



流式细胞术

——从基础研究到临床医学应用

主 编◎梁智辉 胡 豫

主 审◎沈关心 吴雄文

LIUSHI XIBAOSHU

——CONG JICHU YANJIU DAO LINCHUANG YIXUE YINGYONG

流式细胞术

——从基础研究到临床医学应用

主 编◎梁智辉 胡 豫

主 审◎沈关心 吴雄文

编 委 (以姓氏笔画为序)

王 沛 荆门市第一人民医院

王 敬 武汉思力杰设备维修有限公司

王 强 华中科技大学医学院基础医学院

艾利莎 华中科技大学同济医学院附属协和医院

包建波 武汉汇信科技发展有限责任公司

朱 莉 华中科技大学同济医学院附属同济医院

伍仕敏 武汉市临床检验中心华中科技大学同济
医学院附属普爱医院

杨 李 武汉儿童医院

吴士及 华中科技大学同济医学院附属同济医院

汪 艳 中国科学院水生生物研究所

汪 峰 华中科技大学同济医学院附属同济医院

孟 青 中国科学院动物研究所

胡 豫 华中科技大学同济医学院附属协和医院

梅 恒 华中科技大学同济医学院附属协和医院

梁智辉 华中科技大学同济医学院基础医学院

熊仁宗 武汉汇信科技发展有限责任公司



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>

中国·武汉

内 容 简 介

本书是全面阐述流式细胞术基础研究与临床应用的专业性著作,内容共分五篇十三章,主要包括流式细胞仪的基本原理、流式细胞术在基础研究中的应用、流式细胞术在临床医学中的应用、流式分选术的基本原理及其应用、商品化流式细胞仪、附录。本书定位于实用技术参考书,全面而详细地介绍了流式细胞术的基本原理、操作方法及结果分析,同时对流式细胞术在临床医学中的应用展开了讨论,以图文释例的方式介绍了流式细胞术在血液系统疾病等疾病诊断中的应用。

本书层次分明,内容深入浅出,文字通俗易懂,内附 250 余张插图,可作为生命科学研究、临床医学检验等领域专业人员的流式细胞术入门书籍和实验指南。

图书在版编目(CIP)数据

流式细胞术:从基础研究到临床医学应用/梁智辉,胡豫主编. —武汉:华中科技大学出版社,2019.9
ISBN 978-7-5680-5437-9

I. ①流… II. ①梁… ②胡… 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(2019)第 156539 号

流式细胞术——从基础研究到临床医学应用

梁智辉 胡 豫 主编

Liushi Xibaoshu——Cong Jichu Yanjiu dao Linchuang Yixue Yingyong

策划编辑:陈 鹏

责任编辑:曾奇峰

封面设计:原色设计

责任校对:李 弋

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

电话:(027)81321913

武汉市东湖新技术开发区华工科技园

邮编:430223

录 排:华中科技大学惠友文印中心

印 刷:湖北恒泰印务有限公司

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:21.5

字 数:532千字

版 次:2019年9月第1版第1次印刷

定 价:168.00元



本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务
版权所有 侵权必究

序

流式细胞术是应用流式细胞仪,对处于快速、呈直线流动状态中的单列细胞或颗粒性物质进行逐个多参数定性、定量分析或分选的一种检测技术。流式细胞术于1960—1970年被提出,经过约半个世纪的发展,已成为现代生命科学研究和临床医学检验不可或缺的重要技术。

本书主编梁智辉老师于2008年编撰了《流式细胞术基本原理与实用技术》一书,本人曾为之作序。该书因兼具可读性和实用性,出版后广受读者好评,并荣获中国大学出版社协会第二届优秀教材二等奖。近10年来,基于流式细胞仪的检测技术发展迅速,且应用范围不断拓宽。为适应科研和临床医学检验专业人员及相关学科研究生的需求,梁智辉老师与胡豫教授合作,并邀请国内在流式细胞术应用领域具有坚实理论基础和丰富实践经验的专家,编著《流式细胞术——从基础研究到临床医学应用》。

本书汲取了广大读者与同道的宝贵建议,并根据各位编者自身的实践经验,介绍和阐述了流式细胞术的原理、方法技巧及应用,以为初学者提供向导和指引。

本书具有如下特点。

(1) 内容全面:全书以流式细胞术在免疫学研究领域中的应用为基础,增加了“流式细胞术在临床医学中的应用”“流式分选术的基本原理及其应用”等内容。同时,本书系统介绍了流式细胞术的选择策略、注意事项、操作技巧等,方便读者参考。

(2) 实用性强:全书详尽地阐述了流式细胞术应用过程中可能出现的重点及难点问题。如:如何客观、准确分析流式细胞术检测结果;各类细胞标本的制备。此外,本书列举了大量具有代表性的经典方法和应用实例,并系统介绍了相关的操作环节和应用程序。

(3) 图文并茂:全书层次分明,内容深入浅出,实验原理简明扼要,操作步骤详尽可行,文字通俗易懂。同时,全书以250余张插图展示了实验原理与实验结果,详述相关的分析方法,且用于资料数据分析的图释简洁清晰。

本人深感这是一本实用的专业图书,既可作为流式细胞术初学者的入门教材,也可作为流式细胞仪操作者的实验指南。可以预期,本书的出版将受到广大读者的欢迎。



中国免疫学会原副理事长
华中科技大学同济医学院免疫学系原系主任、教授

前 言

流式细胞术因其具有检测速度快、测量指标多、采集数据量大、数据分析全面、检测方法灵活等特点,已经成为生命科学研究、临床医学检验等学科不可或缺的技术之一。随着流式细胞术应用范围的不断扩大及其临床试剂的大力开发,流式细胞仪也已成为医院和公共卫生防疫部门等的基础建设设备之一。

面对日新月异的流式细胞术新技术、新方法及其在临床医学领域应用的飞速扩展,我们汲取了广大读者与同道对《流式细胞术基本原理与实用技术》的宝贵建议,考虑到生命科学研究、临床医学检验等领域专业人员对流式细胞术原理、操作和应用方面的不同需求,在秉承其编写原则的基础上,编写《流式细胞术——从基础研究到临床医学应用》一书,对前书进行了若干调整、改进。

(1) 编写原则:本书依然定位于实用技术参考书,可作为生命科学研究、临床医学检验等领域专业人员的流式细胞术入门书籍和实验指南。本书仍然秉承其“四要”编写原则,即实验原理要简明扼要、技术方法要经典实用、结果分析过程要清晰易懂、按步骤要能操作。在关注流式细胞术新技术和新发展的同时,编者总结了各自多年的研究工作与实际操作经验,阐述流式细胞术的基本原理、方法技巧及应用,以适合不同领域、不同层次的专业人员参考。

(2) 编写章节:为使得流式细胞术操作环节和应用过程介绍更加全面、丰满,本书将分五篇进行介绍:第一篇介绍流式细胞仪的基本原理;第二篇介绍流式细胞术在基础研究中的应用;第三篇介绍流式细胞术在临床医学中的应用;第四篇介绍流式分选术的基本原理及其应用;第五篇介绍商品化流式细胞仪。第一、第二、第四篇由梁智辉主编负责组稿,第三、第五篇及附录由胡豫主编负责组稿。

(3) 内容取舍:①流式细胞术检测与分析是一门技术活,不仅需要较坚实的理论知识,而且需要高超的操作技能。想要获得准确的实验数据,需要综合考虑从抗体选择、样品制备到上样检测、结果分析的全过程,其中每一个环节均有可能影响检测结果。故本书在第一篇第二章新增了“流式细胞术数据获取与分析处理”,详细介绍了如何客观、准确地分析流式数据;第三章则新增了“流式细胞术分析前的质量控制”等环节;新增补第四章“流式细胞术抗体的选择原则与标本制备及染色方法”等。本书还精炼和补充了文字叙述内容,尤其补充介绍了免疫细胞及其亚群的基础知识等。②随着流式细胞术不断由科研推向临床医学应用领域,流式细胞术在临床检验诊断中的作用越来越重要,在临床免疫性疾病、血液系统疾病的诊断、治疗与复发监测方面起到不可或缺的作用。故本书新增第三篇“流式细胞术在临床医学中的应用”,以图文释例的方式介绍了“流式细胞术在血液系统疾病诊断中的应用”“流式细胞术在成熟淋巴细胞肿瘤诊断中的应用”以及“流式细胞术在其他临床检测中的应用”等,以供临床工作者参考使用。③流式分析与流式分选是流式细胞术两大功能。《流式细胞术基本原理与实用技术》一书侧重介绍了流式分析的功能,而鲜有介绍流式分选功能,故本书新增第四篇,由国内此方面的行家着手,以实例的形式介绍了流式分选术的基本原理及其应用,以供读者参考。

衷心感谢龚非力教授为本书作序!衷心感谢沈关心教授、吴雄文教授为本书精心策

划、审校！衷心感谢北京达科为生物技术有限公司以及华中科技大学同济医学院免疫学系领导、老师与同学的大力支持！衷心感谢我们的家人对我们的大力支持！

最后，衷心感谢本书的读者！希望能给您带来方便与乐趣，同时也真诚欢迎您指出书中错漏和不妥之处。

梁智辉 胡豫

目 录

第一篇 流式细胞术的基本原理

第一章 流式细胞术发展简史	3
第二章 流式细胞仪的结构与工作原理	5
第一节 流式细胞仪基本结构	5
第二节 流式细胞仪的主要技术指标	11
第三节 流式细胞术的重要术语	12
第四节 流式细胞术基本原理	19
第五节 流式细胞术样本的设置与死亡细胞的排除	23
第六节 流式细胞术数据获取与分析处理	31
第七节 流式细胞术的基本功能、应用范围和技术特点	51
第三章 流式细胞术的质量控制	53
第一节 流式细胞术分析前的质量控制	53
第二节 流式细胞术分析中的质量控制	54
第三节 流式细胞术分析后的质量控制	54
第四章 流式细胞术抗体的选择原则与标本制备及染色方法	56
第一节 抗原抗体反应的基本特点与影响因素	56
第二节 流式细胞术抗体的选择与组合原则	57
第三节 流式标本的制备	64
第四节 流式细胞术样品的染色方法	70

第二篇 流式细胞术在基础研究中的应用

第五章 流式细胞术在细胞(生物)学研究中的应用	77
第一节 细胞表面分子的检测与分析	77
第二节 细胞内或细胞核内抗原检测与分析	79
第三节 细胞凋亡的检测与分析	90
第四节 DNA 含量检测与细胞周期分析	98
第五节 细胞增殖的检测与分析	109
第六节 细胞毒检测与分析	117
第七节 可溶性蛋白质分子的检测与分析	120
第八节 报告基因检测和分析	127
第九节 胞内活性氧水平检测与分析	131
第十节 线粒体膜电位的检测与分析	135
第十一节 细胞内钙离子浓度及其动力学检测与分析	139

第十二节	细胞自噬检测与分析	143
第十三节	FISH-FCM 技术与应用(端粒长度的检测)	144
第十四节	单细胞磷酸化蛋白质水平的检测与分析	145
第十五节	荧光共振能量转移技术及应用	147
第十六节	干细胞(SP)的检测——Hoechst33342 法	150
第六章	流式细胞术在免疫细胞研究中的应用	152
第一节	免疫细胞及其亚群的表型分析	152
第二节	流式细胞术在免疫细胞功能中的应用	170

第三篇 流式细胞术在临床医学中的应用

第七章	流式细胞术在血液系统疾病诊断中的应用	183
第一节	急性髓系白血病(AML)的免疫分型	183
第二节	B 淋巴母细胞白血病/淋巴瘤(B-ALL/LBL)的免疫分型	194
第三节	T 淋巴母细胞白血病/淋巴瘤(T-ALL/LBL)的免疫分型	196
第四节	混合表型急性白血病(MPAL)的免疫分型	197
第五节	慢性粒细胞白血病和慢性粒-单核细胞白血病的免疫分型	200
第八章	流式细胞术在成熟淋巴细胞肿瘤诊断中的应用	203
第一节	淋巴瘤	203
第二节	成熟 B 细胞淋巴瘤	203
第三节	流式细胞术在 T 细胞和 NK 细胞淋巴瘤检测中的应用	219
第九章	流式细胞术在其他临床检测中的应用	232
第一节	淋巴细胞及其亚群的检测与分析	232
第二节	CD34 ⁺ 干/祖细胞的检测与分析	236
第三节	血小板表型及其活化功能的检测与分析	240
第四节	流式细胞术在阵发性睡眠性血红蛋白尿症诊断中的应用	245
第五节	流式细胞术在强直性脊柱炎诊断中的应用	255
第六节	流式细胞术在 CAR-T 细胞治疗中的应用	257

第四篇 流式分选术的基本原理及其应用

第十章	流式分选术的基本原理和操作	265
第一节	流式细胞分选仪的基本结构	265
第二节	流式分选术的基本原理与技术特点	266
第三节	流式分选术的简要步骤	268
第十一章	流式分选术的影响因素与质量控制	270
第一节	样品质控	270
第二节	仪器质控	270
第三节	流式分选术的质控	274

第十二章 流式分选术应用实例	276
应用实例一:富集哺乳动物单倍体胚胎干细胞	276
应用实例二:获取人转基因单克隆胚胎干细胞	277
应用实例三:获取不同细胞周期状态的小鼠造血干细胞	278
应用实例四:富集小鼠睾丸组织中不同时期的精原细胞	279
应用实例五:分选胚胎期小鼠造血干细胞	280
应用实例六:研究上皮钙黏素(E-cadherin)阳性树突状细胞(DC)在肿瘤免疫 微环境中激活 T 淋巴细胞的作用	281
应用实例七:检测肿瘤患者外周血循环肿瘤细胞	283
应用实例八:研究树突状细胞(DC)亚群的抗肿瘤应用	284
应用实例九:研究大鼠睾丸生精细胞	285
应用实例十:研究病毒感染异质性细胞敏感差异性(24 孔板分选)	287
应用实例十一:研究钾离子通道 Kv1.3 的特异性调节剂在治疗自身免疫性疾病 中的应用	288
应用实例十二:分选鱼类 B 淋巴细胞及其亚群	289
应用实例十三:分选斑马鱼原始生殖细胞(转 GFP 基因斑马鱼原始生殖细胞 分选)	290
应用实例十四:分选人造血干细胞($CD34^{bright}/CD45^{dim}/SSC^{low}$)	292

第五篇 商品化流式细胞仪

第十三章 商品化流式细胞仪	297
第一节 市场主流流式细胞仪简介	297
第二节 新型流式细胞仪简介	311
附录 A 流式细胞仪常见激光器所激发的荧光染料及其特性快查表	314
附录 B 常用溶液的配制	321
参考文献	325

第一篇



流式细胞术的基本原理

Liushi Xibaoshu de Jiben Yuanli

第一章 流式细胞术发展简史

流式细胞仪是集现代电子物理技术、激光技术、计算机技术、生物学技术等于一身的先进科学技术设备,是生命科学研究领域中先进的仪器之一。流式细胞术是利用流式细胞仪对处于快速、呈直线流动状态中的单列细胞或颗粒性物质进行逐个多参数定性和定量分析或分选的技术。纵观历史,从流式细胞仪的研制、革新,到流式细胞术在当今众多应用领域的拓展,每一步都是生物学、生物技术、计算机科学、电子工程学、流体力学、激光技术、高等数学、临床医学、分子生物学、有机化学和物理学等学科知识综合运用结晶。现代流式细胞术更是结合了单克隆抗体技术和定量荧光细胞化学技术,使其在生物学、临床医学、药学等众多研究领域的应用有了突飞猛进的发展。

流式细胞仪的发展源于对细胞计数自动化的研究。早期细胞计数一直采用显微镜观察静止细胞。1934年 Moldvan 迈出了从显微镜技术向流式细胞术发展的第一步。他首先提出流动细胞计数的设想,使被染色的酵母或红细胞悬液在稳定的压力作用下一个接一个地流过显微镜载物台上的一个毛细管,并在显微镜目镜上安装光电检测仪记录每个通过显微镜视野的细胞,从而对细胞进行计数。为了让细胞一个个被检测,该实验采用了毛细管,但容易被大的细胞或聚集细胞所阻塞,而且流动细胞难以准确聚焦,流速难以维持恒定。这种困境一直到雷诺层流和湍流原理应用于细胞计数后才得到改变。1947年, Gucker 报道了应用这一原理对烟雾中的细菌进行计数的仪器。

1947年 Coulter 发明了现今称为库尔特原理的细胞计数方法。该方法将一个微孔两侧充满电解液,通电后使电流从微孔中通过;当细胞流过微孔时,因细胞与电解液之间存在着导电性上的差异,影响小孔的电阻特性,此时测量微孔两侧电压变化的脉冲,通过电脉冲信号的个数和幅度可获得有关细胞数目和大小信息。1953年, Coulter 利用这一原理制造出能快速、自动计数白细胞和红细胞数量的血细胞分析仪,随后血细胞分析仪应用于医院血液实验室进行细胞计数,现今大多数血细胞分析仪和部分流式细胞仪仍采用库尔特原理进行细胞计数和体积测定。

1953年 Crosland-Tayler 成功设计了一种鞘流系统。该系统将待测红细胞悬液缓慢注入一个快速流动的液流中,使该液流包绕在红细胞液流的外侧形成鞘流,而细胞液流始终处于轴流状态,即使在直径较粗的管道中,其中心细胞液流也比较窄,从而避免了管道的阻塞。同时,细胞液流的轴流状态使测定聚焦成为可能。这一鞘流技术奠定了现代流式细胞术中液流系统的基础。

1967年 Kamemtsky 和 Melamed 设计了流式分选装置的雏形。该装置能给注射器提供电刺激,从液流中分选出感兴趣的细胞,然后将这些细胞置于显微镜下观察分析。1969年 Van Dilla 等首先研制出现代意义上的流式细胞仪,采用氩离子激光器作为激发光源和 Crosland-Tayler 设计的流动室,液流束、照明系统光轴和检测系统光轴三者相互垂直,通过对荧光强度的检测以确定细胞内 DNA 含量。他们利用这台仪器检测 Feulgen 染色细胞 DNA 的荧光强度,发现了 DNA 倍体与荧光强度之间的线性关系,从而极大地推动了细胞动力学的发展。同年, Mullaney 等发现小角度散射光与被测粒子体积有一定关系。根据这一原理,他们以氩氦激光为光源,对直径 $5\sim 20\ \mu\text{m}$ 的微小粒子进行了测量,其结果与显微镜检查有很好的相关性。目前许多流式细胞仪都是通过测量小角

度散射光来反映细胞大小。

斯坦福大学的 Herzenberg、Bonner、Sweet 和 Hulett 等一直致力于分选型流式细胞仪的研究。1969 年 Hulett 提出以检测荧光信号为基础的细胞分选装置。1972 年 Bonner 对分选控制做了重大改进,使液流离开喷嘴后、液滴形成前即得到充电信号,从而缩短了细胞测量和液滴带电之间的时间延迟。

1972 年 Coulter 公司推出第一台单激光流式细胞分析仪。1973 年 BD 公司与斯坦福大学合作研发推出全球第一台商品化流式细胞仪 FACS-I。

从 20 世纪 80 年代至今,流式细胞仪的制造商几经变迁,一方面新的制造商不断进入市场,另一方面仪器公司之间的并购重组不断发生。流式细胞仪的生产厂家从早期的 BD 公司、Coulter 公司、Ortho 公司发展至今以 BD Biosciences、Beckman Coulter 以及 Partec 等为代表的十余家制造商。流式细胞术也随之进入了一个飞速发展的时代,制造商们制造出各种不同性能和功能的流式细胞仪,被广泛应用于生物学基础研究、医学研究与临床检验、新药开发与疾病控制、农林畜牧与水产养殖、食品与药品检测以及环境分析等各个方面,并发挥着巨大的作用。

目前,流式细胞仪的发展呈现出以下趋势:①专业化的流式细胞仪纷纷面世:从单纯大型仪器设备发展为适应各种实际需求的便携式、台式、高分辨率、成像型流式细胞仪以及高速、高质量分选型或研究型流式细胞仪等,如:专门进行 CD3/CD4/CD8 绝对计数的流式细胞仪;能安装在浮标上或船舶上用于水体微生物分析的便携型流式细胞仪。②全面自动化:流式细胞仪多同时具有自动进样系统与手动进样系统,减少了临床检验工作量;能自动进行开机校正,具有日常维护、月维护清洗功能。③多色多参数分析与分选技术快速发展:早期的流式细胞仪仅可进行单色或双色分析,随着新型荧光探针的不断开发使用和新型流式平台的开发设计,以及仪器软件、硬件方面的逐步升级与开发,多色荧光流式分析与分选得到了迅速发展。如:BD LSRFortessa 可同时配备 1~5 个不同波长的激光器,可同时检测多达 18 种荧光;BD Influx™可同时进行 7 激光 24 参数检测,具有每秒 20 万个细胞的强大分析能力、每秒 7 万个细胞的超高速分选能力,同时还具备两路、四路和六路分选,以及微孔板分选功能,还具有比例分选、位置分选等特殊分选功能。

(梁智辉 熊仁宗)

第二章 流式细胞仪的结构与工作原理

第一节 流式细胞仪基本结构

流式细胞仪基本结构包括四大模块：液流系统、光源与光学系统、信号收集与信号转换系统、应用控制系统。具有分选功能的流式细胞仪还包括分选系统。

一、液流系统

流式细胞术与其他细胞分析方法的根本区别在于被分析细胞处于单列逐个流动的状态下。这一目标是通过基于鞘流技术的液流系统来完成的，即通过恒定、高速流动的鞘液包裹细胞液流来实现的。鞘液的存在避免了细胞聚集及阻塞管路，使细胞依次且被约束成单列沿轴线方向流动，这样光束可以准确地照射在细胞液流的中心，并且每个细胞通过光源照射区的时间相等。目前的商品化流式细胞仪除 Guava 公司的产品外均采用该鞘流系统。

液流系统由流动室和液流驱动系统两部分组成，其作用是将待测样本中的细胞依次传送到激光照射区，其理想的状态是细胞到达照射区中心时，在特定的时间内，让细胞依次、恒速通过。

1. 流动室 流式细胞仪的激发光路是固定的，一般与细胞液流的轴心正交，这就要求细胞液流在流经激光聚焦区时不能偏离其轴心，且不能聚集成团或阻塞管路，否则光束无法准确照射细胞中心，造成信号不稳定，影响测量结果的精密度。流式细胞仪鞘流技术成功解决了上述问题。根据层流原理，利用专门设计的流动室，使样品流与鞘液流形成同轴流动状态。由于样品喷嘴处于流动室中央，样品流在鞘液流包裹下恒定处于同轴流动的中心位置，其精度可稳定在几微米之内。流动室还根据 Bernoulli 定律，利用大小不同的两个截面，使鞘液从截面积较大部分流经截面积较小的样本流部分，使液流聚焦在入口处，即检测点。液流系统的核心是流动室，是流式细胞仪的核心部件。它由样品管、鞘液管和喷嘴等组成，常用石英玻璃等透明、稳定的材料制作，设计和制作均很精细。流动室透光性能良好，且极其耐磨，可收集的细胞光散射信号与荧光信号通量大，配上广角收集透镜，检测灵敏度与精密度均非常高。流动室内充满着鞘液，样品管储放样品，单个细胞悬液在液流压力作用下从样品管射出形成样品流；鞘液由鞘液管从四周流向喷孔，包裹着样品流从喷嘴射出形成细胞液柱，在较窄的轴流核心列队依次通过检测区而被激光均匀照射。为了保证液流处于匀速的状态，一般限制液流速度 $v < 10 \text{ m/s}$ 。如图 2-1、图 2-2 所示。

2. 液流驱动系统 包括压缩空气泵、压力传感器、鞘液过滤器和样品压力调节器等。空气泵通过正压的方式使鞘液和样品液恒速流动，以保证每个细胞流经照射区的时间相同。样品压力调节器可使样品流变窄或变宽，改变细胞间的距离，使其间距增加或缩短，从而调整样品的进样速度，改变采样分析的速度。由于激光焦点处能量呈正态分布，中心点的能量较高，周边的能量稍低，当样品进样速度高时，处于较宽液流中的细胞因其位置不同受激光照射的能量不一样，从而造成被激发出的荧光信号强度也不一样。因此，在测量需求高分辨时应尽可能选择低速，如细胞周期分析。

使用体积恒定的压力泵，如注射器，可在单位时间内注入固定体积的样品，根据样品

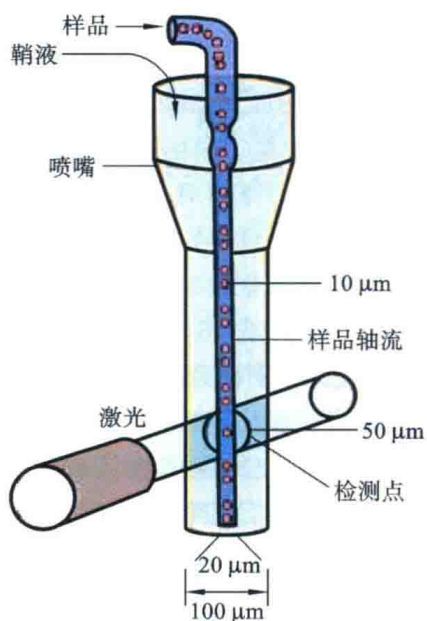


图 2-1 流动室液流原理与检测点

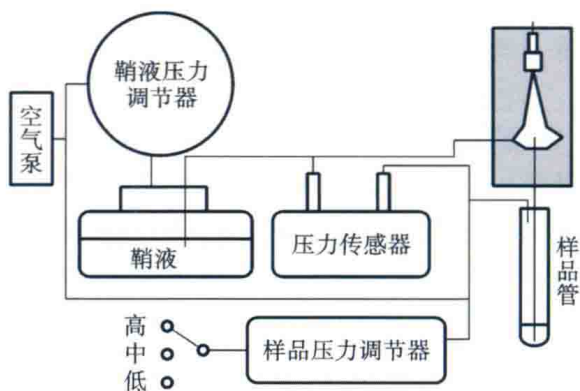


图 2-2 流动室与液流驱动系统结构示意图

流速可计算出单位体积细胞的浓度,从而实现不需要标准品的细胞绝对计数。目前这一技术在很多公司的流式产品上已得到实现。

二、光源与光学系统

流式细胞仪的检测是基于对光信号的检测来实现的,包括对散射光和荧光的检测,因此光源与光学系统是流式细胞仪中最为重要的一个系统。它由激发光源、一系列光通过和光反射的镜片组成(图 2-3)。

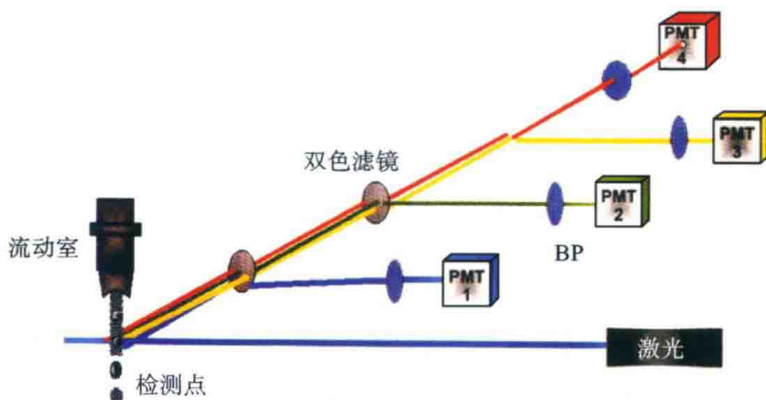


图 2-3 光源与光学系统

1. 激发光源 目前流式细胞仪所用的激发光源包括弧光灯和激光器。作为流式细胞仪的激发光源,其有两个特性是比较重要的:①单色性和单向性。单色性是指激发光往往为某一波长的光;单向性是指激发光的方向性单一,几乎没有侧散射且能进行远距离传播。激光作为流式细胞仪的激发光源,具有良好的单向性和单色性。当然,任何光源的发射波长都不仅仅是一个波长,都需要通过各种配套的光学组件来获得单色光,如氩离子激光器提供了 488 nm 和 514 nm 两条谱线,后者在应用时通过滤光片滤除;汞弧光灯可以筛选出很多波长的光,通过各种配套的光学组件,也可以取得不亚于单波长激光的单色

性。②衰减。任何光源在使用时都会有功率衰减,因此都有寿命要求,一般气体激光器、汞弧光灯可以保用 5000 小时,半导体激光器可以保用 8000 小时。

激光器根据工作物质物态的不同可分为以下几大类:①固体激光器(晶体和玻璃):其工作物质是通过把能够产生受激发射的金属离子掺入晶体或玻璃基质中构成发光中心而制成的。②气体激光器:其工作物质是气体。③液体激光器:其工作物质主要包括有机染料溶液和含有稀土金属离子的无机化合物溶液,后者中金属离子(如 Nd)起工作粒子作用,而无机化合物液体(如 SeOCl_2)起基质的作用。④半导体激光器:这类激光器是以一定的半导体材料作为工作物质产生受激发射。⑤自由电子激光器:这是一种特殊类型的新型激光器,工作物质为在空间周期变化磁场中高速运动的定向自由电子束,只要改变自由电子束的速度,就可产生可调谐的相干电磁辐射,原则上其相干电磁辐射谱可从 X 射线波段过渡到微波区域,因此具有很诱人的前景。到目前为止,固体激光器、气体激光器、液体激光器和半导体激光器等在不同制造商的商品化流式细胞仪中都有应用。

固体激光器是目前最常见,也是效果最好、使用寿命长的一种激光器。固体激光器的工作物质一般为晶体或玻璃中掺有能产生受激发射的金属离子。固体激光器的基质主要有红宝石、钇铝石榴石、钕玻璃等。掺入到固体激光器基质中的金属离子主要有过渡金属离子如 Cr^{3+} 、镧系金属离子如 Nd^{3+} 、锕系金属离子如 U^{3+} 等,它们具有较宽的有效吸收光谱带,荧光效率高,荧光寿命长,荧光谱线窄,易产生受激发射。固体激光器的特点是输出功率大、体积小、坚固和使用方便。在流式细胞仪中常用的固体激光器有掺钕钇铝石榴石(发射波长为 532 nm 或 355 nm),其他常用的固体激光器激发波长有 405 nm、488 nm、785 nm 等。

液体激光器是采用有机染料溶液或含有稀土金属离子的无机化合物溶液为工作物质,所以液体激光器按工作物质可分为两类:一类为有机化合物液体(染料),另一类为无机化合物液体。其中染料激光器是液体激光器的典型代表。常用的有机染料有咕吨类染料、香豆素类染料、噁嗪类染料、吡咯甲川类染料等。染料激光器多采用光泵激励,光泵源是脉冲放电灯或者其他激光器发出的一定波长的激光辐射。液体激光器的波长覆盖范围为紫外到红外波段(321~1168 nm),其最大特点是输出波长可以在一定范围内连续变换。通过倍频技术还可以将波长范围扩展至真空紫外波段。染料激光器的特点是结构简单、价格低廉,但染料溶液的稳定性比较差,是这类器件的不足。液体激光器主要应用于科学研究、医学等领域,如激光光谱、光化学、同位素分离、光生物学等方面。

气体激光器的工作物质主要以气体状态进行发射。有的工作物质在通常条件下是液体或固体状态,如水、汞等非金属粒子或铜、镉等金属离子结构的粒子,经过加热其可变为蒸气,利用这类蒸气作为工作物质的激光器也统归气体激光器之中。气体激光器大多应用电激励发光,即用直流、交流及高频电源对气体进行放电。两端放电管的电压增压时,可加速在工作物质中运动的、带有一定能量的电子与粒子气体的原子或分子间的碰撞,使其自身的能量转移给对方,从而使原子或分子被激发到某一高能级上而形成粒子数反转产生激光。根据气体中产生受激发射作用的工作粒子性质的不同,气体激光器可进一步分为原子气体激光器、离子气体激光器、分子气体激光器、准分子气体激光器等。在原子气体激光器中,产生激光作用的是没有电离的气体原子,所采用的气体主要是惰性气体如氦、氖、氩、氪、氙等,有时也可采用某些金属原子如铜、锌、镉、铯等的蒸气或其他元素原子气体等。原子气体激光器的典型代表是氦氖激光器,其激发波长为 633 nm 或 544 nm。

在分子气体激光器中,产生激光作用的是没有电离的气体分子,如 CO_2 和 N_2 。离子气体激光器是利用电离化的气体离子产生激光作用,主要有惰性气体离子和金属蒸气离子,如氩离子激光器(激发波长 488 nm 或 515 nm)、氦离子激光器(激发波长 647 nm)及氦镉离子激光器(激发波长 325 nm 或 354 nm)等。在流式细胞仪中常用的有氩离子激光器、氦氖激光器。氦氖激光器除了具有一般的气体激光器所具有的方向性好、单色性好、相干性强等优点外,还具有结构简单、寿命长、价廉、频率稳定等特点,在精确激光测量、医疗卫生方面有广泛的用途。

半导体激光器以半导体材料作为工作物质,常见的半导体激光器有砷化钾激光器等。激励方式主要有三种,即电注入式、光泵式和高能电子束激励式,绝大多数采用电注入式,又称激光二极管。半导体激光器具有体积小、寿命长、转换效率高、功耗低、易于维护等特点,目前已开发出并应用于流式细胞仪的半导体激光器的波长主要有 375 nm、405 nm、430 nm、635 nm、670 nm、780 nm 等。

没有哪种激发光源适用于所有的场合,关键要根据应用范围所需的激发波长和功率来进行选择。一般而言,488 nm 是最重要、应用范围最广的激发波长,它可同时激发四种或四种以上的荧光染料,且散射光大多采用这一波长进行检测。紫外光在某些领域具有不可取代的作用。对于科学研究而言,其核心是如何获得新的细胞信息以及各种细胞信息之间的相关关系,这就意味着需要更多、更自由的染料选择用于研究细胞各种各样的组成及其变化。能提供两种以上激发波长的流式细胞仪越来越普遍,部分高端的流式细胞仪内置四个或以上光源位置,可以安装各种激光器以适应不同的应用需求,如 BD 公司的 BD FACSVerser、FACSCanto II, Beckman Coulter 公司的 Gallios 等。

对于双光源或多光源系统,有的产品采用在不同的时间和空间对细胞标记荧光染料进行激发,再通过鞘液恒定系统及电子线路延迟时间处理。这种方法对延迟时间的校正的要求比较高,容易造成两次或多次检测的信号不是来自同一个细胞,另外因细胞从第一个激发点到第二个激发点之间有一段时间延迟,仪器在等待检测前一个细胞的第二个激发信号之前无法对下一个细胞的第一个激发信号进行处理,因此降低了数据处理速率。采用共线性重叠的方式可将双光源的发射光聚焦在同一点上,避免了时间延迟的推算,同时确保了荧光信号来自同一个细胞,但是收集到的荧光信号间会相互干扰,需要调节荧光补偿。目前较佳的激发方式为空间立体式激发,也就是不同激光器在一个平面圆盘,所产生的激光光束在圆心交汇,而液流正好垂直经过该圆心检测点,实现空间立体式激发。这种激发方式既保证时间上同时激发,又不会出现不同荧光信号之间的相互干扰重叠,如 BD 公司的 BD FACSCalibur、FACSCanto II、LSRFortessa、FACSAria 等。

流式细胞仪的常见激光器及其应用如下。

(1) 488 nm 激光器:最常用的激发波长,应用范围最广,是流式细胞仪最常用的激光器之一。可激发的荧光染料包括 FITC、PE、PerCP、Alexa Fluor[®] 488、GFP 等。

(2) 633/635/640 nm 激光器:流式细胞仪最常用的激光器之一。可激发的荧光染料包括 APC、Alexa Fluor[®] 647、BD APC-H7、APC-Cy7 等。

(3) 561 nm 激光器:可激发的荧光染料包括 PE、PE-Texas Red[®]、PE-Cy5、PE-Cy7、RFP、mCherry 等。利用 561 nm 激光器激发 PE 可大大减小 PE 和 FITC 的光谱重叠,极大地提高检测灵敏度和分辨率,从而发现一些以前不能被发现的低表达的细胞群体和特殊表面标志物;同时,561 nm 激光器可以鉴定 RFP 转染效果以及分选转染的细胞。