用	140
第一节 细胞凋亡	140
一、细胞凋亡概述	140
二、细胞凋亡的生物学特征	141
三、细胞凋亡发生过程与机制	142
四、细胞凋亡研究意义	144
第二节 细胞凋亡的流式细胞术检测方法	144
一、活化的 caspase 3 检测法	144
二、Annexin - V/PI 或 Annexin - V/7 - AAD 法	146
三、JC - 1 法、Apo2.7 法 (线粒体跨膜电位检测法)	148
四、TUNEL 法 (原位末端转移酶标记法)	150
五、DNA 含量分析法	152
六、SYTO/PI 双染色法	154
七、细胞凋亡相关基因蛋白的流式细胞术检测	155
第三节 细胞凋亡在医学研究中的应用	156
一、细胞凋亡与疾病发生密切相关	156
二、调节细胞凋亡治疗疾病	157
第四节 细胞凋亡研究进展	157
第八章 细胞免疫功能分析与应用	160
第一节 淋巴细胞及其亚群分析	160
一、淋巴细胞发育及其亚群分类	160
二、淋巴细胞免疫表型分析	162
第二节 淋巴细胞几种常见功能亚群分析	165
一、辅助性 T 细胞和诱导性 T 细胞	166

二、调节性 T 细胞	170
三、细胞毒性 T 细胞和抑制性 T 细胞	173
四、初始 T 细胞和记忆 T 细胞	175
五、活化 T 细胞	177
第三节 机体免疫功能监测的质量控制	180
第九章 细胞因子的检测与应用	181
第一节 细胞因子的基本概念与应用	181
一、基本概念	181
二、临床应用	181
第二节 检测方法	183
一、胞内染色法	183
二、液相芯片技术与 BD 流式微球阵列分析	187
三、方法学评价	190
第十章 PNH 阳性克隆的筛查与应用	192
第一节 基于 CD55 和 CD59 分子表达的 PNH 筛查方法	192
一、白细胞表面 CD55 和 CD59 分子的测定	192
二、红细胞表面 CD55 和 CD59 分子的测定	196
第二节 基于 FLAER 的 PNH 筛查方法	197
第三节 流式诊断和监测 PNH 及相关疾病的指南	199
一、PNH 实验的临床指征	200
二、流式细胞术检测 PNH	200
第十一章 HLA - B27 的流式检测与应用	203
第一节 概述	203
第二节 HLA - B27 检测方法	203
一、补体依赖性微量淋巴细胞毒法 (CDMA)	204
二、酶联免疫测定试验 (ELISA)	204
三、引物特异性聚合酶链反应 (SSP - PCR)	205
四、流式细胞术 (FCM) 法	205
第三节 HLA - B27 检测的临床应用	209
一、HLA - B27 检测在 AS 诊断中的应用价值	209
二、HLA - B27 在其他脊柱关节病中的应用	210
三、HLA - B27 在急性葡萄膜炎中的应用	210
四、HLA - B27 与感染性疾病的关系	210
第十二章 造血干细胞的流式分析及应用	211
第一节 概述	211
一、造血干细胞概念	211
二、造血干细胞的生物学特性	211

第二节 造血干细胞检测方法	212
一、动物体内重建实验	212
二、体外克隆形成实验	213
三、造血干细胞表面标志测定	213
第三节 造血干细胞的计数	214
一、ISHAGE 法检测 CD34 ⁺ 细胞	215
二、ProCOUNT 造血干细胞计数	217
第四节 造血干细胞的临床应用	221
一、造血干细胞移植	221
二、造血干细胞可作为基因治疗的靶细胞	222
附录 常用溶液的配制	224

第一章 流式细胞分析技术原理

第一节 流式细胞仪的组成部件和工作原理

一、流式细胞仪的组成部件

流式细胞仪 (flow cytometer, FCM) 是在光电子技术、激光技术、荧光化学、单克隆抗体技术及计算机技术等交叉融合的基础上发展起来的一种先进的生物医学仪器设备。流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 就是利用流式细胞仪对细胞进行快速、多参数分析或分选的技术。

流式细胞术具有如下几个特点:

(1) 单细胞分析: 流式细胞分析的对象是单个细胞或颗粒样物质, 各种标本用于流式分析前需经过适当的处理以制备成单细胞悬液。

(2) 多参数分析: 流式细胞分析除了可以获得细胞或颗粒性物质的物理参数外, 还可以通过荧光素标记技术对细胞的 DNA 含量、抗原表达、酶活性等进行分析。因此, 流式细胞分析可以同时单个细胞的多个参数进行分析。

(3) 高通量: 流式细胞仪每秒钟可以对成百上千个细胞进行理化特性的分析, 最终待测标本中被分析的细胞总数可高达百万个, 因此对细胞的特性识别及计数更加准确。

(4) 定性、定量分析: 流式细胞分析可以通过荧光染色检测目标抗原的表达与否以及表达量的高低。

(5) 分选功能: 带有分选单元的流式细胞仪可以将具有特定性状或功能的细胞从混合细胞群中分离出来。细胞分选尤其是单细胞分选对深入研究细胞的结构和功能具有重要价值。

流式细胞仪的基本结构一般都由以下几个系统组成, 即液流系统、光路系统、检测与分析系统。分选型流式细胞仪还包括分选系统。

(一) 液流系统

液流系统是流式细胞仪的重要组成部分之一。其主要由流动池和相互连接的管道系统组成。其中流动池是液流系统的核心, 主要由喷嘴、鞘液管和样品管组成。液流系统是基于层流原理实现样本流和鞘液流的同轴稳定流动。鞘液流从鞘液管开始, 样本流从进样管开始, 两者流经各自专门的管道后共同进入喷嘴, 经喷嘴的小孔形成稳定的可见液流, 液流中心为样本流, 外周包裹的是鞘液流。样本流中的细胞或其他颗粒以单个细胞排列方式通过流动池。

(二) 光路系统

光路系统是流式细胞仪的灵魂系统。光路系统由一系列透镜、滤光片和分光镜等光学元件组成, 它们根据波长的不同而分离各种光信号。

激光器是流式细胞仪的必需组成部件之一。因为用途不同, 流式细胞仪可以配备 1 个或 1 个以上的激光器。常用的激光器有 488nm 的蓝色激光器、635nm 的红色激光器和 405nm 的紫色激光器。当激光器发出的激光通过流动池的小孔照射到样本流中的细胞后会产生散射光, 若细胞上结合有合

适的荧光物质,则可被激光激发向四周发射荧光。因此,流式细胞仪采集的光信号可分为散射光信号和荧光信号。

滤光片是光路系统的主要元件,按照功能分为3类:长通滤光片、短通滤光片及带通滤光片。长通滤光片可以使波长大于特定波长的光通过,小于特定波长的光不能通过;例如500nm的长通滤光片可以允许500nm以上的光通过,而500nm以下的光则被反射。短通滤光片与长通滤光片刚好相反,允许小于特定波长的光通过,大于特定波长的光则被吸收或反射。带通滤光片是指波长在特定范围的光可以自由通过,而波长超出此范围的光将被反射;例如,500/50nm的带通滤光片可以允许波长在475~525nm范围内的光通过,数值500表示波长范围的中心值。

分光镜,又称为双色性反射镜,也是流式细胞仪光路系统的重要元件。它具有反射特定长波和短波的特性。使用分光镜可以对细胞信号进行多色分析。

(三) 检测与分析系统

流式细胞仪的检测与分析系统主要由光电转换器件、放大器、信号处理系统及计算机分析系统组成。

光电转换器件包括光电二极管和光电倍增管(PMT)。PMT的主要作用是将光信号转换为电流信号,并将其放大。放大器将电流信号线性放大或对数放大后,供信号处理系统处理。选择线性放大或对数放大是根据检测对象的性质而定。检测DNA含量、RNA含量及总蛋白质含量时,一般选择线性放大测量模式;而检测细胞膜表面抗原时,通常选择对数放大测量模式。信号处理系统主要由前置放大电路、脉冲峰值检测器和模/数转换电路组成。前置放大电路是流式细胞仪信号处理系统的第一个节点,它将电流信号转换为电压信号,同时调整直流背景噪声为零。前置放大电路输出的电压信号为脉冲信号,脉冲高度的峰值对应为被测细胞通过光束中心位置时产生的最强信号。脉冲峰值检测器记录和模拟峰值信号,直到模/数转换电路将模拟的峰值信号转换为数字信号后才重新复位,准备记录下一个信号。

计算机分析系统控制整个仪器的运行和数据采集与分析。每种型号的流式细胞仪都有相应的分析软件来控制与分析。

(四) 分选系统

分选系统是分选型流式细胞仪的必需组成部分。分选是建立在分析基础上,因此分选型流式细胞仪也包括上面介绍的3个主要系统。分选的目的是从样品细胞群中分出目的细胞。无菌分选得到具有活性的细胞,可以进一步做功能试验。分选的原理是通过先分析细胞,确定目的细胞,然后当该细胞所在的液滴成为独立液滴时对其进行处理,使其带上相应电量的电荷,带电荷的独立液滴在强电场中发生偏转,进入相应的收集管,即完成分选。

二、流式细胞仪的工作原理

待测标本的细胞悬液,在流式细胞仪精细的液流和压力控制下,受到鞘液的包裹和约束,细胞排成单列由流动池喷嘴高速喷出,形成细胞液柱。当细胞液柱通过流式细胞仪检测区,细胞液柱中的细胞在入射的激光束照射下产生前向散射(forward scatter, FSC)光和侧向散射(side scatter, SSC)光,若带有荧光素标记还会发射特定波长的荧光[如异硫氰酸荧光素(FITC)],这些光信号经过光电转换、放大及计算机分析系统等的处理后以流式分析特有的数据格式储存起来。流式细胞仪采集到成千上万甚至上百万个细胞的散射光和荧光信号后,还需要通过相应的分析软件读取、分析这些数据,并最终形成流式分析报告。

第二节 流式细胞分析技术的相关概念

一、前向散射与侧向散射

(一) 前向散射 (FSC)

样本流中的细胞在激光束的照射下会产生散射光，正对着激光方向的散射光信号在前向小角度进行检测，称为前向散射 (图 1-1)。它的值反映细胞体积的大小。

(二) 侧向散射 (SSC)

90°方向的光电倍增管接收到的散射光称为侧向散射 (图 1-1)。其信号强度可反映细胞的颗粒度。细胞越不规则，细胞表面的突起越多，细胞内颗粒越多，其 SSC 值就越大。

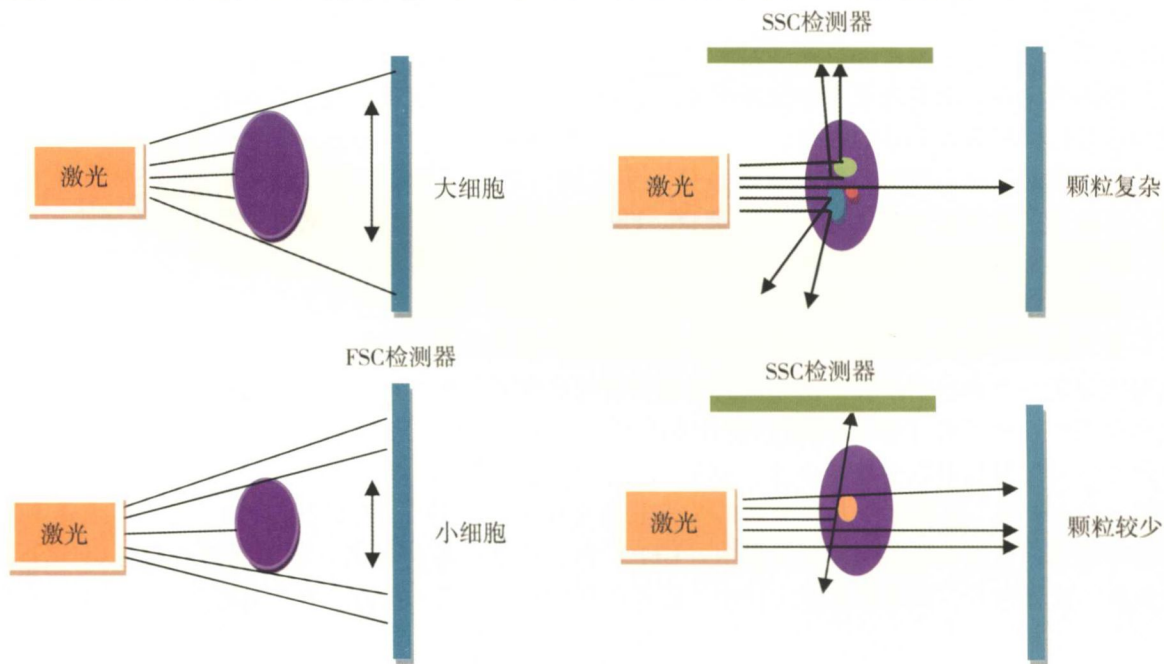


图 1-1 FSC 和 SSC 与细胞大小、颗粒丰富度的关系示意图

二、荧光信号

荧光信号是指荧光素分子受到激发后发出的荧光。在流式细胞分析中，经过荧光抗体标记的细胞通过激光照射检测区时，在激光照射下，荧光染料吸收能量发生能量跃迁，也就是荧光染料中的原子核周围电子从基础态轨道跃迁到激发态轨道，在经过短暂延迟后其将回到基础态并发出荧光，产生的荧光信号被特定波长的双色发射镜和带通滤光片组成的一组光学元部件传递到光电倍增管，形成信号脉冲。每一个信号脉冲都有其高度、宽度与面积 (图 1-2)。荧光信号脉冲的高度表示荧光信号的强度，英文表示为 $FLn - Height$ ，简称为 $FLn - H$ 。荧光信号脉冲的宽度反映荧光信号的分布情况，英文表示为 $FLn - Width$ ，简称为 $FLn - W$ ， $FLn - W$ 常用来区分双连体细胞。用流式细胞术分析 DNA 倍体时，一般应选用 $FLn - W$ 将双连体细胞区分开来。荧光信号脉冲的面积 ($FLn -$

A) 是采用积分计算的荧光通量。DNA 倍体分析时一般采用 FLn - A 和 FLn - W 进行综合分析。

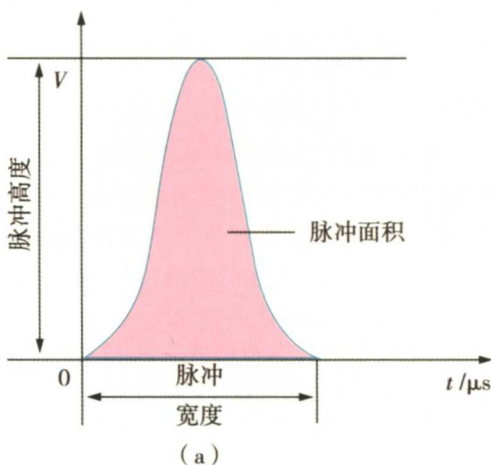


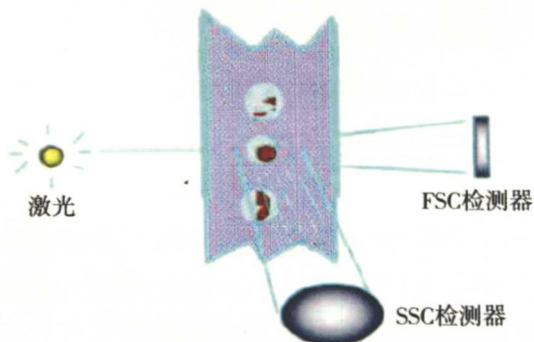
图 1-2 荧光信号脉冲高度、宽度与面积示意图

三、流式通道

流式通道包括散射光通道和荧光通道。散射光通道包括前向散射光通道和侧向散射光通道。荧光通道是指检测荧光信号的通道。

前向散射光通道和侧向散射光通道是分别接收前向散射 (FSC) 光和侧向散射 (SSC) 光的通道, 可以分别简称为 FSC 通道和 SSC 通道。FSC 通道和 SSC 通道各分配到一个光电倍增管。由于 FSC 和 SSC 是用来反映细胞的两个基本的也是非常重要的物理参数, 因此所有的流式细胞仪均有这两个通道 (图 1-3A)。

荧光通道接收细胞上结合的各种荧光素被激发后发出的荧光信号。一般而言, 每一个荧光通道也对应分配一个光电倍增管。由于流式细胞分析时经常要用到多种荧光素标记的抗体, 因此必然涉及多个荧光检测通道 (图 1-3B)。荧光通道的命名和排序有一定的规律。荧光通道的命名一般按照荧光的英文缩写加数字序号表示, 如第一荧光通道 (FL1)、第二荧光通道 (FL2) 和第三荧光通道 (FL3) 等。但是这种方式命名的荧光通道常常不止对应一种荧光素。如, FL1 通道是 FITC 的检测通道, 也可以接收绿色荧光蛋白 (GFP) 和二乙酰羧基荧光素 - 琥珀酰压胺脂 (CFSE) 被激发后的荧光信号, 因此在实际工作中, 需要依据所选择的荧光抗体, 合理分配荧光通道。



A. FSC 和 SSC 通道

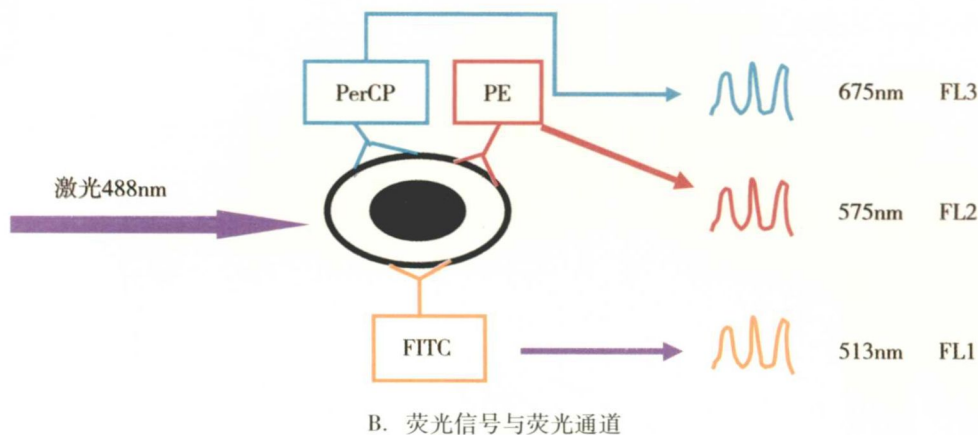


图 1-3 流式通道示意图

四、流式图

流式细胞术中使用图形化的方式对数据进行显示和分析,其中承载大量细胞参数的图形称为流式图(图 1-4)。其中单参数分析的图形表达方式为直方图;对两个以上参数进行分析的图形表达方式可以是散点图、二维等高线图与二维密度图或三维图。

(一) 直方图

流式直方图(图 1-4A)的 x 轴代表散射光通道或荧光通道的值, y 轴代表相对细胞数量。散射光通道值和发光强度之间是线性关系,而荧光通道值与发光强度之间是对数关系。直方图一般采用间距门来确定和分析细胞。通过设定合适的间距门,可以分析目标细胞的百分含量,也可以比较不同细胞群的平均荧光强度。

(二) 散点图

流式散点图(图 1-4B)的 x 轴代表一个通道的值, y 轴代表另一个通道的值,图中的每一个点代表一个细胞。流式散点图的 x 轴和 y 轴可以是散射光通道的值,也可代表荧光通道的值,因此根据不同的组合可以出现 FSC-SSC 散点图、FSC-FITC 散点图、SSC-FITC 散点图及 FITC-PE 散点图等。流式散点图更加直观地表示细胞信息以及两个通道值之间的相互关系,从而更易于区分细胞,并确定不同细胞之间的比例关系。

(三) 二维等高线图

二维等高线图(图 1-4C)是一种可以同时表示检测参数和细胞密集程度的图形表达方式。二维等高线图的密闭曲线代表细胞密度相同的区域,曲线越密集,表明细胞密度变化越快,密闭曲线的中央区域代表细胞聚集的中心。二维等高线图与散点图类似之处是同时显示两个通道的信息,其特别之处是可以直观地体现细胞群的集中点。

(四) 二维密度图

依据细胞分布的密度大小,细胞密度大的地方点的密度大,细胞密度小的地方点的密度小,使数据的显示更直观(图 1-4D)。

(五) 假三维图

假三维图(图 1-4E)并非用来显示 3 个检测参数,而只是在二维图双参数的基础上,以细胞