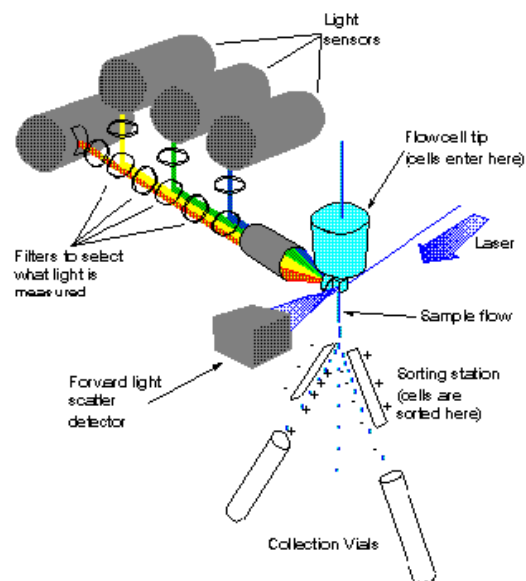
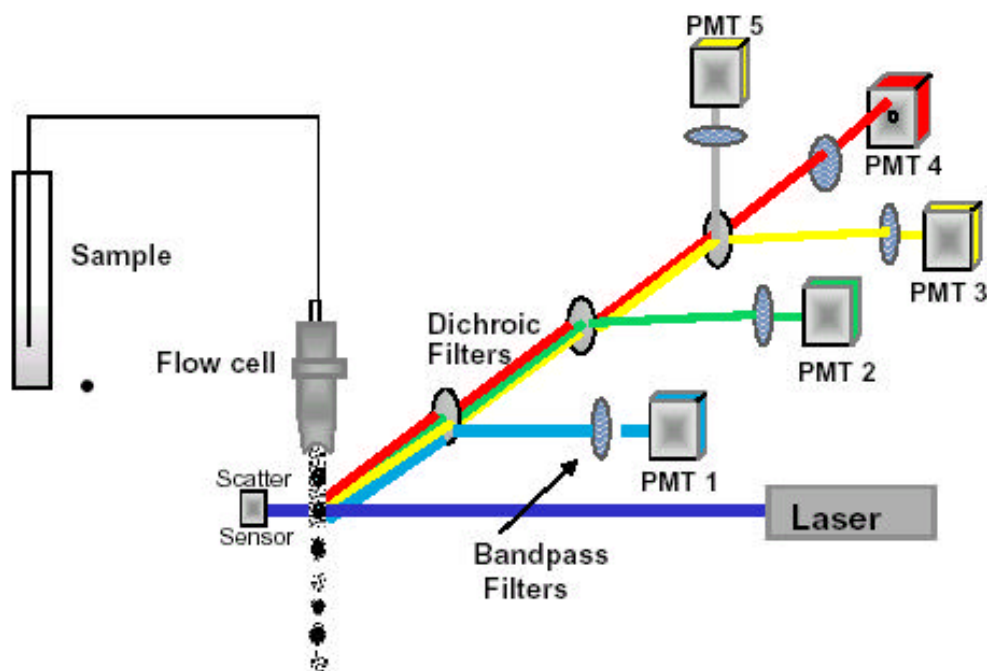


流式细胞原理及构造





流式细胞术发展史

纵观历史，几乎没有哪一门科学技术象流式细胞术这样凝结了众多不同学术背景、不同科研领域的科学家的心血。从流式细胞术的发明、改进，流式细胞仪的研制、革新，到今天的众多应用领域的拓展，每一步都是诸如生物学、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的结晶。而现代流式细胞术，更是由于结合了单克隆抗体技术、定量细胞化学和定量荧光细胞化学的应用，使其在生物学、临床医学、药理学等等众多研究领域的应用有了更加突飞猛进的发展。而这一切，就要求我们的流式细胞仪使用者和科研人员一定要不断地有意识地学习上述各门学科的知识，只有这样，才能更好地将流式细胞仪应用到我们的临床和科研中去。

流式细胞术发展史

1930年 Caspersson 和 Thorell 开始致力于细胞的计数。

1934年 Moldaven 是世界上最早设想使细胞检测自动化的人，他试图用光电仪记录流过一次毛细管的细胞。

1936年 Caspersson 等引入显微光度术。

1940年 Coons 提出用结合了荧光素的抗体去标记细胞内的特定蛋白。

1947年 Guclcer 运用层流和湍流原理研制烟雾微粒计数器。

1949年 Wallace Coulter 提出在悬液中计数粒子的方法的专利。

1950年 Caspersson 用显微分光光度计的方法在 UV 和可见光光谱区检测细胞。

1953年 Crosland-Taylor 应用分层鞘流原理，成功的设计红细胞光学自动数器。

同年, Parker 和 Horst 描述一种全血细胞计数器装置, 成为流式细胞仪的雏形。

1954 年 Beirne 和 Hutcheon 发明光电粒子计数器

1959 年 B 型 Coulter 计数器

1965 年 Kamemtsky 等提出两个设想, 一是用分光光度计定量细胞成分; 二是结合测量值对细胞分类。

1967 年 Kamemtsky 和 Melamed 在 Moldaven 的方法的基础上提出细胞分选的方法。

1969 年 Van Dilla, Fulwyler 及其同事们在 Los Alamos, NM(即现在的 National Flow Cytometry Resource Labs)

发明第一台荧光检测细胞计。

1972 年 Herzenberg 研制出一个细胞分选器的改进型, 能够检测出经过荧光标记抗体染色的细胞的较弱的荧光信号。

1975 年 Kohler 和 Milstein 提出了单克隆抗体技术, 为细胞研究中大量的特异的免疫试剂的应用奠定了基础。

从此, 大量的厂家不断研制生产出自己的流式细胞仪, 流式细胞术进入了一个空前飞速发展的时代。科学家们、仪器制造商们又纷纷将研究焦点转向荧光染料的开发、细胞的制备方法和提高电子信号的处理能力上来。进入九十年代, 流式细胞术作为一门生物检测技术已经日臻完善, 而随之而来的就是应用领域的日趋广泛。而今, 流式细胞仪已经深入到生物学、医学、药物学等的各个分支领域, 并将在未来为我们的科学研究发挥更大的作用。

流式细胞仪构造和工作原理

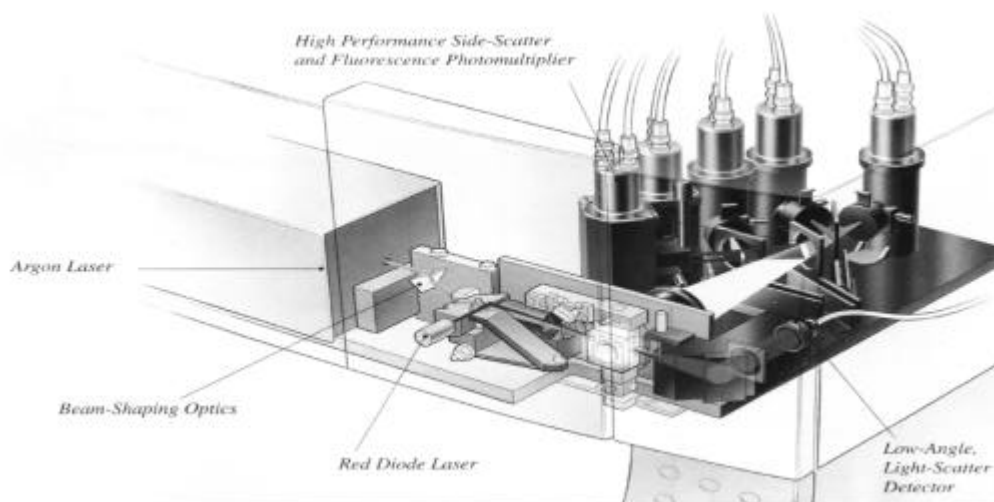
一、概述

流式细胞仪(Flow Cytometer 简称 FCM)是一项集激光技术、电子物理技术、光电测量技术、计算机技术以及细胞荧光化学技术、单克隆抗体技术为一体的新型高科技仪器。概括来说, 流式细胞术就是对于处在快速直线流动状态中的细胞或生物颗粒进行多参数的、快速的定量分析和分选的技术。从开始设想到第一台仪器的问世, 科技工作者进行了不懈的努力。随着各相关技术的迅速发展, FCM 技术已经成为日益完善的细胞分析和分选的工具。

FCM 仪器分为两大类: 一类为台式机, 其特点为: 仪器的光路调节系统固定, 自动化程度高, 操作简便, 易学易掌握。另一类为大型机, 其特点为可快速将所感兴趣的细胞分选出来, 并且可将单个或指定个数的细胞分选到特定的培养孔或板上, 同时可选配多种波长和类型的激光器, 适用于更广泛更灵活的科学研究应用。

二、流式细胞仪构造

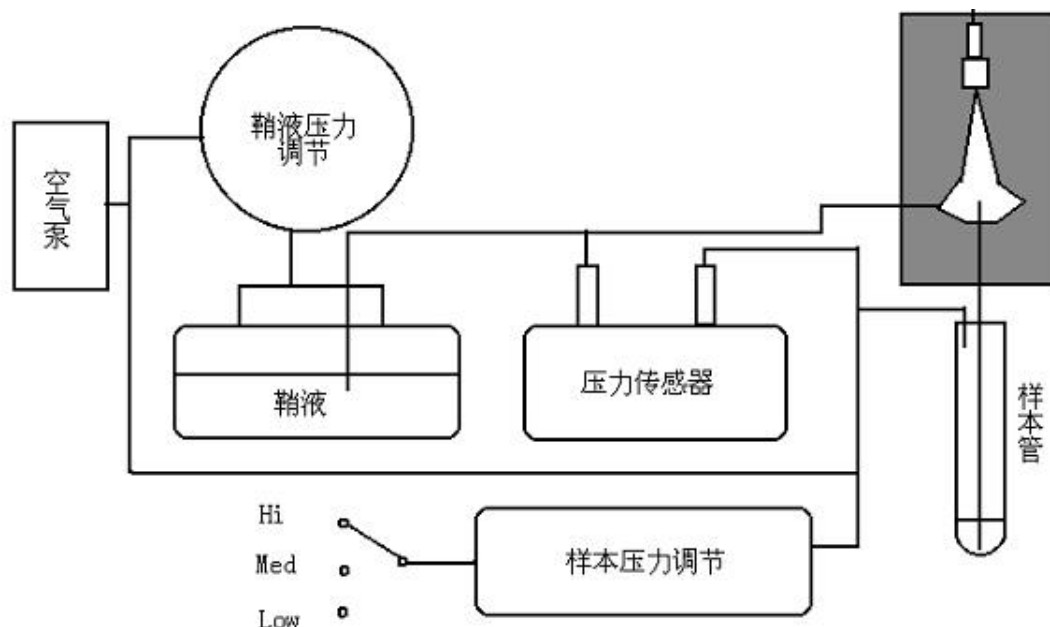
FCM 的结构一般可分为五部分: (1)流动室及液流驱动系统; (2)激光光源及光束成形系统; (3)光学系统; (4)信号检测与存贮、显示、分析系统, (5)细胞分选系统。见图一



图一

(一)、流动室与液流驱动系统

流动室(Flow Chamber 或 Flow Cell)是仪器核心部件, 被测样品在此与激光相交。流动

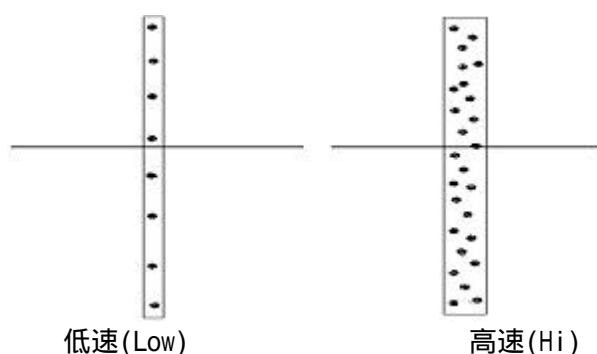


室由石英玻璃制成, 并在石英玻璃中央开一个孔径为 $430 \times 180 \mu\text{m}$ 的长方形孔, 供细胞单个流过, 检测区在该孔的中心, 这种流动室的光学特性良好, 流速较慢, 因而细胞受照时间长, 可收集的细胞信号光通量大, 配上广角收集透镜, 可获得很高的检测灵敏度和测量精度。

流动室内充满了鞘液, 鞘液的作用是将样品流环包。鞘液流是一种稳定流动, 操作人员无法随意改变其流动的速度, 样品流在鞘流的环包下形成流体动力学聚焦, 使样品流不会脱离液流的轴线方向, 并且保证每个细胞通过激光照射区的时间相等, 从而得到准确的细胞荧光信息。

图二

细胞流和鞘液流的驱动一般采用加正压的方法, 流速与压力的关系服从 Bernoulli 方程, 即 $P = (1/2) \rho v^2$ (忽略高度的变化), 可见只要压力恒定, 就可得到恒定的鞘液流流速, 从而可确保每个细胞流经激光照射区的速度不变。



图三

从图二可以知道,真空泵产生压缩空气,通过鞘流压力调节器加在鞘液上一恒定的压力(压力的大小由工厂设定),这样鞘液以匀速运动流过流动室,在整个系统运行中流速是不变的。而改变样本的进样速率开关,可提高采样分析的速度,但是,这并不是提高样本流的速度,而是改变了细胞间的距离,从图三可以看出,样本流变宽,细胞间距离缩短,这样单位时间内流经激光照射区的细胞数就增加。

这种情况应在具体实验中引起注意,由于激光焦点处能量分布为正态分布(见图四),中心处能量最高,因此当样本速率选择高速(Hi)时,处在样本流不同位置的细胞或颗粒,受激光照射的能量不一样,从而被激发出的荧光强度也不相同,这就会造成测量误差,当在检测分辨率要求高的实验时(如 DNA analysis)应选用低速(Low)。

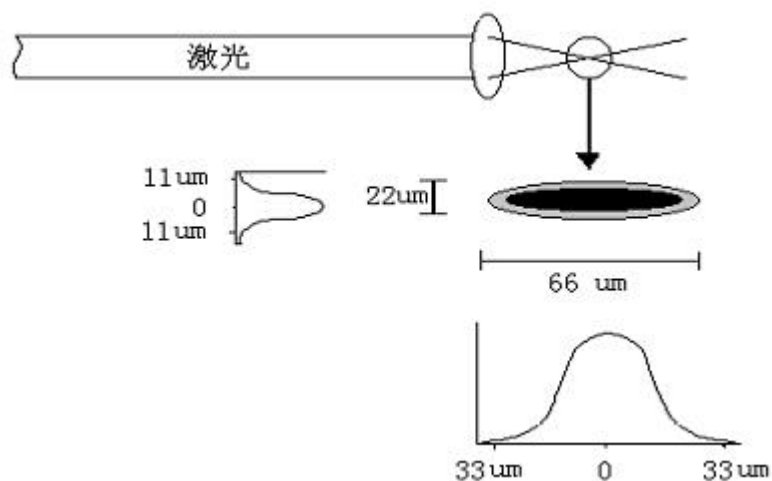
(二)、激光光源与光束成形系统

目前台式机 FCM, 大多采用氩离子气体激光器。

激光 (Laser, light amplification by stimulated emission of radiation)

是一种相干光源,它能提供单波长、高强度及稳定性高的光照,是细胞微弱荧光快速分析的理想光源,这是因为由于细胞的快速流动,每个细胞经过光照区的时间仅为 1 微秒左右,每个细胞所携带荧光物质被激发出的荧光信号强弱,与被照射的时间和激发光的强度有关,因此细胞必须达到足够的光照强度。

激光光束在到达流动室前,先经过透镜,将其聚焦,形成几何尺寸约为 $22 \times 66 \mu\text{m}$ 即短轴稍大于细胞的直径的光斑(见图四)。这种椭圆形光斑激光能量分布属正态分布;为保证样品中细胞是一个一个分别受到光照并且受照强度十分一致,须将样本流与激光束正交且相交于激光能量分布峰值处,台式机 FCM 的光路调节对用户是封闭的,即安装时由工程师调试完毕后,无需用户作任何调节,所以用户操作十分方便。



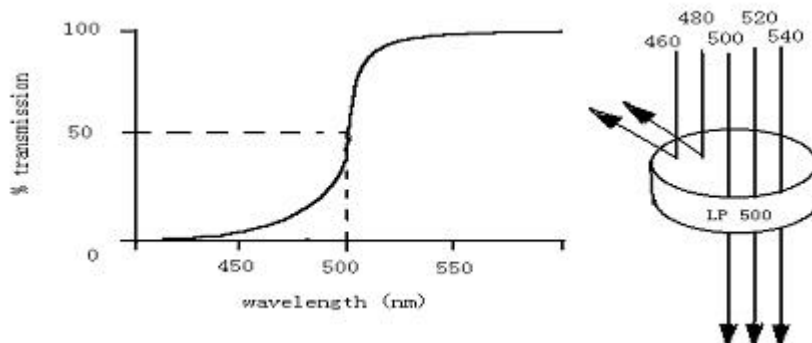
图四

(三)、光学系统

FCM 的光学系统是由若干组透镜、滤光片、小孔组成，它们分别将不同波长的荧光信号送入到不同的电子探测器。

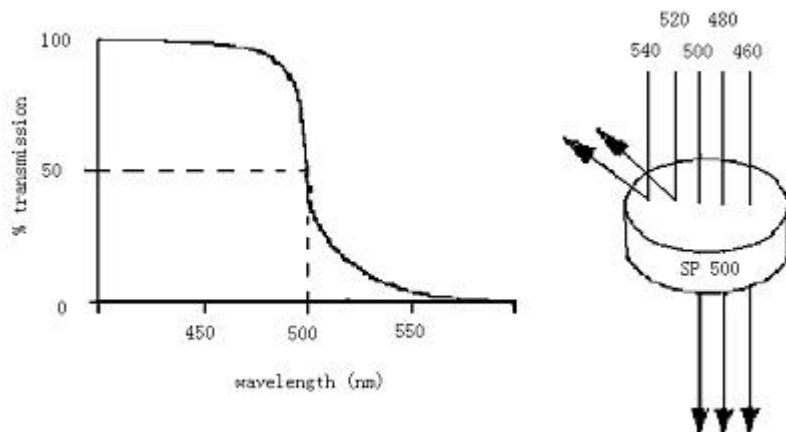
在 FCM 的光学系统中主要光学原件是滤光片(Filter)，主要分为三类：长通滤片(Long--Pass Filter, LP)、短通滤片(Short--Pass Filter, SP) 及带通滤片(Band--Pass Filter, BP)。

(1)长通滤片：长通滤片使特定波长以上的光通过，特定波长以下的不通过。如 LP500 滤片，将允许 500 nm 以上的光通过，而 500 nm 以下的光吸收或返回。



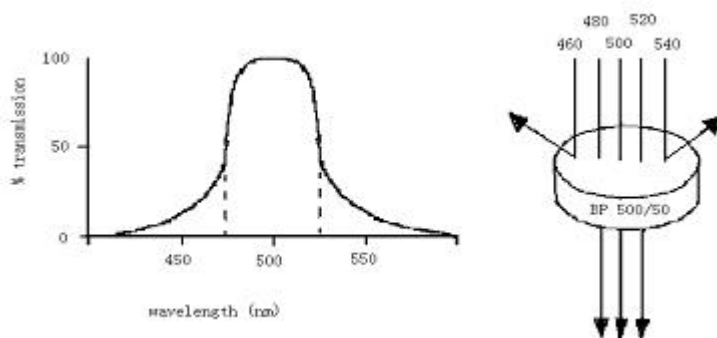
图五

(2)短通滤片：与长通滤片相反，特定波长以下的光通过，特定波长以上的光吸收或返回。



图六

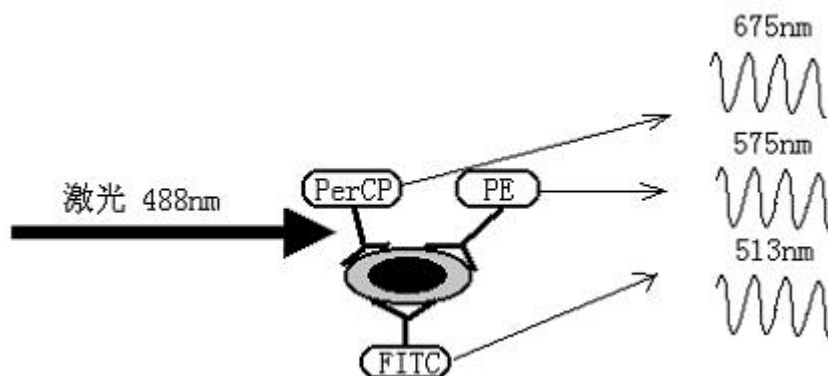
(3)带通滤片：带通滤片可允许相当窄的一波长范围内光通过，一般滤片上有两个数，一个为允许通过波长的中心值，另一为允许通过光波段的范围。如 BP 500/50 表示其允许通过波长范围为 475nm-525nm。



图七

(四)、信号检测与分析

当细胞携带荧光素标记物，通过激光照射区时，受激光激发，产生代表细胞内不同物质、不同波长的荧光信号，这些信号以细胞为中心，向空间 360 度立体角发射，产生散射光和荧光信号，图八是以激发光光源波长 488nm 为例的示意图：



图八

1. 散射光信号：散射光分为前向角散射(FSC, Forward Scatter) 和侧向角散射(SSC, Side Scatter), 散射光不依赖任何细胞样品的制备技术(如染色), 因此被称为细胞的物理参数(或称固有参数)。

(1) 前向角散射：前向角散射与被测细胞的大小有关, 确切说与细胞直径的平方密切相关, 通常在 FCM 应用中, 选取 FSC 作阈值, 来排除样品中的各种碎片及鞘液中的小颗粒, 以避免对被测细胞的干扰。

(2) 侧向角散射：侧向角散射是指与激光束正交 90° 方向的散射光信号, 侧向散射光对细胞膜、胞质、核膜的折射率更为敏感, 可提供有关细胞内精细结构和颗粒性质的信息。

上述两种信号都是来自于激光原光束, 其波长与激光相同, 目前采用这两个参数组合, 可区分裂解红细胞处理后外周血白细胞中淋巴细胞、单核细胞和粒细胞三个细胞群体, 或在未进行裂解红细胞处理的全血样品中找出血小板和红细胞等细胞群体。

2. 荧光信号：当激光光束与细胞正交时, 一般会产生两种荧光信号。一种是细胞自身在激光照射下发出微弱的荧光信号, 称为细胞自发荧光; 另一种是经过特异荧光素标记细胞后, 受激发照射得到的荧光信号, 通过对这类荧光信号的检测和定量分析就能了解所研究细胞参数的存在与定量。

荧光染料可选用的荧光素有多种多样, 由于它们分子结构不同, 其荧光激发谱与发射谱也各异。选择染料或单抗所标记的荧光素必须考虑仪器所配置光源的波长, 目前台式机 FCM 常配置的激光器为 488nm 通常可用染料有 PI(propidium iodide)、PE(phycoerythrin)、FITC (fluorescein isothiocyanate)、PerCP(peridinin chlorophyll protein)、CY5 等。

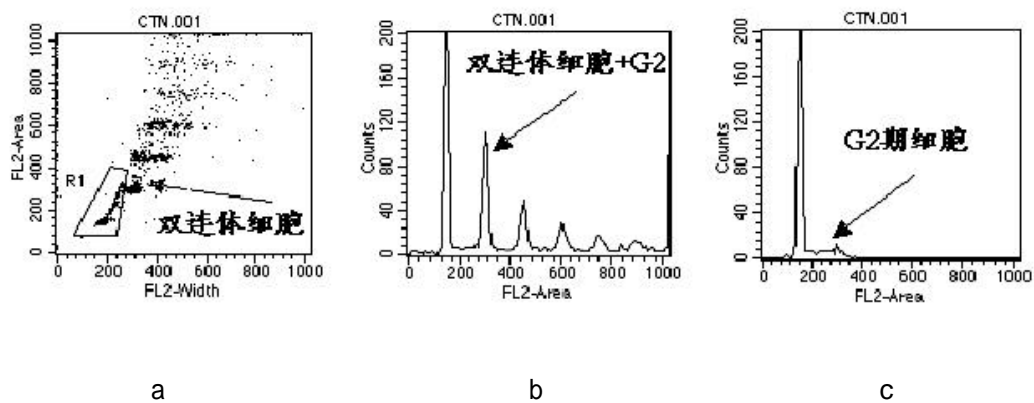
(1) 荧光信号线性测量和对数测量：

荧光信号的线性测量与对数测量主要由电子线路完成。从图一可知, 当携带荧光素的细胞与激光正交时, 受激发出荧光, 经过滤光片分离不同波长的光信号分别到达不同的光电倍增管(PMT), PMT 将光信号转换成电信号。有些厂家不采用光电倍增管(PMT), 而采用线性放大光电转换器, 其优点是降低成本提高线性度, 但其最大缺点是响应速度慢, 造成仪器分析细胞速度降低, 最高不可能超过 3300 个/秒, 如果样本流速超过此速度会导致数据损失, 因此高档机器不采用此种方法。电信号输入到放大器放大, 放大器分两类：线性放大和对数放大。线性放大器, 即放大器的输出与输入是线性关系, 细胞 DNA 含量、RNA 含量、总蛋白质含量等的测量一般选用线性放大测量。但在细胞膜表面抗原等的荧光检测时通常使用对数放大器, 如果原来输出是 1, 当输入增大到原来十倍时, 输出为 2; 当输入增大到原来一百倍时输出为 3 等。在免疫学样品中, 细胞膜表面抗原的分布有时要相差几十倍甚至几万倍。如用线性放大器, 将无法在一张图上清晰地将细胞阳性群、阴性群同时显示出来。

(2) 荧光信号的面积和宽度

所谓荧光信号的面积是采用对荧光光通量进行积分测量, 一般对 DNA 倍体测量时采用面积(如 FL2-A), 这是因为荧光脉冲的面积比荧光脉冲的高度更能准确反映 DNA 的含量, 当形状差异较大, 而 DNA 含量相等的二个细胞, 得到的荧光脉冲高度是不等的, 经过对荧光信号积分后, 所得到的信号值就相等。

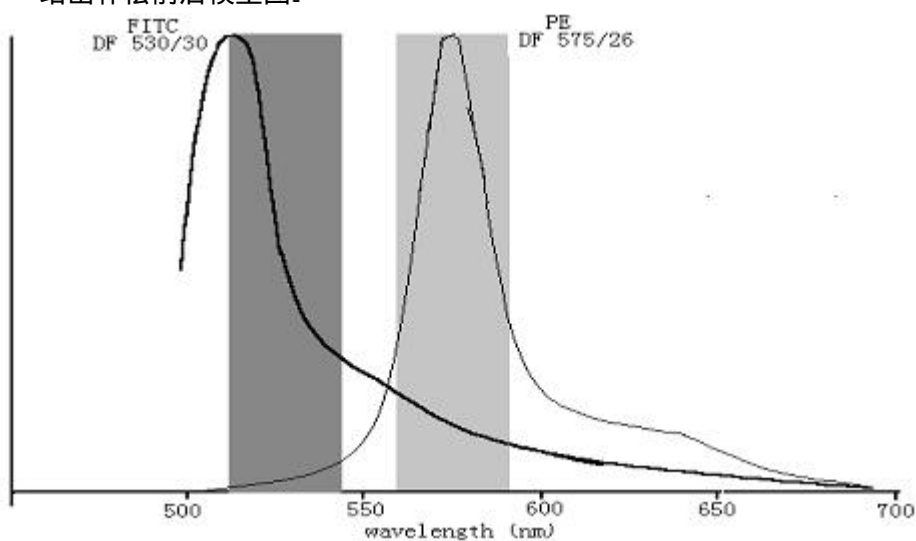
宽度(如 FL2-W)常用来区分双联体细胞, 由于 DNA 样本极容易聚集, 当两个 G1 期细胞粘连在一起时, 其测量到的 DNA 荧光信号(FL2-A)与 G2 期细胞相等, 这样得到的测量数据 G2 期细胞比例会增高, 影响测量准确性, 图九是用小牛胸腺细胞测量得到的 DNA 分布曲线, 图九-b 中 G2 形成了小峰, 其中, 有一部分是因为 G1 期细胞粘连在一起, 形成假 G2 期细胞, 而图九-a 是通过设“门”(gate), 将双联体细胞排除, 其原理是双联体细胞所得到的荧光宽度信号(FL2-W)要比单个 G2 期细胞大, 因此设“门”后才能得到真正的 DNA 含量分布曲线和细胞周期(图九-c)。不过通过荧光强度的高度峰和面积峰也可作同样分析。



图九

(3) 光谱重叠的校正

当细胞携带两种荧光素如(PE 和 FITC)受激光激发而发射出两种不同波长的荧光时, 理论上, 可选择滤片使每种荧光仅被相应的检测器检测到, 而不会检测到另一种荧光。但由于目前所使用的各种荧光染料都是宽发射谱性质, 虽然它们之间各自发射峰值各不相同, 但发射谱范围有一定的重叠, 从图十中可以看出, 阴影为探测器检测光谱的范围, FITC 探测器会探测到少量的 PE 光谱, 而 PE 探测器则检测到较多的 FITC 光谱。克服这种误差的最有效方法是使用荧光补偿电路, 利用标准已知样品或荧光小珠, 可合理设置荧光信号的补偿值。图十一给出补偿前后模型图。



图十

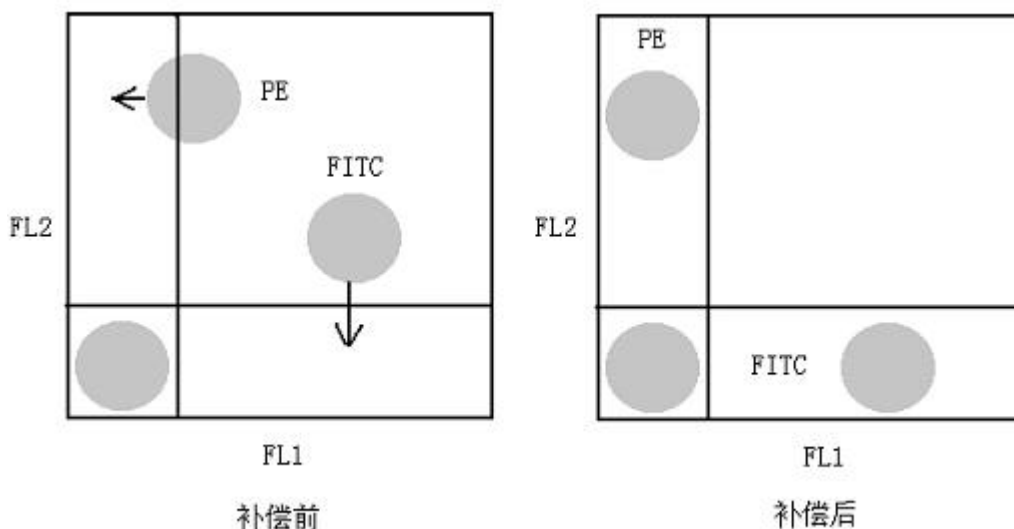


图 十一

采用双激光立体光路技术，就是为了减少各荧光间相互补偿，其原理通过图十二可以知道：点A通过透镜f成像在A'处，而点B通过透镜f成像在B'处。在光电倍增管前放上一小孔，作为空间滤波器，排除其它杂散光信号，从而确保了A点光源进不了B'点处，B点光源也进不了A'点处，因此就可避免有第一激光(488nm)激发出的FL1, FL2, FL3 和第二激光(635nm)激发出的FL4间的补偿。当然FL1, FL2,和FL3 是来自于同一点光源，它们之间的补偿是不可避免的。

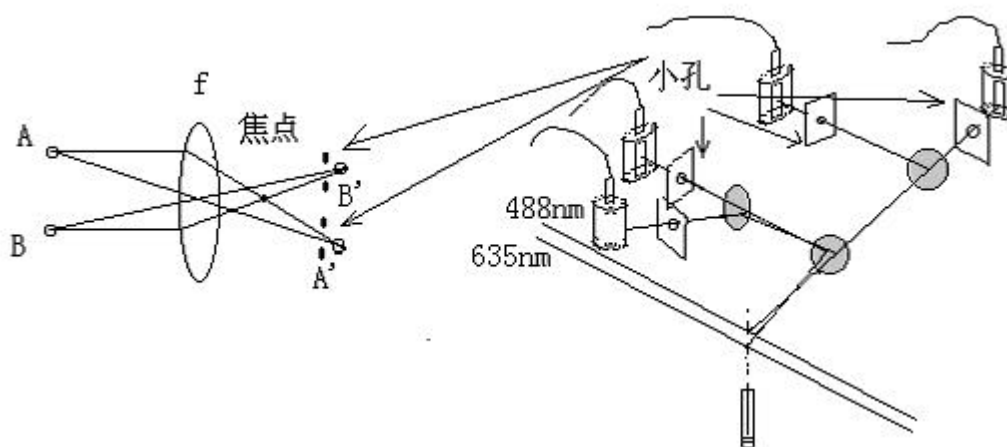


图 十二

(五)、FCM 测量数据的存贮、显示与分析

目前 FCM 数据的存贮的方式均采用列表排队(List Mode)方式。因为目前 FCM 所采用的都是多参数指标，荧光参数标记物已可多达 4 个，采用 List Mode 方式可大量地节约内存和磁盘容量。当一个细胞被检测 4 个测量参数，那么获取一万个细胞，所占容量为 4×10000 个(字或双字)。同时当只检测细胞一个参数时(如 DNA)，可灵活的关闭其他三个参数，节省四分之三的空间。数据文件虽然有易于加工处理分析的优点，但缺乏直观性，数据的显示通常有一维直方图、二维点图、等高线图、密度图等几种。

1、单参数直方图：

细胞每一个单参数的测量数据可整理成统计分布，以直方图(distribution histogram)

来显示。在图中，横坐标表示荧光信号或散射光信号相对强度的值，其单位是道数，横坐标可以是线性的，也可以是对数的，纵坐标一般是细胞数。

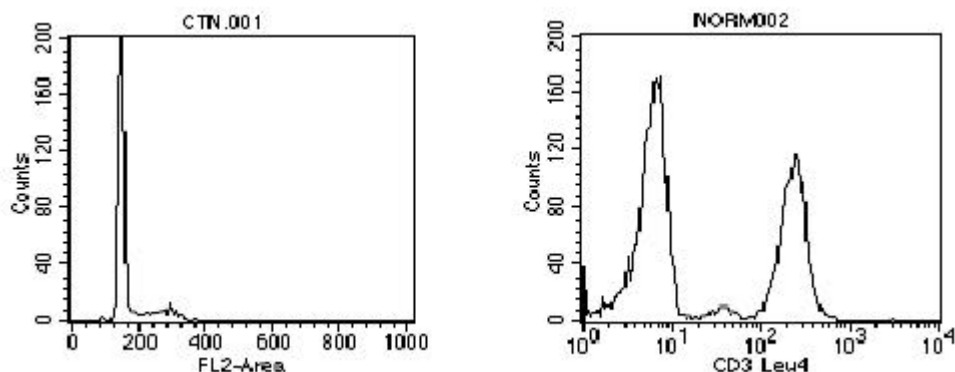


图 十三

左上图较低道数处为 G1 期细胞，道数为 G1 期细胞两倍得是 G2+M 期细胞，二者之间是 S 期细胞。右上图 100-101 为阴性细胞，而 101 以上为阳性细胞。

2、双参数数据的显示

双参数数据的显示是用于表达来自同一细胞两个参数与细胞数量间的关系，常用的表示方法有二维点图(Dot Plot)，等高线图(Contour Plot)，二维密度图(Density Plot)。

在二维图中，X 坐标为该细胞一参数的相对含量，而 Y 坐标为该细胞另一参数的含量，从双参数图形中可以将各细胞亚群区分开，同时可获得细胞相关的重要信息，左下图为 FSC 和 SSC 组成的点图，从图中可以很容易把全血样本中淋巴细胞，单核细胞及粒细胞区分开，从而可以分别分析各细胞亚群的统计数据，右下图是通过设“门”分析(Gating analysis)得到的 FL1 和 FL2 点图，设“门”可以是单参数设“门”，也可以是双参数设“门”，通过设“门”可调出其他参数的相关信息，被调出的信息同样也可以是单参数和双参数。图十四就是通过细胞的前向和侧向散射光双参数点图，设“门”圈出标本中的淋巴细胞群体，再调出免疫荧光的点图。

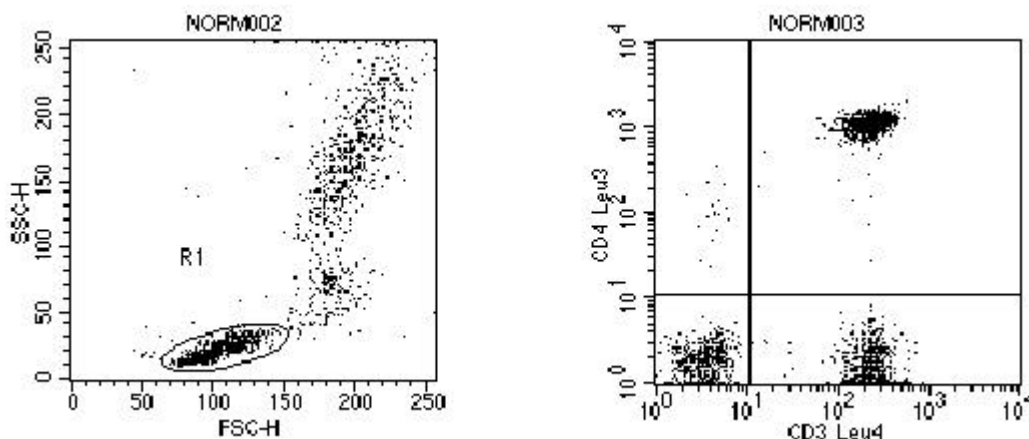


图 十四

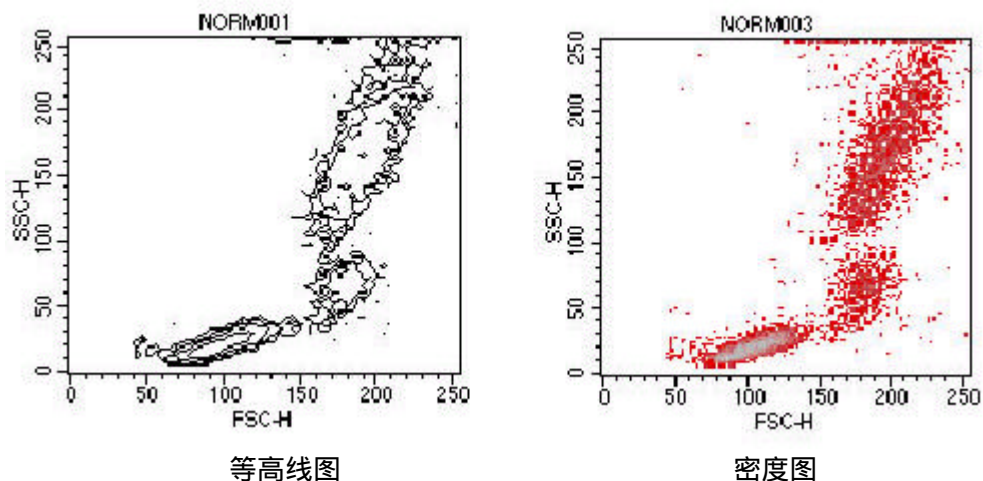


图 十五

流式细胞仪的主要技术指标

1. 荧光测量灵敏度

灵敏度的高低是衡量仪器检测微弱荧光信号的重要指标，一般以能检测到单个微球上最少标有 FITC 或 PE 荧光分子数目来表示，一般现在 FCM 均可达到(600 个荧光分子)。

2. 仪器的分辨率

分辨率是衡量仪器测量精度的指标，通常用变异系数 CV (Coefficient of Variation) 值来表示：

$$CV = d/m \times 100\% \quad (d \text{ 是分布的标准误差, } m \text{ 是分布的平均值})$$

如果一群含量完全相等样本，用 FCM 来测量，理想的情况下， $CV=0$ ，用 FCM 测量曲线表示为图一十六-a，但是在整个系统检测中，会带入许多误差，其中样本含量本身的误差，样本在流进照射光的微量变化，再加上仪器本身的误差等，实际得到的曲线为图一十六-b。

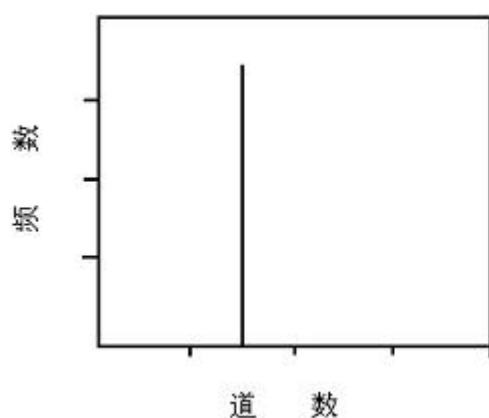


图 十六-a

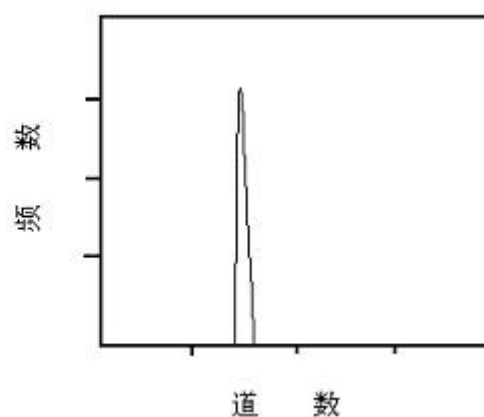


图 十六-b

CV 值越小则曲线分布越窄越集中，测量误差就越小，一般的 FCM 在最佳状态时 CV 值均 $<2\%$ 。

CV 值的计算除了采用以上的计算公式外，还可以用半高峰宽来计算，半高峰宽指在峰高一半的地方量得的峰宽，它与 CV 值有以下的关系：

$$CV = \text{半高峰宽} / m \times 0.4236 \times 100\%$$

上述公式是建立在正态分布的条件下，而实际情况所得测量数据分布常常是非对称图形，故采用半高峰宽所计算得到的 CV 值要明显小于前统计公式得到的 CV，在实际情况中应引起注意。

3. 前向角散射光检测灵敏度

前向角散射光检测灵敏度是指能够检测到的最小颗粒大小，一般目前商品化的 FCM 可以测量到 0.2-0.5 μ m 左右。

4. FCM 分析速度

分析速度以每秒可分析的细胞数来表示，当细胞流过光束的速度超过 FCM 仪器响应速度时，细胞产生的荧光信号就会被丢失，这段时间称为仪器的死时间(Dead time)。死时间越短，我们就说这台仪器处理数据越快，一般可达到 3000 个/秒-6000 个/秒左右，大型机已达到每秒几万个细胞。

5. FCM 分选指标

分选指标主要包括：分选速度、分选纯度及分选收获率。

分选速度指每秒可提取所要细胞的个数，目前台式带分选的仪器，它的分选速度约为 300 个/秒，大型机的流式细胞仪最高分选速度可达每秒上万个细胞。

分选纯度指被分选出细胞所占的百分比，一般台式机和大型机的分选纯度均可达到 99% 左右。

分选收获率指被分出细胞与原来溶液中该细胞的百分比。通常情况下，分选纯度和收获率是互相矛盾的，纯度提高，收获率降低，反之亦然。这是由于样品在液流中并不是等距离一个接着一个有序地排着队，而是随机的，因此，一旦两个不同细胞挨得很近时，在强调纯度和收获率不同条件下，仪器会作出取或舍的决定，因此，选择不同模式要视具体实验要求而定。

声明：

本文中引用了大量国内、国外的相关文献，因大部分出处不明，故在暂无法列出参考文献清单，并在此仅向本文中引用文献作者表示真诚的谢意，如有不妥之处请来电告知：