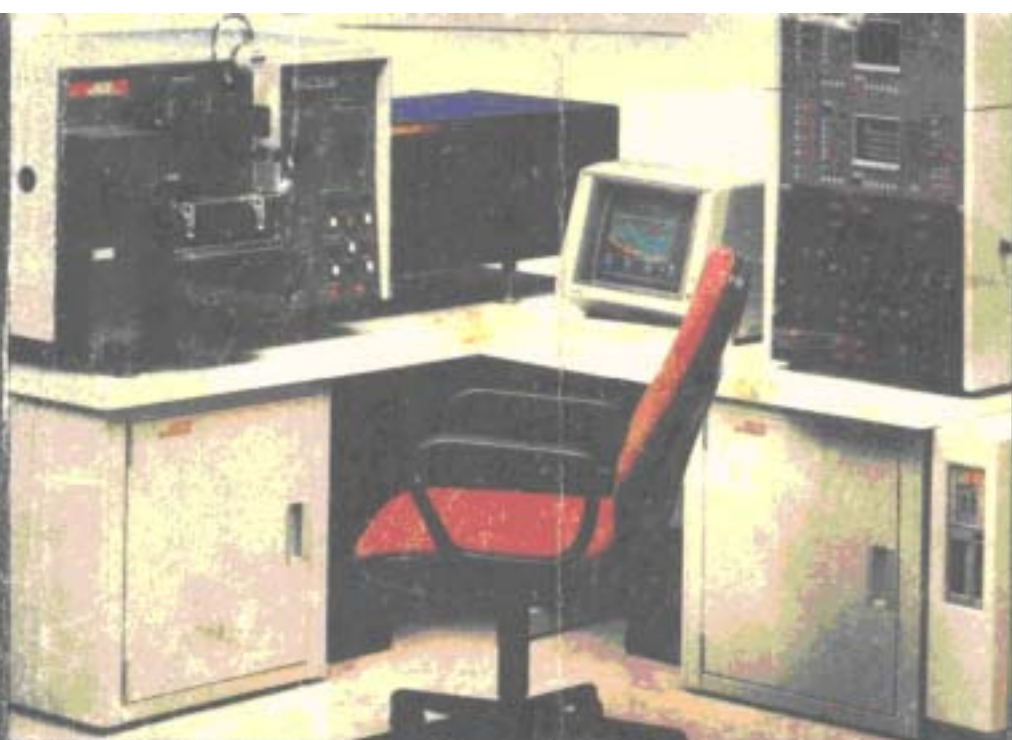




宋平根 李素文 主编

流式细胞术 的原理和应用

Q2-33
SP4

北京师范大学出版社

122257

本书作者

(按各章顺序排列)

宋平根	北京师范大学
李素文	北京师范大学
刘洪祥	卫生部工业卫生实验所
高凤鸣	卫生部工业卫生实验所
薛绍白	北京师范大学
刘成贵	解放军总医院基础所
左连富	河北省肿瘤研究所
陈珊珊	北京医科大学人民医院

序

流式细胞术是本世纪70年代发展起来的一种对细胞的物理或化学性质,如小大、内部结构、DNA、RNA、蛋白质、抗原等进行快速测量并可分类收集的高技术,它综合了激光技术、计算机技术、半导体技术、流体力学、细胞化学等各门学科。其特点是:快速,最高每秒可测数万个细胞,并在短时间内得到大量数据,统计学意义明显;能进行多参数相关测量,以获得参数间大量的相关信息;能依据测量的信息,对细胞群体的各种亚群进行分类收集,即分选,如对人类不同染色体的分选,做成每条染色体的DNA文库,为人类染色体基因组的研究提供重要条件。

在80年代中后期,流式细胞术由基础转到临床应用。对肿瘤DNA倍性的测定可用于肿瘤的诊断、治疗和预后上。此外,还用到了血液病的分型和肿瘤的抗药性研究等方面。在单克隆技术与流式细胞术相结合后,建立了检测抗原相关表达的新技术,也已应用到临床中。80年代末,更在植物杂种育种、家畜的X、Y精子分选以实现性别控制等方面得到了发展。总之,这是一项颇有生命力的新技术,是还在不断发展的新技术。

我国在70年代末,上海第二医学院、北京师范大学等单位已开展了这方面的工作,1981年国内引进了第一台商品仪器,到现在,10年间已发展到70多台,中国大陆和中国台湾

大约各占一半。应用领域也从细胞生物学基础研究扩大到肿瘤学、血液学、免疫学、药理学、临床检验等各方面，学术活动和国际交流也日益频繁。但是，国内尚无一本全面介绍流式细胞术的书籍，因此，我们在多次讲授流式细胞术的教学基础上，早在1986年已开始编写此书。但因种种原因，时至今日，在北京师范大学出版社的大力支持下，此书才得以出版。

本书的目的是向读者较全面地介绍流式细胞术的仪器原理、测量方法、样品制备、数据分析以及主要的应用领域。参与编写者都是国内有关专家，都有使用这项技术的经验，因而能兼顾到理论与实践并重的原则。本书在注重基础性的同时，还注意到内容的新颖，如对植物育种、胞内钙离子测量等新技术也做了介绍，文献则一直引到1990年，以供读者进一步深入了解时查阅。相信本书对推进我国发展、推广流式细胞术可起到促进作用。

本书的第一、二、五章由宋平根编写，第三、四章由李素文编写，第六章内容涉及面较广，由宋平根、刘洪祥、高凤鸣、薛绍白共同编写，第七章由左连富、刘洪祥编写，第八章由刘成贵编写，第九章由陈珊珊编写。

对认真协助审阅本书有关章节的中国中医研究院基础所医学工程室庞大本主任和池旭生副研究员致以谢意。

鉴于流式细胞术是一门较新的技术，涉及面很广，本书很可能存在这样或那样的问题，希望读者能提出批评、建议，俾便今后有机会时能加以修改。

薛绍白 宋平根

1991年4月于北京师范大学生物系

目 录

第 1 章 流式细胞术的发展简史.....	1
第 2 章 仪器原理.....	7
2.1. 概述.....	7
2.2. 流式细胞计的工作原理.....	8
2.3. 散射光的测量.....	10
2.3.1. 前向角散射.....	11
2.3.2. 侧向散射.....	13
2.4 荧光测量.....	16
2.4.1. 光源.....	17
2.4.2. 滤片.....	19
2.4.3. 检测器——光电倍增管和硅光电二极管.....	20
2.4.4. 光谱重叠的校正.....	23
2.4.5. 自发荧光.....	23
2.4.6. 荧光的线性测量和对数测量.....	24
2.4.7. 细胞群体的 DNA 直方图和变异系数.....	25
2.5. 液流系统.....	29
2.5.1 稳流和雷诺数.....	30
2.5.2. 喷嘴.....	31
2.5.3. 流动室.....	33
2.5.4. Coulter 效应.....	35
2.6 细胞分选器.....	36
2.6.1. 小水滴的形成.....	36
2.6.2. 水滴的充电与偏转.....	38

2.6.3. 决定逻辑.....	39
2.7. 缝扫描.....	39
2.8. 流式细胞计的技术指标.....	41
2.9. 标准样品.....	44
2.9.1. 标准样品的性质.....	46
2.9.2. 非生物学标准样品荧光微球.....	46
2.9.3. 生物学标准样品.....	47
第3章 细胞的参量和荧光探针.....	52
3.1. DNA、RNA 含量.....	52
3.1.1 PI 和 EB.....	54
3.1.2. MI 和 CA ₁ 和 Olivomycin.....	56
3.1.3. HO33342、HO33258 和 DAPI.....	56
3.1.4. 7-AAD.....	58
3.1.5. AO 和 PY.....	58
3.2. DNA 碱基组成.....	61
3.3. 染色质结构.....	62
3.4. 总蛋白含量.....	63
3.5. 抗体和其他分子的共价标记.....	64
3.6. 细胞的活性.....	69
3.7. DNA 合成.....	70
3.8. 细胞膜电位.....	70
3.9. 细胞内 pH.....	75
3.10. 细胞内的钙.....	78
3.11. 细胞膜的流动性或微粘度.....	84
3.12. 流式细胞术荧光探针的发展前景.....	85
第4章 流式细胞术的样品制备.....	88
4.1. 单层培养细胞分散为单个细胞.....	88
4.2. 实体组织分散为单个细胞.....	89

4.2.1. 实体组织分散为单个细胞的原 则	89
4.2.2. 实体组织分散为单个细胞的方法	91
4.2.3. 实体组织分散为单个细胞的实例	95
4.3. 流式细胞术进行 DNA 分析时样品的长期保存方法.....	97
4.4. 实体瘤细胞脱核制备	98
4.4.1. 一步快速核分离和染色程序	98
4.4.2. 多步核分离和染色程序	100
4.5. 石蜡包埋组织的流式细胞样品制备	102
4.5.1. 石蜡包埋组织的流式细胞样品制备	103
4.5.2. 从石蜡包埋组织分离细胞核的另一个方法	103
4.5.3. 石蜡包埋组织脱核的参考标准——切片厚度和荧光染色	104
4.5.4. 对石蜡包埋组织脱核的分析	105
4.6. 染色体悬浮液的制备	105
第 5 章 数据的获取与分析.....	108
5.1. 数据的显示	109
5.1.1. 单参数直方图	109
5.1.2. 二维点图	110
5.1.3. 二维等高图	111
5.1.4. 假三维图	112
5.1.5. 多维数据的显示	113
5.2. 数据分析	115
5.2.1. 非参数分析.....	115
5.2.2. DNA 直方图的比较分析.....	116
5.3. DNA直方图的定量分析	118
5.3.1. 矩形作图法	119
5.3.2. 峰反射作图法	120
5.3.3. 作图法的误差	121

5.4. DNA 直方图的参数分析.....	123
5.4.1. 二阶多项式拟合法	124
5.4.2. 多正态拟合法	127
5.4.3 DNA 直方图参数拟合分析的误差.....	129
5.5. 细胞周期各时相的时间	130
5.6. 双参数图分析	131
5.7. 多参数数据分析	133
第 6 章 流式细胞术在细胞生物学中的应用.....	140
6.1. 细胞群体的各周期时相百分比	140
6.2. DNA 合成速率.....	142
6.3. 细胞周期参数的测定	145
6.4. 用溴脱氧脲嘧啶核苷单克隆抗体研究细胞周期	147
6.5. 用多参数流式细胞术研究细胞周期	151
6.5.1. 多参数流式细胞术	151
6.5.2. DNA 含量及细胞大小	152
6.5.3. DNA 含量和 RNA 含量双参数相关测量.....	154
6.5.4. 由双参数图分析细胞周期各亚时相	156
6.6. 药物对细胞周期的影响	159
6.7. 流式细胞核型分析	162
6.8. 在分子遗传学领域中的应用	165
6.9. 精子和雄性生殖细胞的研究	166
6.9.1. DNA 含量的高分辨率测量及分选.....	167
6.9.2. 用于精细胞的研究	168
6.10. 在微生物学中的应用	171
6.10.1. 仪器、方法与技术关键	171
6.10.2. 细菌的细胞周期	173
6.10.3. 病毒与细胞的相互作用	174
6.11. 测量细胞突变作用	175

6.11.1.	对致突作用的测定	175
6.11.2.	对体外细胞突变的测定	175
6.11.3.	基因扩增	176
6.11.4.	致丝裂性的测定	176
6.11.5.	次黄嘌呤鸟嘌呤核糖基转移酶 (HGPRT)	176
6.11.6.	血色蛋白变异株	177
6.11.7.	血型蛋白 A 变异株	177
6.12.	流式细胞术在植物细胞中的应用	177
6.13.	细胞内游离钙的流式测定	185
第 7 章	流式细胞术在免疫学中的应用	187
7.1.	流式细胞术应用于免疫研究中的技术问题	187
7.1.1.	流式细胞术在免疫研究中的多功能特点	187
7.1.2.	荧光滤片	189
7.1.3.	免疫技术用荧光染料	190
7.1.4.	阳性细胞群体标准及荧光强度的判定	193
7.1.5.	免疫荧光标本的制备	195
7.1.6.	免疫荧光标本的特殊处理技术	196
7.1.7.	设备消毒	199
7.2.	流式细胞术在免疫生物学和免疫技术研究上的应用	199
7.2.1.	细胞表面标记及抗原决定簇性质的研究	199
7.2.2.	细胞抗原表达的研究	201
7.2.3.	免疫和肿瘤细胞测定及分选中的应用	203
7.2.4.	克隆细胞及杂交瘤的选择和鉴定	204
7.3.	FCM 在免疫功能测定中的应用	205
7.3.1.	细胞介导细胞毒试验	205
7.3.2.	吞噬功能实验	206
7.3.3.	循环免疫复合物的测定	207
7.3.4.	其他免疫指标的检查	207

第 8 章 流式细胞术在肿瘤学中的应用.....	210
8.1. 实体肿瘤组织单细胞悬液样品制备方法	210
8.1.1. 酶学方法	210
8.1.2. 化学方法	212
8.1.3. 机械性方法	213
8.2. 实体肿瘤组织单细胞核(裸核)悬液样品的制备	214
8.3. 石蜡包埋肿瘤组织单细胞样品制备	215
8.3.1. 石蜡包埋组织单细胞分散的方法和步骤	216
8.3.2. 石蜡包埋组织单细胞样品制备方法存在的问题	218
8.4. 流式细胞术在肿瘤学中的应用	220
8.4.1. 流式细胞术在检测癌前病变和协助 肿瘤早期诊断中的应用	220
8.4.2. 流式细胞术在肿瘤细胞学诊断中的应用	223
8.4.3. 流式肿瘤 DNA 异倍体	225
8.4.4. 流式 DNA 异倍体对交界性肿瘤诊断的意义	226
8.4.5. 流式 DNA 倍体分析在恶性肿瘤预后估价中的 作用	226
8.4.6. 流式细胞术评价肿瘤化疗疗效的作用	228
第 9 章 流式细胞术在血液学中的应用.....	232
9.1. DNA 倍体分析.....	232
9.2. 细胞增殖周期分析	234
9.2.1. 细胞周期分析的方法	234
9.2.2. 细胞周期分析的意义	235
9.3. 血细胞免疫学研究	239
9.3.1. 正常血细胞分化成熟的研究	240
9.3.2. 在急性白血病免疫分型中的应用	246
9.4. 残存白血病的研究	248
9.5. 血小板病的研究	251

9.6. FCM 在分子生物学研究中的应用	252
9.7. 几种染色方法	254
9.7.1. 蛋白质-DNA 染色法	254
9.7.2. 吖啶橙 (AO) 染色法	255
9.7.3. 免疫抗体标记与 DNA 双染色法	255
9.7.4. DNA 与 ras 基因蛋白检测法	255
9.7.5. PCNA与 DNA 双染色法	256

第1章 流式细胞术的发展简史

流式细胞术(Flow Cytometry, 简称 FCM) 是对细胞或细胞器快速测量的高技术。依赖测量的参数, 还可以用物理的方法将一个群体中的亚群分选出来, 这就是流式细胞分选术。上述的“流式”, 指的是在测量过程中细胞是流动的, 不是静止的, 这是与在此以前对细胞测量技术的最大差异之处。流式细胞术目前在国外的一些有关实验室、医院已发展成常规技术, 在我国, 经过十年的推广也逐渐普及。经过数十年的努力, 流式细胞术从一个只能计数, 稍后可测粒子大小的仪器, 发展到今天可快速定量测定同一个细胞的多种化学的和物理的特性, 这中间凝集着许多人的心血, 既有成功, 也有失败。

第一个报道自动计数细胞的是 Moldavan(1934年), 他描述了一个装置: 悬浮的血红细胞或是用中性红染色的酵母, 在显微镜的载物台上从一个毛细玻璃管中流过, 每个通过的细胞可被一个光电装置纪录下来。他注意到了一系列技术上的细节。但此后一直没有进一步的报道。现在, 人们都把这个实验看成是有关流式细胞术的第一个尝试。1941 年, Kiehlund 申请了一个专利, 大体上与 Moldavan 差不多, 没有什么更新的内容。

通过这些实验, 人们发现, 在流式细胞计细胞要流过的狭窄管道中存在的最大问题是大细胞或细胞团阻塞通道, 为解决这个困难, 人们不禁想起 1883 年 Reynolds 用来研究管子

中层流时使用的鞘液原理。Gucker 等人在 1947 年就是用这个原理和光电技术结合起来对气溶胶中的粒子进行计数。随后, Grosland-Taylor 利用同一原理在 1953 年设计了一个流动室,用光学方法来计数血细胞。他让悬浮的细胞慢慢地注入快速流动的液柱中,这个液柱外面被层流鞘液包围着,粒子在轴心流动。这样做有两个好处:一是消除了大颗粒阻塞现象;二是它可精确控制粒子进入液柱的位置,使之在轴心上,这样就建立了流体动力聚焦的原理。今天,几乎所有流式细胞术的液流原理都采用了上述技术。

1949 年, Wallance Coulter 申请了一个名叫“流动的悬浮粒子计数方法”的专利,在专利的方法中,他使粒子通过一个小孔。只要粒子与悬浮的介质间在电导率上有差异,小孔中粒子的存在与否即能引起可检测出的电特性变化,此现象通常这被称为 Coulter 效应,他在此基础上生产了 Coulter 计数器(1956 年)。此后,还有一些人发展了各种粒子测量设备,但原理上都差不多。其中 Parker 和 Horst 在 1953 年申请的专利“同时计数红、白血细胞的方法”,是用稀释的血细胞悬浮在等渗液中,白细胞染成蓝色,红细胞仍为红色,细胞通过一根导管再被一束光照射,透射光被分成红、蓝两个成分并分别送到光电池上,这样就可纪录通过的细胞是吸收了蓝光还是红光。于是,不但纪录了通过的细胞数目,还识别了通过的细胞是白细胞还是红细胞,这已经有点今日流式细胞术的意思了。此后,直到 60 年代中期,流式细胞术始终无多大进展。

1965 年, Kamentsky 提出两个新概念:一是用分光光度学定量测量细胞组分;另一个是细胞的不同组分可以被同

时多参数测量,用以给细胞分类。最初曾用核酸的紫外吸收和可见光散射两个参数同时测量未染色的细胞,测量的速度大约是每秒测 500 个细胞。他同时也是第一个用二维直方图显示并分析多参数流式细胞术的人。他也是第一个用计算机接口到仪器上,纪录并分析多参数数据的人。他的这个装置随后改装成商品仪器,商品名为 Ortho Cytograph 和 Cytofluorograph。

1968 年,Dittrich 和 Göhde 在英国申请了一个专利,名称是“在分散体系中自动测量和计数粒子的装置”。他们在测量粒子的荧光或磷光时,让粒子平行于透镜光轴的方向运动,并通过大数值孔径物镜的焦面,粒子通过焦面后再用一个冲洗液使之偏转。该装置使用了 Köhler 照明,因而在粒子运动的出口处可得到均匀的照明,这就免去了聚焦的问题。这样一个设备可以用 Köhler 照明进行荧光的激发,也可以收集发射的荧光,光源使用氙灯或高压汞灯。采用大的数值孔径透镜保证了激发光和收集发射光都有大的立体角,而较大的立体角又可在测量非对称细胞时细胞不同的取向不致使信号发生变化。Göhde 以很小的变异系数测量了细胞群体的 DNA。按上述原理制成的商品名称为 Phywe Impulscytophotometer 简称 ICP,随后生产的 ICP22,直到今天还有人仍在使用。

在 1967 年, Van Dilla 和 Los Alamos 小组率先发展了一种液流束、照明光轴,检测系统光轴三者互相垂直的流式细胞计。这种不依赖显微镜的设备采用了由 Crosland-Taylor 设计的层流流动室并使用氩离子激光器为照明光源。这种垂直相交的系统以后更进一步发展,除了可测荧光外还可测量

散射光,后来还把 Coulter 计数器也安装进去。他们第一个用荧光 Feulgen 反应对细胞 DNA 染色,展示了 DNA 倍性和荧光间的线性关系,他们的 DNA 直方图第一个清楚地显示出细胞周期的 G_1 时相、S 时相, G_2 和 M 时相。他们第一个用同步培养的细胞论述了定量细胞动力学,而 Göhde 和 Dittrich 则是第一个用流式细胞术测量 DNA 以确定细胞周期变化来研究药物影响细胞周期动力学的人。

至于流式细胞分选术,则首先是由 Fulwyler 在 1965 提出的,其改进型是在 1969 年。他使用了 Sweet 在 1965 年使用的一个静电墨水喷射液滴偏转技术。这个技术原来装在 Coulter 计数器上可使细胞按体积大小分类。与此同时,也是在 1965 年, Kamensky 独立地申请了一个专利,这是一个在液流中经过光度学或电学测量后分选细胞的方法。在此方法中利用了气体动力学、水力学和静电学的技术。后来 Friedman 曾设计过一个用液流开关分选的装置,但较少使用,直到今天分选用的大部分仍然是电子学的方法,如 Becton Dickinson 公司的各种可供使用的 FACS 仪器仍然在应用液滴偏转的原理。

60 年代和 70 年代,还有一些人在流式细胞术上做了不少的改进,有代表性的是 Ehrlich 和 Wheelless。他们用飞点扫描技术或缝扫描技术得到了细胞形态学方面低分辨率的信息,从而改变了流式细胞术范畴的仪器都是零分辨率仪器的传统观点。

经过上述一系列研究者的努力,到 80 年代,世界上流式细胞计的生产厂家已基本形成格局,在美国,以 Becton-Dickinson 公司和 Coulter 公司两家为代表,各生产了一系列流式

细胞计, B-D 公司生产的流式细胞计都冠以 FACS, 其原文是 Fluorescence Activated Cell Sorter, 即荧光激活细胞分选器, 现在具有代表的型号是 FACScan 和 FACStar plus。Coulter 公司生产的流式细胞计以 Profile 和 EPICS 750 为代表, 最新产品还有 EPICS Elite, 但国内尚未见到。以上产品的光源都是氩离子激光器。欧洲的产品可以瑞士的 Partec 公司为代表, 型号为 CAII 和 PASII, 其产品都是在前述 ICP 基础上发展的, 故光源都使用了高压汞灯, 但最新推出的 PASIII 亦可安装激光光源。国外除上述三家外, 西德、挪威, 法国、日本等国亦有产品; 我国上海第二医学院和中国科学院生物物理研究所也先后研制成功, 为国内填补了一项空白。

进入 80 年代以来, 流式细胞术在仪器本身方面似乎除了完善 70 年代提出的多光束、多站技术外进展不大。当然, 随着计算机功能的提高, 在数据存贮、显示、分析方面日臻完善, 人们的注意力逐渐集中到样品制备方法, 研制新的荧光染料, 发展新的细胞特征标记物等方面, 这样就开拓了一系列新的应用。同时, 仪器本身也就容易为一般研究者所掌握, 也就更易普及。

参 考 文 献

1. 薛绍白 流式细胞光度术——一种快速单细胞定量分析和分类的新技术 细胞生物学杂志 1979, 1:39
2. 野村和弘 高本 滋 フローサイトメトリー手技と实际 修订第二版 蟹书房 1988 p. 5--9
3. M.R. Melamed, T. Lindmo and M.L. Mendelsohn (eds.): Flow Cytometry and Sorting. second edition, John Wiley and

- Sons, New York. 1990. p. 1—5
4. M. R. Melamed, P. F. Mullaney and M. L. Mendelsohn (eds.): Flow Cytometry and Sorting. first edition, John Wiley and Sons, New York. 1979. p. 3—7
 5. M. A. Van Dilla, P. N. Dean, O. D. Laerum and M. R. Melamed (eds.): Flow Cytometry: Instrument and Data Analysis. Academic Press London. 1985, P. 1—19
 6. H.M. Shapiro: Practical Flow Cytometry. Alan R. Liss Inc. New York. 1985. p. 9—21
- • •
-

第2章 仪器原理

2.1. 概 述

流式细胞术 (FCM) 是一种自动分析细胞的高技术, 其原理是悬浮在液体中的分散细胞一个个地依次通过测量区, 当每个细胞通过测量区时产生电信号, 这些信号可以代表荧光、光散射、光吸收或细胞的阻抗等。这些信号可以被测量、存贮、显示, 于是细胞的一系列重要的物理特性和生化特征就被快速地、大量地测定。上述特性可以是细胞的大小、活性, 核酸的数量、酶、抗原等等。仪器还可以根据所规定的参量把指定的细胞亚群从整个群体中分选出来。流式细胞术在当前的细胞生物学、免疫学、肿瘤学、血液学、遗传学、病理学、临床检验学等各领域有着十分广泛的用途。

流式细胞术是对悬液中的细胞或细胞器进行快速测量, 测量速度可达每秒钟数千个乃至上万个细胞。这样, 它就可与显微镜相互补充。显微镜术可以研究组织的结构、细胞定位和荧光在细胞中的分布; 而多数流式细胞术是一种零分辨率的仪器, 它只能测量一个细胞的总核酸, 总蛋白等而不能测量细胞中某一特定部位的核酸或蛋白, 这是它的不足之处。但由于现代荧光技术和多参数相关测量技术的发展, 流式细胞术在对细胞群体或组成群体的亚群进行定量分析时, 又具有其他手段无法比拟的优越性。

定量测量在细胞生物学及其他有关学科中之所以重要，是因为要想识别出一个细胞群体，主要是依据细胞特殊标记物的数量而不仅是依据这种特殊标记物的存在与否。多参数相关分析可以对细胞固有的性质，例如光散射的测量与定量测定细胞的特征如 DNA 同时进行。当然，必要时还可同时再测定 RNA 等等。这样，就有可能从一个复杂的细胞混合群体中评价其中的某个细胞群体(亚群)。由于只有对大量的细胞进行测量才能发现稀有的亚群并把它分选出来，所以快速测量是必需的。这里所谓分选即流式细胞分选术(FCS)。它是根据所测定的各种细胞性质的不同组合，从细胞群体中把某个亚群分选出来，以对它进行功能研究、形态学研究、进一步培养或做其他的分析。

2.2. 流式细胞计的工作原理

图 2.1 是原理图，待测细胞被制备成单个细胞的悬液，经特异性荧光染料染色后放入样品管中，在气体的压力下进入流动室。流动室内充满鞘液，在鞘液的约束下，细胞排成单列由流动室的喷嘴喷出，成为细胞液柱。液柱与人射的激光束垂直相交，相交点称为测量区。通过测量区的细胞被激发产生荧光。在与入射光束和液柱垂直的方向放置光学系统（透镜、光阑、滤片和检测器等）用以收集荧光信号。图中的阻断滤片用于阻挡激发光，二色性反射镜用于选择被测荧光波长，荧光检测器是光电倍增管(PMT)，散射光检测器是光电二极管，用来收集前向角散射光(FSC)。

细胞分选(cell sorting)的工作原理如下：液滴形成信

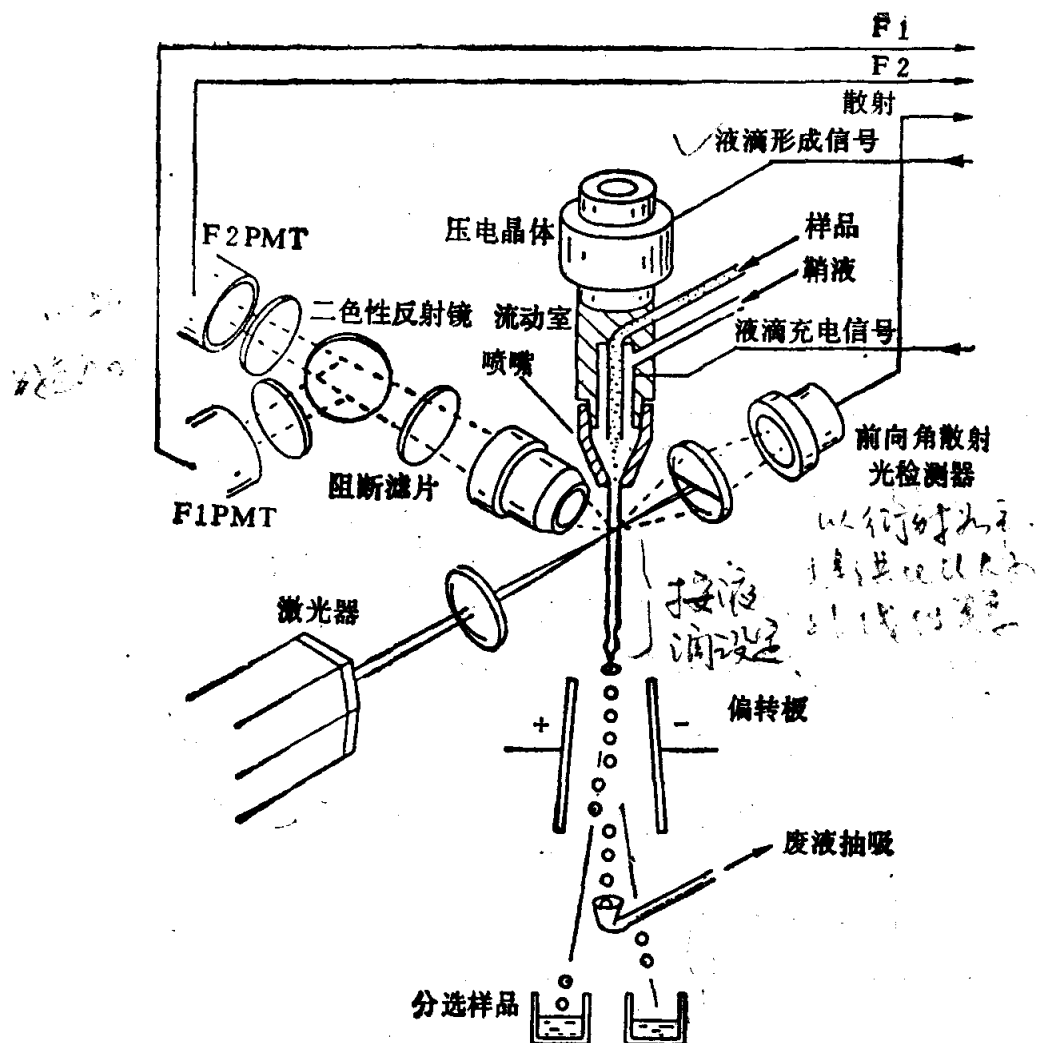


图 2.1 流式细胞计工作原理

号的频率约 30KHz，此信号加在压电晶体上使之产生同频的机械振动，流动室也就随之振动。于是液柱断裂成一连串均匀的液滴，其形成的速度为每秒 3 万个。细胞通过喷嘴的

速度大约每秒 2000 个以下,如以 2000 个计算则平均每 15 个液滴中有一个液滴包有细胞,而其他液滴无细胞。从图上可以看出细胞的性质是在进入液滴以前已经被测定了的。如果其特性与被选定要进行分选的细胞特性相符,则仪器在这个被选定的细胞刚形成液滴时给整个液柱充以指定的电荷。这样,当被选定的细胞形成液滴时就带有特定的电荷,未被选定的细胞形成的细胞液滴及不包含细胞的空白液滴不被充电,也不带电荷。带有电荷的液滴向下落入偏转板的高压静电场时,依所带电荷符号向左偏转或向右偏转,落入指定的收集器内,从而完成了细胞分类收集的目的。

以上整个仪器系统由电子电路和计算机控制,用以收集、显示、分析、贮存被测定的各种信号及控制细胞的分选收集。下面依次介绍仪器各部分的原理。但限于本书篇幅,对过于专门的问题不拟做详细的介绍,有兴趣的读者可参看有关参考文献。

2.3. 散射光的测量

在流式细胞术中,从光的散射信号可以得到非常有价值的信息。因为细胞对光的散射是细胞在未遭受任何破坏情况下固有的特性,所以可以用散射光的信号对未染色的活细胞进行分析和分选。

细胞在液流中通过测量区时,经激光照射,细胞向空间 360° 立体角的所有方向散射光线,散射的信号与细胞的大小,形状,质膜和细胞内部的折射率有关。经过固定和染色的细胞,因折射率有了变化,故其散射状况与未固定或未染色的不

同。散射光与细胞参量间的关系与散射角、照明光束的形状、收集散射光立体角的大小等都有关系。在流式细胞术中常被利用的有前向角散射 (FSC) 和侧向散射 (SSC), 前者亦称 0° 散射, 后者亦称 90° 散射。

2.3.1. 前向角散射

前向角散射亦称小角散射或 0° 散射, 图 2.2 表示各部分间的关系。X 轴是液流方向, Z 轴表明入射的激光束方向, 入射光与液柱在 O 点相交, O 点是测量区。

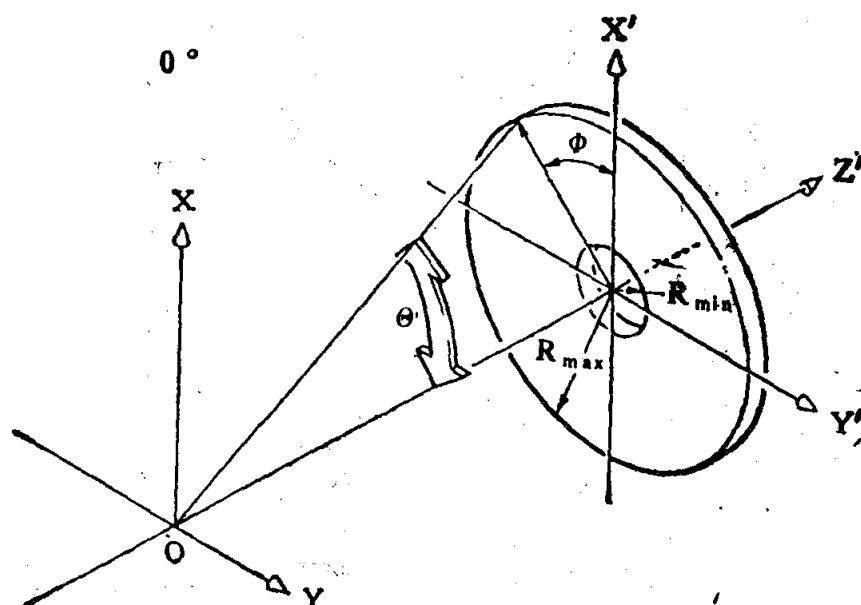


图 2.2 前向角散射原理图

如果在与 XY 面平行的 X'Y' 面上放一个半径为 R_{max} 的透镜, 透镜中心部分半径为 R_{min} 的圆是不透光的, 则只有立体角 θ 范围内的散射光减去落到 R_{min} 圆面积上的散射光

才被透镜收集、检测。 $R_{\min}$ 圆内的散射光是被阻挡的部分，以防止入射光直接进入从而掩盖了散射光。在实际仪器中，这部分所占立体角大约在 2° 上下。

图 2.3 是用核质比为 0.72，球形活细胞所测得的前向角散射光与细胞外径平方的关系曲线，实线对应收集散射光的立体角是 $1.7^\circ-20.3^\circ$ ；虚线对应的立体角是 $1.7^\circ-10^\circ$ 。二者差异不大，且大体上为一直线。

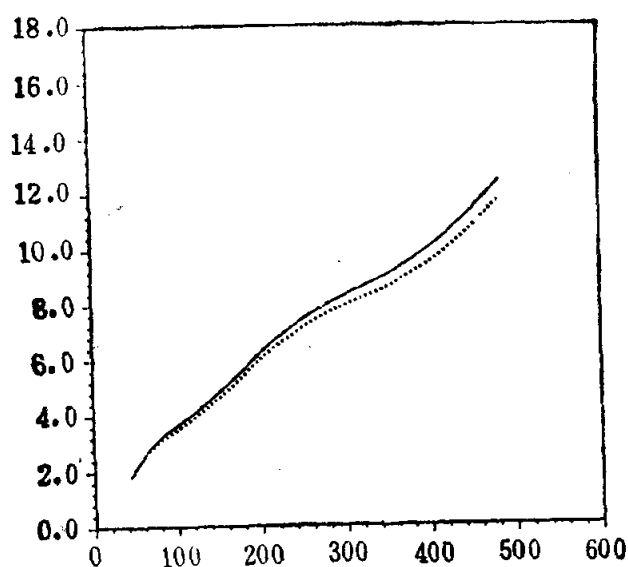


图 2.3 细胞大小与前向角散射光的关系
横轴：细胞外径平方 (μm^2)，纵轴：相对散射光强度

同样类型的细胞，如果核质比不同，其散射光强度也略有差异。图 2.4 上的三条曲线表明了这个差异，三条曲线自下而上对应的核质比依次为 0.77、0.72 和 0.67，测量立体角在 $1.7^\circ-20.3^\circ$ ，使用的是活细胞。

固定了的细胞，因其质膜被破坏的情况不一样，相应的散

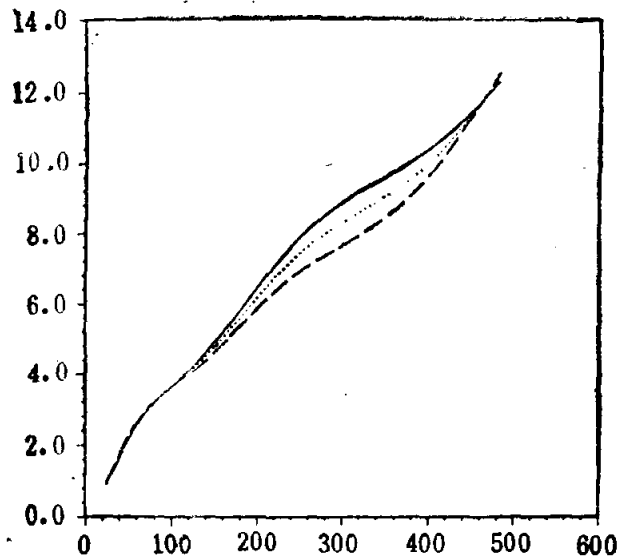


图 2.4 不同核质比的细胞大小与前向角散射光的关系

射光与直径间的关系要复杂一些，特别是与核质比的关系更为复杂。一般我们仅能说前向角散射光的强度与细胞的大小有关。对同一个细胞群体，散射光强的，其细胞大一些；而散射光弱的，其细胞小一些。究竟更准确的关系是什么，因细胞不同、处理方法不同、固定方法不同，以致我们无法讲出更精确的结论。甚至当细胞是非球形的如禽类的红细胞、扁平状的精子时，由于细胞在液流中空间取向的不同，也可导致对同种细胞测得的前向角散射光信号完全不同，这是必须注意的（见图 2.23）。

2.3.2 侧向散射

侧向散射亦称 90° 散射或大角散射，图 2.5 说明其原理。X 轴、Z 轴的含义与图 2.2 相同。会聚透镜放在与 XZ 面平行的 X'Z' 平面内，因而收集到的是细胞通过测量区时侧方向的散射光。

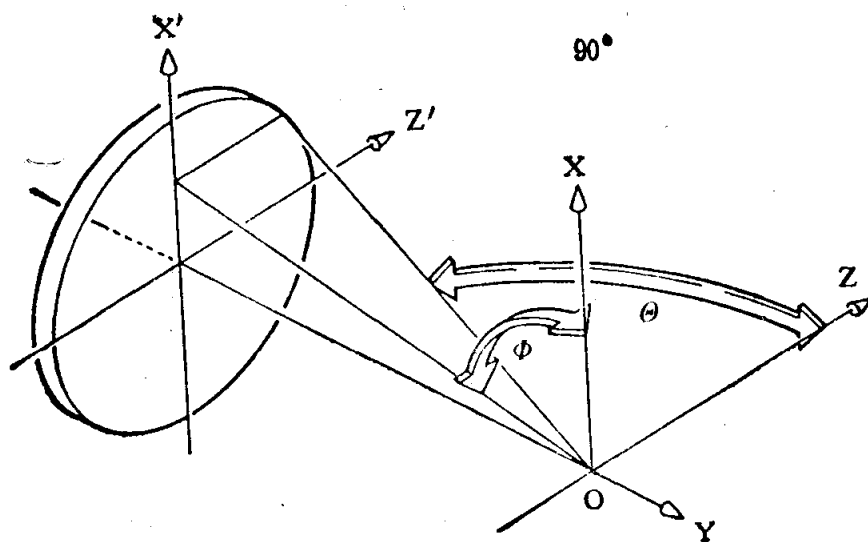


图 2.5 侧向散射原理图

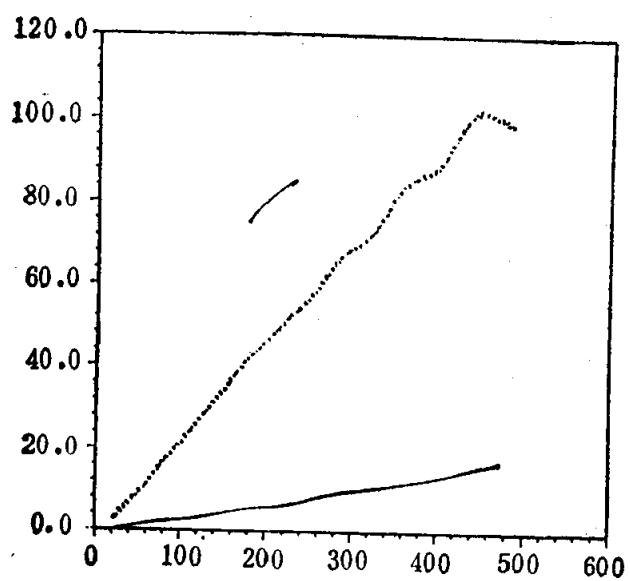


图 2.6 细胞大小与侧向散射关系
横轴: 纵轴: 同图2.3

侧向散射光对细胞膜、胞质、核膜的折射率更为敏感。图 2.6 表明前述核质比为 0.72 的球形细胞侧向散射光与细胞直径间的关系。

图中实线对应活细胞,虚线是固定了的细胞,因为这两种细胞质膜的光学特性不一样,而侧向散射光对这种质膜折射率变化较敏感,所以两条曲线差异较大。此外,侧向散射对细胞质内较大的颗粒也会有反映,所以常使用侧向散射光来获

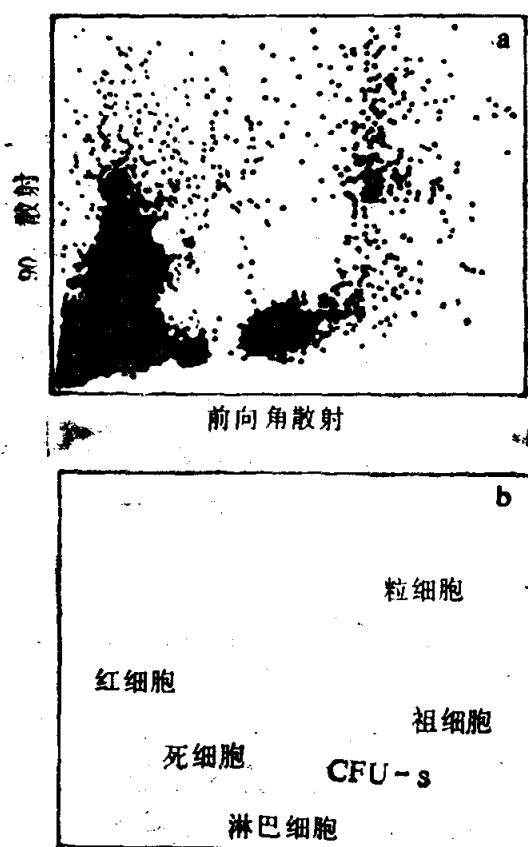


图 2.7 用散射光鉴别小鼠骨髓亚群
a. 二维点图 b. 各亚群位置

取有关细胞内部的精细结构和颗粒性质的有关信息。当然,侧向散射光也与细胞形状、大小有关,但这不属于侧向散射获取信息的主要方面。

除了侧向散射光外,还有背向散射,亦称 180° 散射,但很少使用。

△以上所有的散射光波长与入射光一致,这是散射光与荧光的最大不同点,在使用中务须牢记。散射光的探测器可以是硅光电管,也可以是光电倍增管,前者多用于探测前向角散射光,后者用于探测侧向散射光。

在实际使用中,仪器首先是对光散射信号进行测量。因为通过测量区的每个细胞不管它是否已被染色都能散射光线,所以光散射分析与荧光探针联合使用时,可鉴别出样品中被染色的细胞和未染色的细胞。光散射测量最有效的用途,是从非均一的群体中鉴别出某些亚群。用前向角散射和侧向散射双参数测定,可从不加任何染料的小鼠全骨髓中鉴别出若干个亚群。

除散射光外,流式细胞计常测量的另一个非荧光信号是Coulter 体积,其原理在后面介绍。

2.4. 荧光测量

荧光信号是由对细胞进行染色的特异性荧光染料受激后发射的。荧光波长与激发光波长不同且强度较弱,为此就要使用滤片以滤除非荧光信号并使用灵敏的探测器。下面我们将分别进行讨论。至于荧光染料和染色方法,则在下章中讲述。

2.4.1. 光源

常用的光源有弧光灯和激光。弧光灯的结构简单、价格便宜、维修容易，但在单一谱线上的功率较弱。激光单色性好、功率强大、不易散焦，但结构复杂、价格昂贵、维修困难。至于选择某种光源的某条谱线做为激发光源，主要是依据被激发的物质，例如细胞的自身荧光物质或荧光染料的激发光谱而定。光源的谱线愈接近被激发物质的激发光谱的峰值，所产生的荧光信号愈强。

1. 汞灯 弧光灯中最常用的是汞灯，汞灯中又以 100W 汞灯最常用。汞灯的发射谱线有一个微弱的背景，其谱线大部分在 300—450nm，550nm 附近也有，如图 2.8。由于在 300nm 波长的紫外范围有一系列谱线，所以要求用紫外激发的场合使用汞灯很是方便。汞灯启动容易，启动后数分钟就可以达到全功率输出，但当熄灭后须待完全冷却才可重新启动。某些较新型号的汞灯里面有第三个启动电极，可以热启动。

汞灯点火后内部压力可达 40 大气压，所以外部必须有可靠的屏蔽，未冷却下来的汞灯绝对不可拆卸，调换汞灯时要十分当心。

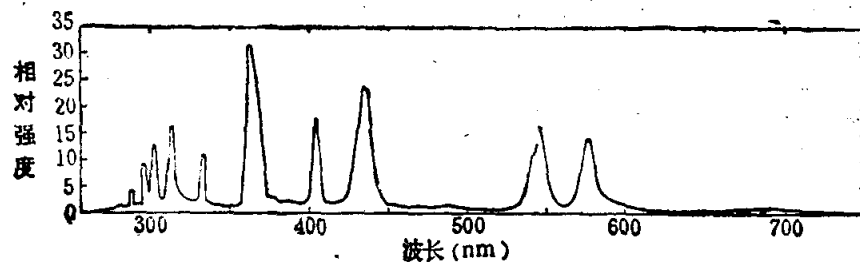


图 2.8 汞灯的谱线

汞灯的缺点之一是 440nm—540nm 间无可以利用的谱线,这妨碍了某些荧光染料的使用。

2. 激光 激光与普通光线不同;激光是受激幅射,普通光线是自发幅射。激光基本是沿着直线传播,发散角很小,通常在 10^{-6} 球面度量级的立体角内,必要时很容易聚焦到与细胞同一数量级。激光的亮度高,即在单位面积、单位立体角内输出功率特别大。激光还具有良好的单色性,这些特点都是汞灯所不具备的。

流式细胞术中使用的多为氩离子激光器,亦有用氦离子激光器或染料激光器以获得不同的谱线者。氩离子激光器是一种气体激光器,其频率稳定性高、相干性好,寿命长。它是通过气体放电使氩离子电离并激发,实现粒子数反转而产生激光,谱线有十余条,其中绿光 514nm 和蓝光 488nm 两条谱线最强,几乎占总输出功率的 80%。由于这种激光在气体放电过程中要使氩原子一次电离必须供给相当大的能量,所以要求有几百伏和每平方毫米几个安培的稳定电源。

图 2.9 表明这种激光器的结构,放电管由内径 3mm 氧化铍毛细管做成,内充 0.7mm 汞柱的氩气同时加上 0.1 特斯拉的轴向磁场。此磁场的作用是对带电粒子起约束作用,结

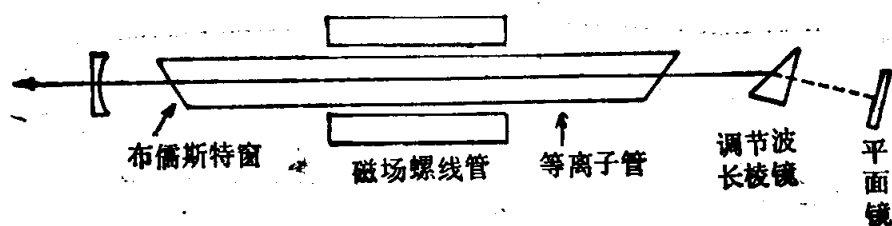


图 2.9 氩离子激光器结构示意图

果提高了放电区中心的电子密度和离子密度，从而提高了输出功率。色散棱镜用来选择激光波长，使得除某一特定波长之外其他波长的损耗都非常大，只要调整反射镜的角度就能调谐到所要求的波长。如果用平面镜代替色散棱镜，激光器的输出功率中含有各种谱线，是为全功率输出。这种激光器的输出功率受散热速度的限制，又由于腔内放电功率很大，约为 $5000\text{W}/\text{cm}^3$ ，相应的温度为 $3000\text{—}5000^\circ\text{K}$ ，所以放电管要通循环水以强制冷却，并用导热率高的氧化铍毛细管以提高输出功率。现代有些 150mW 或功率更低的，可用强制风冷，寿命可达 5000 小时。

氩离子激光器与氪离子激光器类似，但谱线集中在可见光长波部分，以 647 nm 较强，但噪声较大。染料激光器是将有机染料溶液为另一激光器泵浦发出长波长的激光，例如用氩离子激光器的 514nm 激光泵浦含有 Rhodamine 6G 水溶液的染料激光器，则后者可输出从 550nm 到 650nm 连续可变的激光，在 590nm 处转换效率可高达 50%。免疫学上使用的一些染料，其激发光波长在 550nm 以上，这时就可用染料激光器。

2.4.2. 滤片

流式细胞术中所用滤片有很多种，有中性滤片、带通滤片、带阻滤片、长波通滤片、短波通滤片、长波通二色性反射片等。中性滤片无频率特性，它对各波长的光线均匀衰减，常用在光线过强需要均匀衰减的地方。带阻滤片是滤除某一特定波长的光线，高于或低于此谱线的光不受影响。带通滤片的作用则正好相反，它只允许某一特定波长的光线通过，例如一个 525nm 带通滤片只允许 FITC 发射的 525nm 绿色荧光通

过,而其他波长的荧光全部被阻断。长波通滤片只允许某一波长以上的光线通过而将此波长以下的光线滤掉,如 620nm 长波通滤片只允许 PI 发射的红色荧光通过,而 488nm 的激发光及 FITC 发射的 525nm 绿光全部被阻。长波通二色性反射镜只允许某一波长以上的光线通过而将此波长以下的另一特定波长的光线反射。例如让 620nm 以上的红光通过而将 525nm 绿光反射,其他的光线则由镜片吸收。这种二色性反射镜有一定使用寿命,使用时须注意。

滤片的用途大体上有二: ① 激发光波长应尽可能接近荧光染料的激发光谱峰值。当光源使用激光器时,可调节激光的波长选择器选择波长;但当光源是汞灯或其他广谱光源时就要在激发光源前加滤片来选择激发光的波长。② 检测器应检测尽可能纯的和强的发射荧光。由于细胞在发射荧光的同时也有散射光,必须防止这部分散射光与荧光一起混入荧光探测器。另外,在多种荧光同时检测时,每个荧光检测器应只检测一种染料发射的特定荧光,这时就要用滤片系统阻挡住散射光,而对每个检测器只允许一种指定波长的荧光信号进入而被检测。选择滤片系统的依据就是要了解荧光染料的激发光谱和发射光谱。当用来探测两种以上波长的荧光时,为了有效地使各种荧光分开,可采用二色性反射镜。

2.4.3. 检测器——光电倍增管和硅光电二极管

对从紫外到可见光的探测,有二类光电器件可供选择:一类是真空光电器件;另一类是半导体器件。后者在某些方面有一定优点,如在强光照射时过载特性较好,但在某些方面则明显地不及真空光电器件。下面对光电倍增管和硅光电二极管作一简单的比较。

在 200—900nm 谱区光电倍增管有很好的响应,量子效率高,而硅光电管则相当差。光电倍增管的时间响应比半导体器件快得多,特殊的光电倍增管上升时间可仅为 ns 数量级,而硅光电管在考虑到分布电容和负载时,实际上升时间可能达数 $10\mu\text{s}$ 。至于探测器的灵敏阈即探测极限,则与信噪比有关。假定信噪比等于 1,用光电倍增管在探测波长为 400nm 的谱线时,能测得的最小信号功率约为 $2\times 10^{-17}\text{W}$,而硅光电管在波长 1060nm 处能探测到的最小功率大于 $2\times 10^{-13}\text{W}$,两者相差四个数量级。光电倍增管的增益可从 10^3 到 10^8 连续可调,而一般硅光电管没有增益。在光线较弱时光电倍增管有很好的稳定性,但是当光线很强时硅光电管就比光电倍增管稳定多了,所以在探测 FSC 时用硅光电管是合适的。由于荧光比 SSC 较 FSC 弱得多,这时探测器灵敏度是主要问题,因而应采用光电倍增管。

光电倍增管运行时要注意其稳定性。稳定性与工作电流、极间电压,运行时间,环境条件和光照情况等多种因素有关。光电倍增管阳极散热条件较差,功耗一般不允许大于 0.5W,故最大阳极电流常限制在 1—10mA,在过大电流下工作时,倍增极受到大电流轰击造成灵敏度恶化、工作不稳。光电倍增管曝光特别是曝露于较强的日光或荧光下以后,常需要在暗处存放很长一段时间才能恢复工作,这是因为受强光照后,玻璃产生的荧光可能会延续很长的时间。至于工作温度则不宜超过 75°C ,存贮温度以 $20\text{—}40^\circ\text{C}$ 为宜。此外多数光电倍增管对外磁场敏感,应注意磁屏蔽。但常用的百叶窗型和盒栅型结构的光电倍增管,其电极材料多用磁性材料镍制成,因而具有一定的内磁场效应。

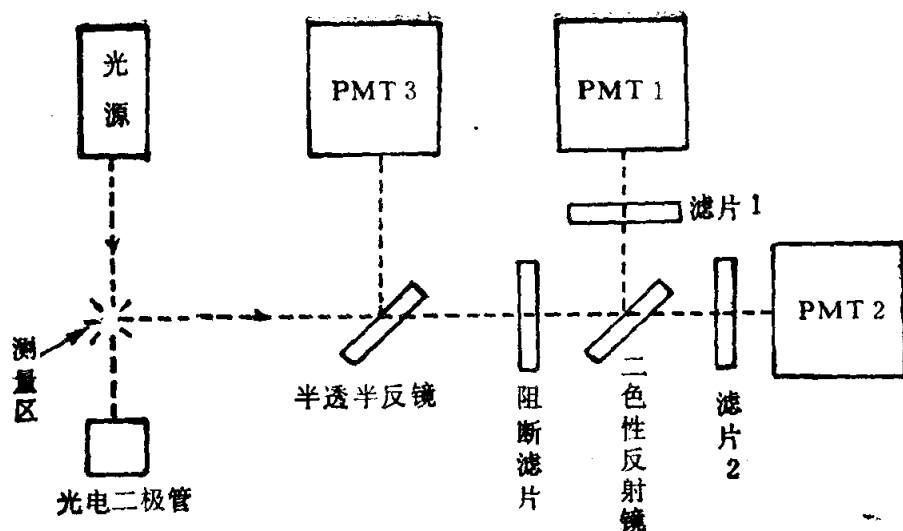


图 2.10 流式细胞计中滤片的设置

图 2.10 表示实际仪器中各滤片和探测器、光源设置的关系。在测量区,荧光染料受激后发出波长不同的两种荧光。这两种荧光和侧向散射光一起向右,半透半反镜将侧向散射光反射到 PMT3,阻断滤片滤除散射光只允许荧光通过,当然 PMT3 前面也可以加滤片以滤除荧光。二色性反射镜只允许波长较长的光通过而将波长较短的光反射,如果选择合适,则两种荧光分别到达 PMT2 和 PMT1,如果反射镜性能不佳或者是非二色性的,则必须加上滤片 2 和滤片 1。滤片 2 可选长波通的,滤片 1 常用带通的,例如前者选用 620nm 长波通滤片,后者选用 525nm 带通滤片。PMT2 和 PMT1 应选用波长灵敏度不同的光电倍增管,一般说,光谱范围在 300nm—850nm 的探测红光或橙光较合适,范围在 300nm—650nm 的探测绿光或蓝光较合适。上述探测器、滤片设置位置不是绝对的,有时为了适应某种要求也可重新安排。

2.4.4. 光谱重叠的校正

用一种激光束激发两种荧光染料而发射两种不同波长的荧光时,从理论上讲可选择滤片系统仅使一种荧光被一个光电倍增管检测,此光电倍增管不会检测到另外一种荧光。但实际上由于两种荧光的发射光谱的重叠,因而少量不需要的另一种荧光也会为此光电倍增管所检测。所以每一个光电倍增管实际上检测到的都是两种荧光之和,只不过各以某一个为主而已。

如何从所接收的荧光信号中把不需要测定的部分减去而使光电倍增管输出的信号真正只代表指定欲检测的信号?这可用电子补偿线路来完成。即在放大线路中加进一个补偿电路,使之能减去进入光电倍增管不需要测定的荧光信号。补偿的深浅程度,可用双荧光同时测定的仪器条件来决定。

补偿时先测定一种染料的荧光,此时除了应该接收该荧光的光电倍增管例如 PMT1 有信号输出外,另一光电倍增管 PMT2 也常会有微弱的输出,调节补偿器使 PMT2 输出为 0,然后再测另一种染料,再调 PMT1 补偿器使之输出亦为 0。如此反复调节,则 PMT1 和 PMT2 就可全获补偿。此后如 PMT 的高压改变,激光波长变动,滤片系统有变化时需重新调正。(实际调节时用的是一种标准荧光微球,微球上标有已知数量的荧光染料,利用标有不同荧光染料的微球,即可调正、补偿不同的荧光测量通道。)

2.4.5. 自发光

未染色的细胞受到光照射后所发出的荧光称自发光。用流式细胞计测定细胞的特异性荧光染料的荧光时,这种自发光对所欲测定的特异性荧光是一种本底信号,自发光

在多种情况下都会干扰特异性荧光信号，尤其是对低水平结合的荧光抗体它能减低染色的和未染色的细胞间的区别，使我们难以确定细胞中荧光信号的水平。自发荧光的强弱与细胞的大小、细胞的类型、激发光的波长、发射光的检测范围等都有关系。产生自发荧光的分子可能是正常细胞的组成成分如核黄素、细胞色素等。这些成分在较大的细胞中含量较多，相应的自发荧光也就强一些。培养的细胞中死细胞比活细胞的自发荧光要强，在某些细胞样品如脾和骨髓中，除了含有淋巴细胞和其他低自发荧光的细胞外还可能会有一些占不同比例的亮细胞，它们会干扰用免疫荧光方法本应能检测出来的、稀有的、细胞数目较少的亚群。

为减少自发荧光，应选用较亮的荧光染料，还应使用与荧光发射光谱相匹配的光学品质优良的滤片系统。利用较长波长的光线，如染料激光器的激光做为激发光源，也可减弱自发荧光。最后，对自发荧光还可用电子线路补偿的方法将自发荧光补偿掉。

2.4.6. 荧光的线性测量和对数测量

荧光测量时通常使用线性放大器。即放大器的输出与输入是线性关系，输入增大1倍，输出也增大1倍。但测量中有时需要用对数放大器，它的输出与输入是对数关系。如果原来输出为1，当输入增大到原来的10倍时，输出是2；当输入又增大10倍时，输出为3，等等。

在免疫学测量中常使用对数放大器。因为在免疫学的一个样品中，可能有的细胞未被染色仅有自发荧光，是为阴性群体；被染上色的细胞特异性荧光可能比自发荧光强数倍到数十倍，是为阳性群体；有时还会有一些被染色的细胞，其荧光

比自发荧光强数百倍，是为强阳性群体。对同时具有以上三种亚群的样品，当需要同时显示时，如用线性放大器，三个亚群的荧光将难同时显示，而用适当的对数放大器则可同时分辨出这些亮度差异极大的三个或更多个亚群。此外，在使用对数放大器时，被染色的细胞群体有倾向于对称性分布的趋势，这对于选定不同亚群间的分界点十分有利，对于使用流式细胞计进行分析和分选都不无好处。

在多色免疫荧光测量中，用线性/线性二维图显示数据，解释起来常感到困难，而用对数/对数二维图显示则易于解释。在免疫学研究中，使用对数放大器还有一个优点，就是免疫细胞群体的分布形状不受光电倍增管电压变化，增益变化以及所用较亮或不太亮的试剂所影响，这些变化仅使整个群体的分布在图上向左或向右移动而形状不变。对数放大器一旦被调节到所需的道数分辨率，即多少道相当于一个10进位，以后就不需再逐日调节，显然这是又一个便利之处。

线性放大器则适用在较小范围内变化的信号以及代表生物学线性过程的信号。前向角散射光和DNA测量即属于这一类。侧向散射光由于信号水平变化范围较大，有时用对数放大器可能好一些。但也不完全如此。图2.7就用的是线性放大器。

2.4.7. 细胞群体的DNA直方图和变异系数

流式细胞计测量的结果可表为一数字矩阵，此矩阵可用一个或数个图形来表示。下面我们讨论一下，一个细胞群体的DNA直方图的图形。

设一个指数生长的细胞群体全部细胞都处于增殖状态，用细胞动力学的语言说，就是增殖比是1。细胞群体经染色

后(其方法将在下一章内讨论,) 由于每个细胞结合的染料与 DNA 含量成正比, 所以每个细胞受激后发射的特异性荧光强度与它的 DNA 含量成正比。由于 G_1 期细胞的 DNA 含量为 $2C$, G_2 和 M 期细胞 DNA 含量为 $4C$, S 期细胞的 DNA 含量在 $2C-4C$ 之间。于是, 从理论上说, 这样一个群体的 DNA 直方图应该是图 2.11b 的样子: 即 G_1 期细胞全体都在同一荧光道上, 即图上 63 道处, G_2 和 M 期细胞则位于 $2 \times 63 = 126$ 道处, S 期细胞位于 $63-126$ 道之间, 由于 DNA 合成速率不是均一的, 因而在这一段范围内不会是均匀

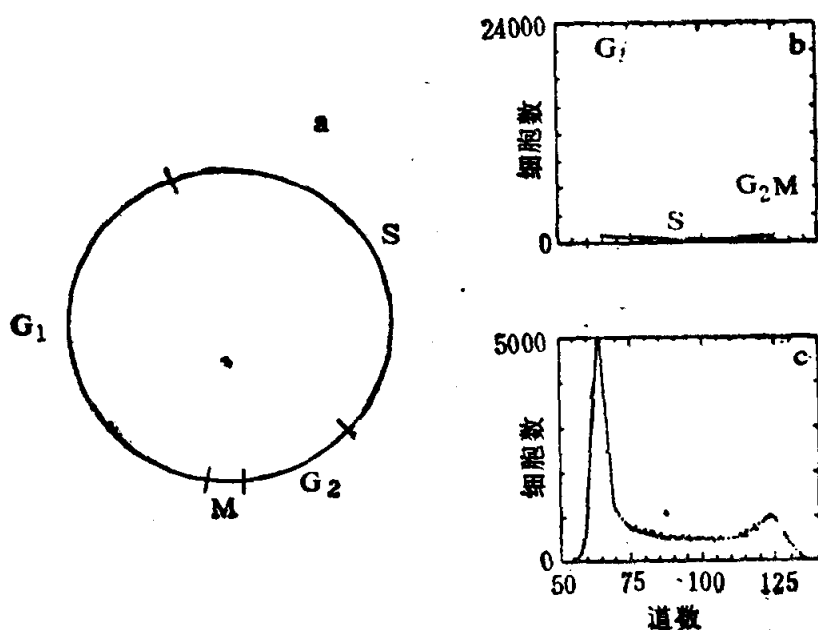


图 2.11 细胞周期和 DNA 分布直方图
a. 细胞周期 b. DNA 直方图的理论分布 c. 实际的 DNA 直方图 横轴表明仪器中脉冲高度分析器的道数, 纵轴表明每道的细胞数

分布。

然而,实测结果却是如图 2.11c 的样子,即对应原来 G_1 、 G_2M 的两个点都各变成了一个有分布的峰,通称 G_1 峰和 G_2M 峰, S 期部分也有变化。为什么会这样呢? 抛开细胞的种种不均一性,即使我们使用的是一些十分理想且尺寸均一、荧光均一的微球,被测量后也会分布成一个峰而不会是一个点。这是因为每个细胞(或微球)通过测量区时的位置、速度等都会有微小的差别,再加上仪器固有的光噪声、电噪声等等影响,使得原本应该绝对相同的数值有了分布,这个分布通常是正态分布或称 Gauss 分布。一个正态分布如图 2.12 或可用下式表示:

$$Y = \frac{A}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu}{\sigma}\right)^2}$$

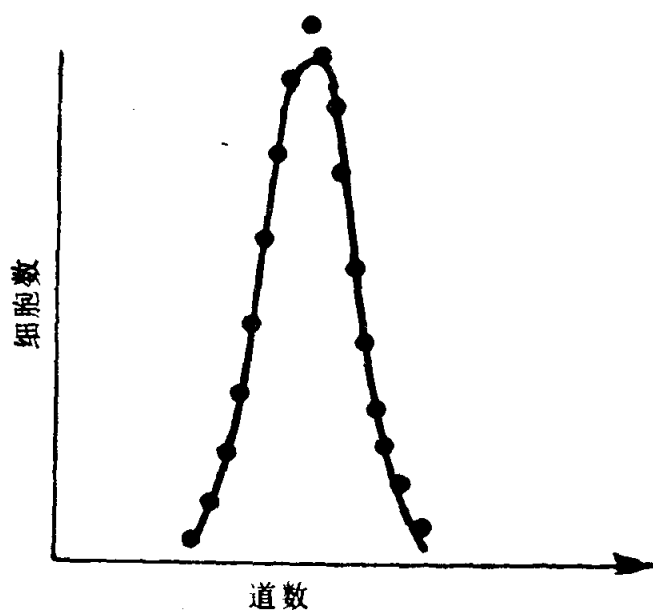


图 2.12 正态分布曲线

式中的 A 对应图上分布曲线下的面积, σ 是标准误差, μ 是平均值。

显然, 我们希望均一的荧光微球通过仪器测量后的分布愈集中愈好, 即曲线愈尖锐愈好。为进行描述, 我们引入变异系数, 亦称 CV 值

$$CV = \frac{\sigma}{\mu}$$

CV 值可定量说明分布的状态, 它比单纯使用 σ 要好。 σ 小则 CV 值小, 但当 σ 不变而 μ 加大时 CV 值也变小。

实用上常用正态分布的半高峰宽 FWHM 来计算 CV 值, 半高峰宽定义为在峰高一半的地方量得的峰宽, 经计算它与 CV 值有下述关系:

$$CV = \frac{FWHM}{\mu} \times 0.423$$

严格地讲, G_1 峰是非对称的, 因而不是正态分布, CV 值不应由上式计算。但在实测时仍可由上述半高峰宽计算 CV 值, 因为对多数情况, 这样计算的结果精度已足够了。

仪器在未准直前, 除灵敏度不高外, 其 CV 值也很大。一个 CV 值很大的仪器常能带来一些假象。图 2.13 说明同一群体在 CV 值不同的仪器上测得的直方图。当 $CV = 1.0\%$ 时的直方图与理想时的图 2.11b 很相似; $CV = 3.0-7.0\%$ 基本上相似; 而当 $CV = 20\%$ 时, 图的形状完全变了, 很难看出它表示的群体与 $CV = 1.0\%$ 时的竟是同一个。所以我们说, CV 值是仪器很重要的指标。

实测结果的 CV 值包括两部分: 仪器的 CV 值和样品的 CV 值。样品的 CV 值是样品所固有的, 与样品的物理

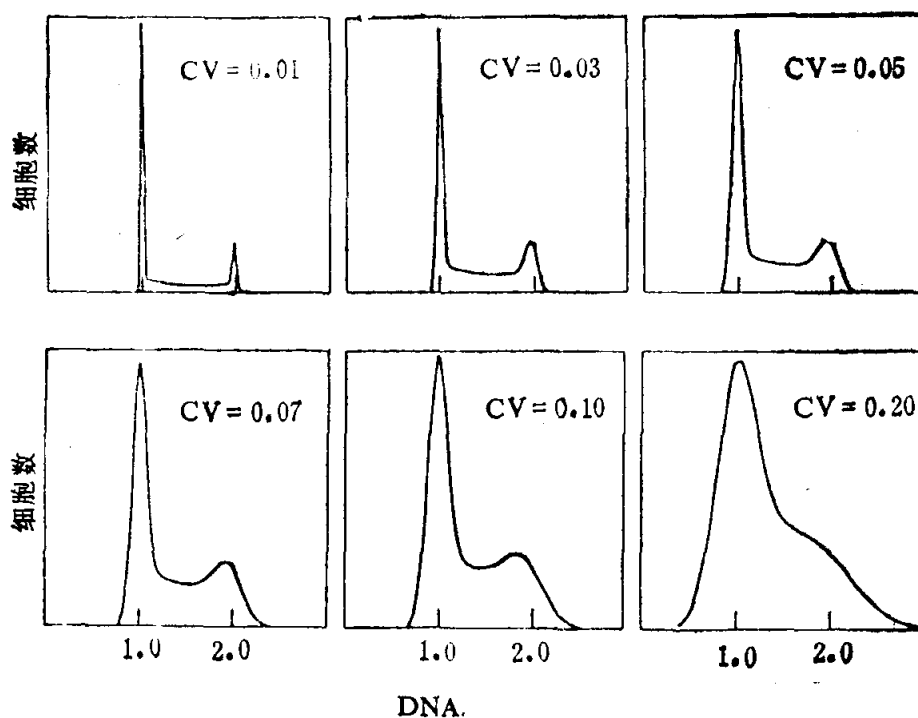


图 2.13 具有相同细胞周期分布但仪器变异系数不同的 DNA 直方图

性质、生物学性质、化学性质有关,亦即生物学样品本身、固定方法、处理程序和染色等都能使样品本身的 CV 值发生变化,实测图形的 CV 值便是上述样品的 CV 值与仪器的 CV 值之和。当然,仪器可通过准直、校正降低 CV 值,但每台仪器的 CV 值都有个极限,不可能无限减小,一般为 2.0% 左右。

2.5. 液流系统

液流问题在流式细胞术发展史上占有很重要的地位。从

本世纪 30 年代到 50 年代, 流式细胞术发展迟缓的一个重要原因就是细胞悬液通过毛细管或小孔时的阻塞问题得不到解决, 直到引入层流鞘液的方法后, 不但使液流更加稳定, 约束细胞在液柱中间; 而且较彻底地解决了阻塞问题。

2.5.1. 稳流与雷诺数

常识告诉我们, 当液体流动时, 有时是稳定的流动, 有时会产生旋涡。流体力学称前者为稳流或片流, 后者为湍流, 但区别二者的根据是什么呢?

上个世纪, 雷诺 (Osborne Reynolds, 1842—1912) 发现了一个以他的名字命名的数——雷诺数, 其定义如下: 在一个直径为 d 的管子内, 流动液体的平均速度是 $\bar{v}$, 如果液体的密度为 ρ , 粘滞系数为 η , 则雷诺数 R_e .

$$R_e = \frac{d\rho\bar{v}}{\eta}$$

当 $R_e = 2300$ 时就是前面我们讨论的稳流与湍流的分界点, 当 $R_e < 2300$ 时是稳流, 当 $R_e > 2300$ 时是湍流。显然, 在流式细胞计中我们希望都保持稳流。如果喷孔直径是 $100\mu\text{m}$, 水的密度为 1g/cm^3 , 水在 20°C 时的粘滞系数是 0.010 泊 (poise, $1\text{泊} = 1\text{克/厘米} \cdot \text{秒}$), 代入上式, 可计算出 $\bar{v} = 23\text{米/秒}$ 。这是流式细胞计喷孔喷射速度的极限, 其实当喷射速度过快时还有另一问题, 如图 2.14, 其中 a 是速度较慢时的正常状态, 液体与喷孔有浸润现象, 这样的液柱是稳定的, 当速度过大时如图 b, 从喷孔内截面就形成液柱, 这样的液柱在空间的位置是不稳定的。尽管它也是稳流, 雷诺数尚不到 2300。这样的分界点的液流速度与液体及喷孔材料湿润情况有关, 考虑到各种因素, 常限制喷射速度在 10 米/秒 以下。

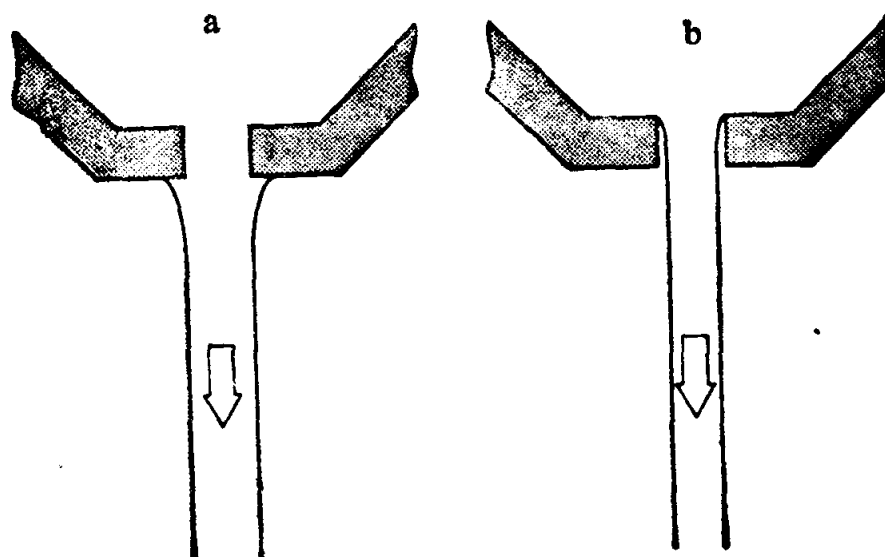


图 2.14 液流与喷嘴

a. 液流较慢时 b. 液流较快时

2.5.2. 喷嘴

图 2.15 是一个实际喷嘴结构，中间是含有细胞悬液的样品，样品外面包围着鞘液从喷嘴中喷出，由于喷射速度较高磨损严重，故喷孔大多用耐磨的钟表宝石制成。测量区在喷孔外面很近处的空气中。

这样的设计还有一个优点，就是液流的聚焦作用。如果流体从一个截面为 A_1 的粗管流入一个截面为 A_2 的细管如图 2.16。

按流体力学的 Bernoulli 定律：

$$A_1 \bar{V}_1 = A_2 \bar{V}_2$$

式中 $\bar{V}_1, \bar{V}_2$ 分别是流体在粗管中的平均流动速度和在细管中的平均流动速度。为了保持界面处仍然是稳定的流动，两管接口处常做得“光滑”一些，如实线所示。显然细管中的 $\bar{V}_2$ 大

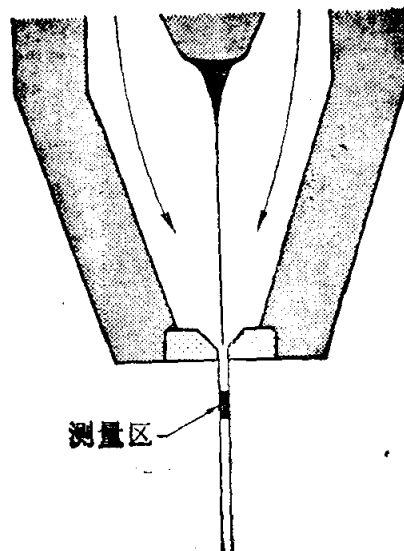


图 2.15 喷嘴、鞘液、样品液与测量区

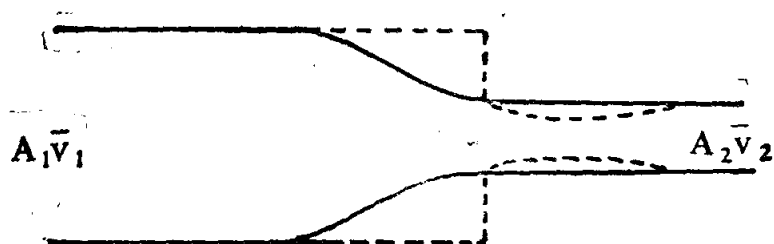


图 2.16 液流聚焦现象(由左向右流动)

于粗管中的 $\bar{v}_1$ 。当接口处的几何形状是如虚线的“突变”时，液流进入细管后并不是形成全部平行于细管壁的稳流，而是在细管入口处有一段“收缩”的区域，如细管中的虚线所示。在虚线与管壁之间的流体是静止不动的，只有两条虚线间的液体是流动的，这样就产生了“自聚焦”现象。显然，当我们把测量区定在这个最狭窄处，可提高仪器的 CV 值，这个位置不

同的喷嘴是不相同的,对喷向空气中的喷嘴大约在距喷口 0.25mm 的地方。

为了不同的目的,人们设计了各种形状的喷嘴,如在精子分析中,为满足流体力学的要求而作成鸭嘴状等等。

2.5.3. 流动室

样品和鞘液相混的小室称为流动室。流动室常以有机玻璃、光学玻璃或石英等制成,其做工精巧,尺寸准确、价格昂贵,是流动系统的核心。其设计要求在流体力学上、光学上、机械学和电学上都十分稳定。

图 2.15 喷嘴上边的流动室就是常用的一种,至今美国 Becton-Dickinson 公司的一些仪器上仍在采用这样的结构。样品(细胞悬液)和鞘液分别引入流动室,样品从流动室轴心的细管射向喷嘴上的喷孔,同时鞘液从四周流向喷孔,二者压力略有差别,被鞘液包围的样品从喷嘴喷出,在空气中与激光束相交,测量用的会聚透镜光轴与液柱、激光束相互垂直。这种三轴相互垂直的系统,在流式细胞术中是个典型的系统。

图 2.17 是另外几种流动室,其设计不同,各具特色。a 和 b 液流是从下往上流动,这样的设计使清除流动室中的气泡变得容易一些,因为当流动室中有气泡时,液流不稳定,仪器的 CV 值变大,如果液流是从上往下流动,常不太容易排掉气泡,此设计解决了这一困难。其中 a 是最早设计的一种流动室,被测量的细胞通过一个充满了液体的区域,由于窗口的内外面都远离流动室轴心,故可减少空气界面造成的散射。b 的设计是液柱射向一个透明的管子,其外壁为方形。同样可减少由于液体和空气介面所造成的散射。c 使用了油浸镜头,可一面监测一面收集细胞的荧光。d 是样品射向显微镜

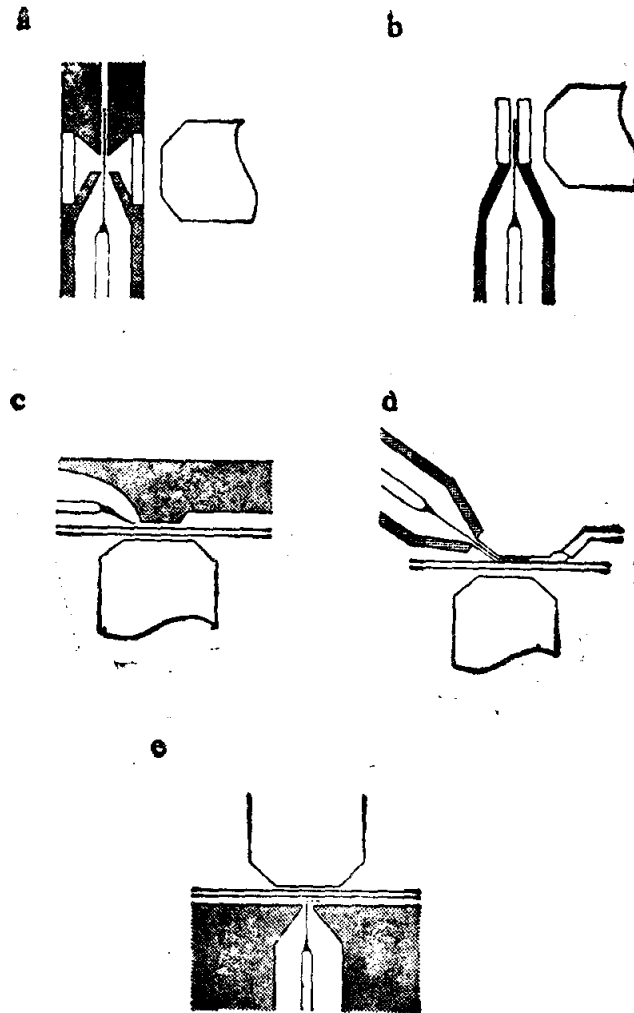


图 2.17 几种典型的流动室

的盖玻片,显微镜的物镜有较大的数值孔径,有利于荧光的收集,最后, e 是样品沿光轴向上流动,这样的设计除易于赶走气泡外,还可加大焦深,提高 CV 值,这种设计至今还用于某些商品中,在研究精子时也有人用此设计。

2.5.4. Coulter 效应

图 2.18 是原理图。在不导电的容器中充满导电的液体，液体被中间隔板分为两部分。隔板上有一个小孔，两个极板加上电压后，由于隔板上有通道，所以会有电流通过。如果一个细胞通过小孔，由于细胞的导电性质与导电液体不同，因而通道的电阻发生变化，细胞体积愈大这个变化也愈大。设法测量这个变化引起的脉冲，就能知道细胞的体积；纪录脉冲的数目就对细胞进行了计数，这就是 Coulter 计数器的原理。某些流式细胞计的流动室中加入了电极，利用 Coulter 效应，可在测量荧光的同时测量该细胞的体积。

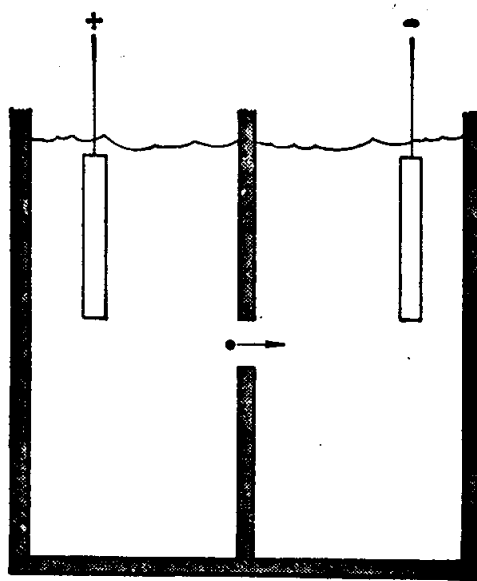


图 2.18 Coulter 效应原理图

2.6. 细胞分选器

细胞分选器可使被指定的细胞从细胞群体中分离出来。流式细胞术所测定的任何参数都可做为流式细胞分选器选定细胞的依据,而且被选出来的细胞的均一性与所测参数有关。

在以上所述的流式细胞测量术中,如果能够把喷出来的液柱破坏成一连串小水滴,并对带有指定特性细胞的液滴充电。当此带电液滴通过静电场时发生偏转,落入收集器中。于是完成了分选。为此,需要有形成水滴、快速决定细胞是否应被分选的逻辑电路,以及充电电路等部分。下面分别介绍各主要部分。

2.6.1. 小水滴的形成

为使细胞分选的质量较高,首先要求能形成稳定的水滴。安装在流动室上的压电晶体加有每秒数万周的电信号,于是压电晶体带动流动室一起振动。液流从喷孔出来后,需要经过一段距离才被破坏形成水滴,如图 2.19。这段距离大约 10—20 个波长,测量区应尽量靠近喷嘴以避免受振动干扰。

通常,在这样一个系统中液流喷出的速度大约 8—10 米/秒,如喷孔直径 $50\mu\text{m}$,当压电晶体上所加的信号频率为 40 kHz 时,两个水滴间的距离即波长为 $250\mu\text{m}$ 。由于实际上液流束的直径比喷孔直径略大一些,所以形成稳定水滴的条件经修改后可由下式表示:

$$f = v/4.5d$$

式中 f 是电信号频率, v 是液流速度, d 是喷孔直径。如果孔径是 $70\mu\text{m}$,相应的电信号频率约 28kHz 左右最合适,大于

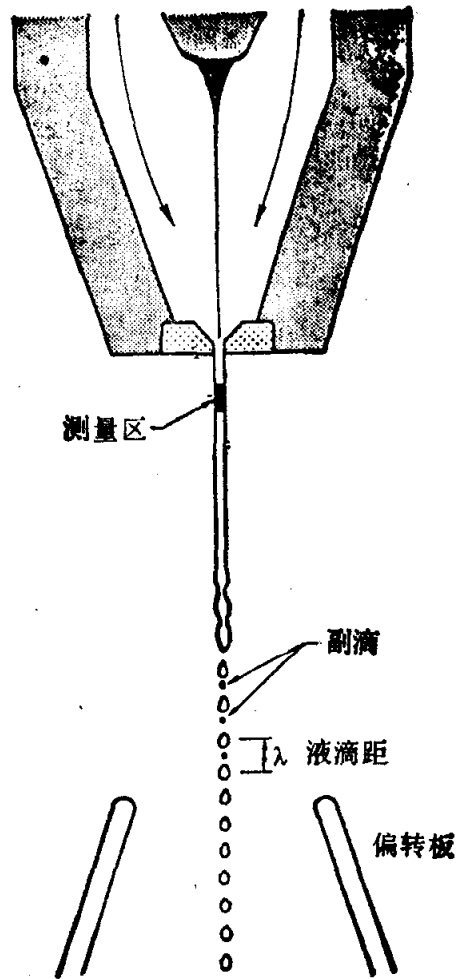


图 2.19 液滴形成过程

100 μm 的喷嘴不适用于分选细胞，当分选较大细胞时，应重新设计而不能单纯更换喷嘴。

以上讨论中，喷嘴的振动频率也就是每秒钟产生水滴的数目，喷嘴直径 50 μm 时，信号频率为 40kHz，即每秒钟产

生 4 万个水滴,若每秒钟流出的细胞是 1000 个,则平均每 40 个水滴中只有一个水滴是有细胞的,其他皆为空白,可见被分选
的细胞数仅占每秒钟形成水滴中的一个很小的部分。

2.6.2 水滴的充电与偏转

当水滴从流束上将要断开时给整个流束充电,则水滴从流束上断开后便带有同极性的多余表面电荷。如水滴在与流束将分离时未对流束充电,则离开流束的水滴不带电荷。下落的水滴通过一对平行板电极形成静电场时,带正电荷的水滴向带负电压的电极偏转;带负电荷的水滴向带正电压的电极偏转;不带电的水滴垂直下落不改变其运动方向,这样就可用容器分别收集各种类型的水滴。用于给流束充电的电压大约是正 150V 或负 150V,偏转板间电位差约 2000V—6000V。

图 2.20 是几种常用的分选流动室,其中 a 即是图 2.19,只不过指明测量透镜的位置;b 与图 2.15b 相似只不过改变了流动方向,c 是双孔流动室,鞘液分为初级鞘液和次级鞘液两次注入,这样设计便于在流动室内安装 Coulter 电极,以便在测量荧光的同时测量细胞的体积,同时还可进行分选。

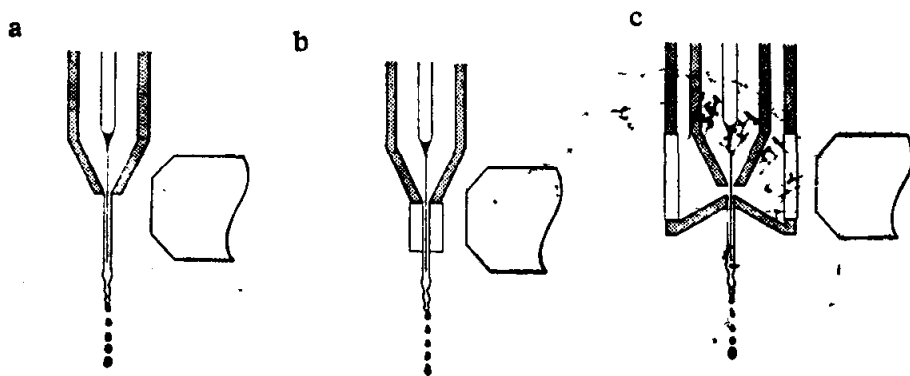


图 2.20 几种流动室与液滴形成过程

2.6.3. 决定逻辑

为了分选细胞，需要细胞在经过测量区时判断出哪个细胞满足了分选的条件，并产生一个逻辑信号，此信号驱动充电脉冲发生器，使之产生充电脉冲，当满足分选条件的细胞形成水滴时充电脉冲正好对它进行充电。可见，给水滴充电的脉冲并不是在做出分选决定时立即产生并加到流束上的，而是当细胞达到分离点时才加上的。这一段等待时间依赖于喷孔的直径、细胞与激光束相交点的位置等因素。由细胞通过测量区到小水滴分离的时间大约为数 10 毫秒。这个时间称为延迟时间。从原理上说，可用单稳态振荡器产生分选所要求的时延。然而，实际上商品仪器都是用一个称为移位寄存器的数字电路产生时延，这种时延便于调整，以适应使用中的各种情况。

精确的测定延迟时间是决定分选质量的关键。延迟时间受到一系列因素的影响，例如测定所需平均延迟时间的不准确性，喷射液流的变化，水滴分离点的变化，细胞本身对水滴形成条件的影响等。

由于具体的分选方法在不同仪器上差异较大，故我们只能介绍一些原则，具体操作难以详述。

2.7 缝 扫 描

在以上所介绍的仪器中，测量区的线度都大于被测细胞的线度，因而测量的是整个细胞的某个参数，如本章开始所述。同时，也得不到有关细胞的形态学信息，它无法区别被测细胞是球形的、梭形的、还是星形的，因而被称为零分辨率仪

器。此处的零分辨率指的是形态学上的零分辨率,即无法定位测量。为了能得到一些低分辨率的信息, Wheeless 等人发展了一种被称为缝扫描的流式细胞计。

在这种仪器中,任何指定时刻的荧光都由一个狭缝收集,测量是连续进行的,结果就好像一个狭缝扫过细胞,缝扫描也因此得名。利用缝扫描可测量核荧光、胞质荧光、核直径、细胞直径、核质比等。图 2.21 是正常细胞和非正常细胞的脉冲波形,可见差异还是较明显的,不难区分开。近年有人利用激光束聚焦成扁平状代替缝扫描的“缝”,还有人利用激光干涉条纹代替“缝”,所得信号经 Fourier 变换处理以期得到更多的信息量,但无论上述哪种设备,都还没脱离试验阶段,目前无商品供应。

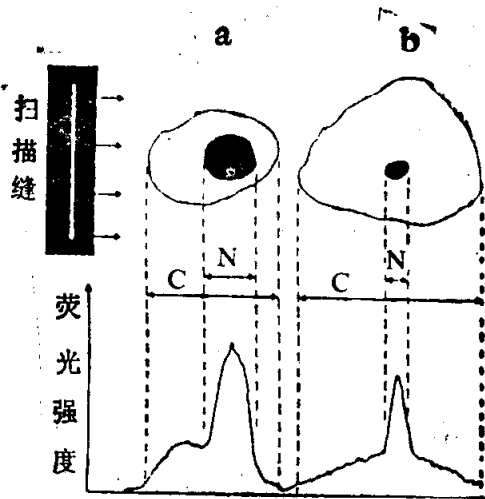


图 2.21 缝扫描和细胞的荧光信号
a. 非正常细胞 b. 正常细胞

2.8. 流式细胞计的技术指标

仪器的技术指标是反映仪器性能的定量数据，流式细胞计由于技术复杂、涉及尖端学科，是综合的高技术。因此，用少量指标不易全面反映整机的技术状况。又由于使用的目的不同，侧重点也不同。在此，我们提出下面几个指标作为参考：

1. 荧光分辨率 是表明仪器测量所能达到的最大精度，通常用变异系数表示。显然它与被测标准样品有关，必要时要注明。目前仪器的荧光分辨率都在 2.0% 以下。

2. 荧光灵敏度 以能检测到最少的 FITC 分子来表示，即微球上最少标有多少个 FITC 分子时刚好能被检测到，即定义为荧光灵敏度。一般仪器均可在标有 3000 个 FITC 分子时即检测出，即荧光灵敏度为 3000 个 FITC 分子。

3. 前向角散射光灵敏度 以前向角散射光最小能检测到的颗粒直径表示。一般仪器可检测的最小颗粒直径在 $0.3\mu\text{m}$ 左右。

4. 前向角散射光分辨率 以变异系数表示。一般约在 2.0%，但多数厂家不给出此值。

5. 分析/分选速度 分析速度可达每秒 5000—10000 个细胞，分选速度为每秒 5000 个细胞通过测量区。实用时为保证分析或分选精度，常在每秒 1000 个以下。

6. 分选纯度 分选纯度是个比较复杂的问题，它不但与仪器精度有关，而且与被分选的亚群在整个群体中的相对位置也有关系。如果被分选的亚群在直方图或二维点图上可清晰地分辨出来且与其他亚群无重叠，则分选结果的纯度就

	Becton-Dickinson	
指标或参数	FACScan	FACStar plus
荧光分辨率	<2.0%*	<2.0%
荧光灵敏度	700	1000
FSC 灵敏度		<0.5 μ m
分析速度	10000/秒	10000/秒
样品浓度	$5 \times 10^3 - 2 \times 10^7$ 细胞/ml	$10^3 - 10^7$ 细胞/ml
分选速度	/	10000/秒
分选纯度	/	99%
光源	15m W 氩离子 激光器	100m W, 2W, 5W 氩离子 激光器或氦氖激光器。
喷孔	430 μ m $\times$ 180 μ m	ϕ 50 μ m—400 μ m***
计算机	CONSORT 32; HP340 机 MC68030 32 位 4Mb RAM 40Mb 硬盘,可配1.2 Gb 光盘。1024 $\times$ 768 彩监	CONSORT 32 性能同左 亦可配 Micro VAX II
尺寸(厘米)	76 $\times$ 60 $\times$ 51	曲尺型 183 $\times$ 198 $\times$ 127
重量(公斤)	61	850

* 全峰的变异系数

** 半峰高的变异系数

*** 400 μ m 为任选件,商品名 Macro SORT 适用于 FACStar plus

高,反之则低。例如在图 2.11 c, DNA 直方图中,晚 S 期细胞与 G₂M 有较多重叠,故对晚 S 期细胞分选纯度不可能很

Coulter 公司

Profile I	Epics 751-753	Elite
<1.5%**	1%	<1.5%**
<1000	<600	<1000
<0.5 μ m	<0.3 μ m	<0.5 μ m
~10000	>10000	
$5 \times 10^4 - 5 \times 10^6$	< 5×10^6	5×10^6
/	>5000	>5000
/	99%	99%
15mW 氩离子激光器	5W 氩离子激光器,752 另加染料激光器,753再加 4W 氩离子激光器	15mW 氩离子 10mW 氩-氖 13mW 氩-镉及5W 氩离子激光器
250 μ m	76 μ m(50 μ m—250 μ m)	250 μ m
Intel 80286 有 80287 浮点协处理器 512K RA M 20Mb 硬盘	Intel 8086 8087 协处 理器,512K RAM 50Mb 温盘	cpu: 80386 配 80387 协 处理器
56.5 $\times$ 160 $\times$ 61.5	153 $\times$ 277 $\times$ 89	142 $\times$ 130 $\times$ 168
154.2	805	364

高;而中 S 期细胞与其他时相无甚重叠,这时的纯度就依赖仪器的精度。所以,分选纯度在仪器灵敏度确定以后并无多大实际意义。然而制造商又常常专门介绍此指标,且声称纯度达 99%,这是要注意的。