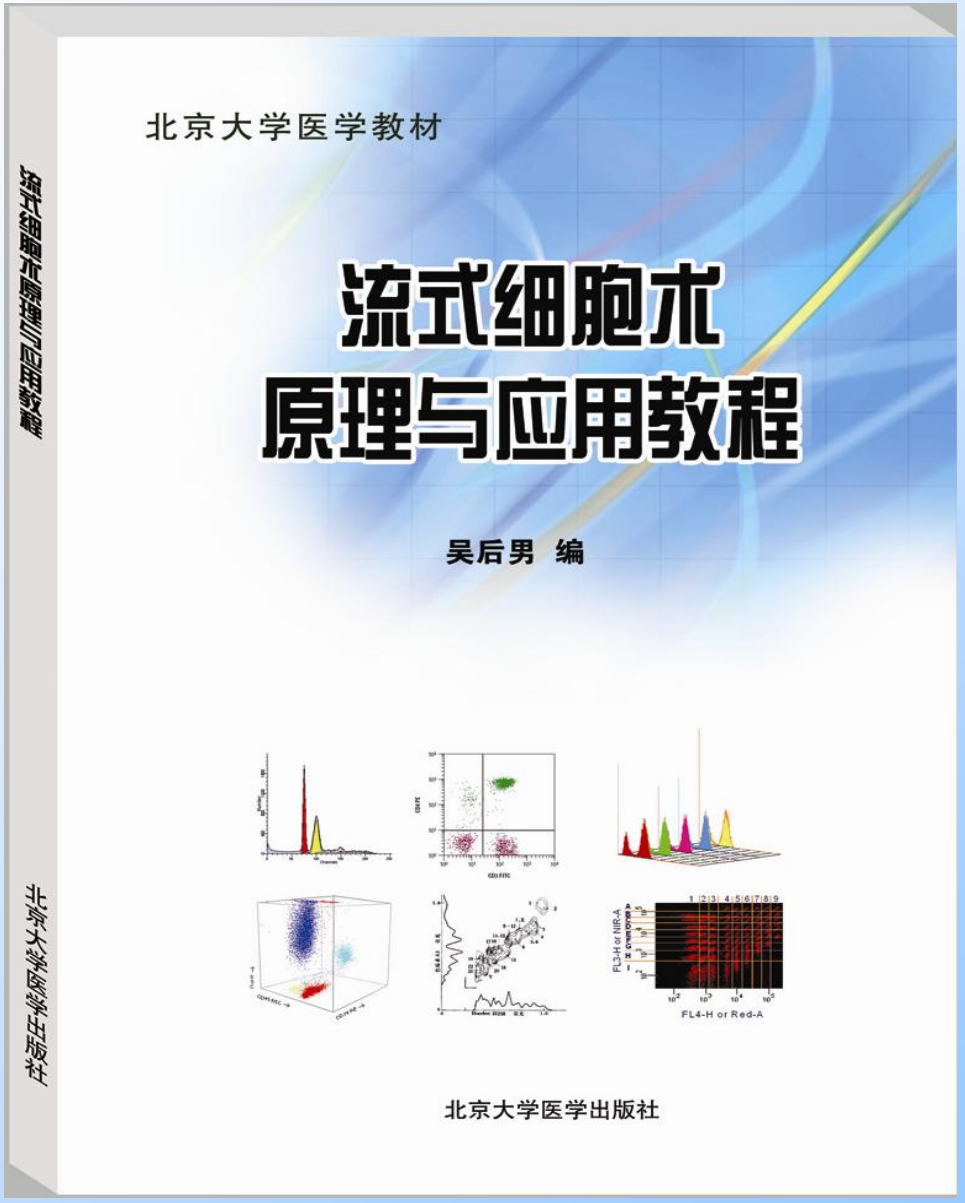
流 式 细 胞 术

苏　黎

北京大学医药卫生分析中心 细胞分析室
教学公用邮箱：**cell-2009@163.com** 密码：**82802389**
联　系　电　话：**82802437，82805034**

教学参考书

- **流式细胞术原理与应用教程**。吴后男编。北京大学医学出版社。2008.2
- **临床流式细胞分析。**王建中主编。上海科学技术出版社。2005.8
- **实用流式细胞术彩色图谱。**王书奎，周振英主编。上海第二军医大学出版社。2004.4
- **流式细胞术的原理和应用。**宋平根，李素文主编。北京师范大学出版社。1992.3
- **流式细胞术。**贾永蕊编。化学工业出版社。2009.3


北京大学医学教材
流式细胞术
原理与应用教程
吴后男 编
北京大学医学出版社
流式细胞术原理与应用教程
北京大学医学出版社

- 流式细胞仪的结构与原理
- 流式细胞术的数据获取与分析
- 流式细胞术的样本制备
- 流式细胞术的应用
- 流式分选原理及其应用
- 流式细胞术的优越性与展望

流式细胞仪的结构与原理

- **流式细胞术和流式细胞仪器简介**
- 流式细胞仪的结构
- 流式细胞术的信号检测原理

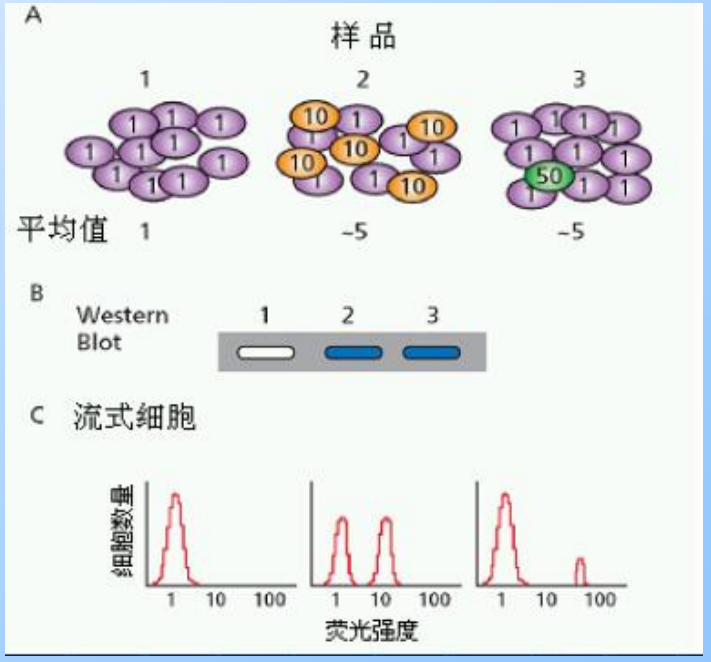
- 什么是流式细胞术

  - 流式细胞术（Flow Cytometry, 简称FCM）是 一种定量分析技术，是指利用流式细胞仪检测细胞内特异标记的荧光信号从而测定细胞的多种生化物质（如膜表面受体、抗原、离子或DNA/RNA表达等）特性的方法，同时也是一项可以把具有相同荧光信号特性的某些细胞亚群从多细胞群体中分离和富集出来的细胞分析技术。

  - 流式细胞仪（Flow Cytometer）：是一种集激光技术、电子物理技术、光电测量技术、电子计算机技术、细胞荧光化学技术、抗体技术为一体的新型高科技仪器。

流式细胞术的特点

- 分析对象：单细胞悬液或生物颗粒
- 分析速度：快速，最高达上万个细胞/秒
- 检测参数：多参数（两个散射光参数、多个荧光参数）
- 可同时测定多种可溶性细胞成分：流式微球芯片技术（Cytometric Beads Array,CBA）
- 检测结果：精度高、准确性好
- 先进的细胞定量技术

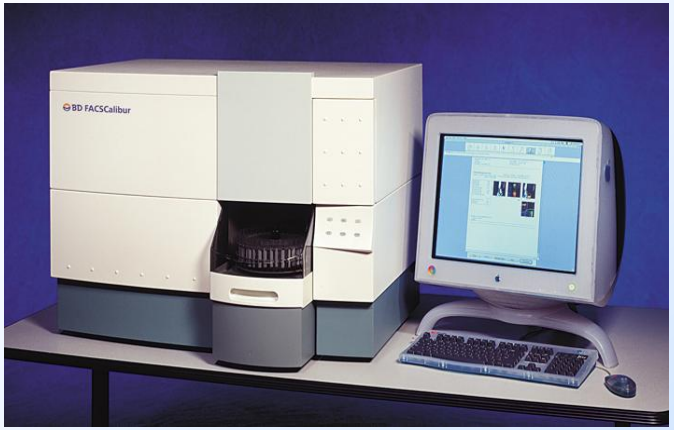


- 流式细胞仪的发展及商品化
  - 1970年：Phywe研制脉冲细胞光度计，备有荧光镜的FCM，DNA定量；同年Kamensky发明白细胞分类流式细胞仪，激光光源，吖啶橙染色，测定淋巴、单核、中性粒C
  - 1972年：Len Herzenberg等在斯坦福大学研制荧光激活细胞分选仪（FACS），氩离子激光，标志着流式细胞仪商品化时代到来
  - 1973年：Becton Dikinson (BD)公司投入市场，第一台 FACS-Ⅰ问世，其后20多年来不断改进完善产品，先后推出FACSAnalyzer、FACScan、FACSCalibur、FACSLSR-Ⅱ、FACSVantage、FACSDiva、FACSAria等
  - 1975年：Coulter公司TPS-1问世，可做双参数分析，随后不断推出各种型号仪器，EPICS –C、EPICS-Profile、EPICS-ELITE等
  - 1994年：美国Cytomation公司推出高性能、高速分选装置MoFlo，该机以出色的性能和创新设计理念，一经推出即受到广泛关注
  - 2008年，美国BD公司推出Influx，在MoFlo基础上实现了原位、立体分选

- 流式细胞仪的分类

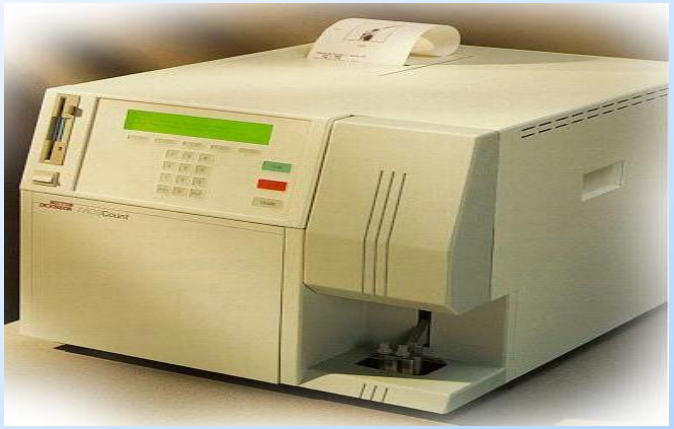
  - **临床型：**光路调节系统固定，自动化程度高，操作简便，易掌握， 适用于临床常规测试
  - **科研型：**分辨率高，选配多种波长和类型激光器，可将感兴趣细胞分选到特定培养孔或板 上，适用于科研

BD公司的流式细胞分析仪



FACS Calibur

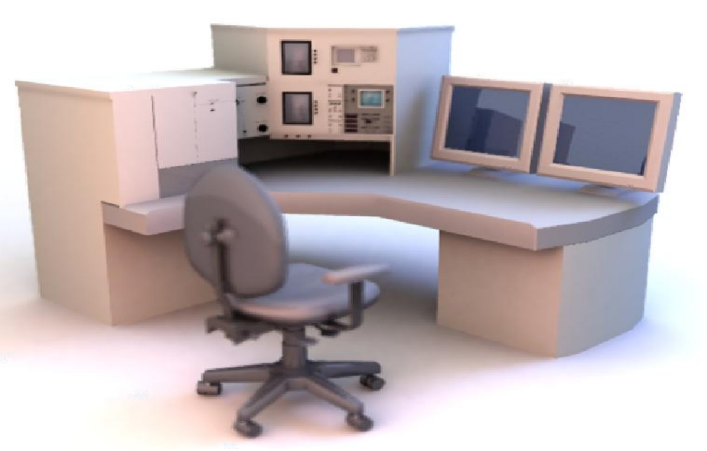
FACS Canto



FACS Count

LSRII

BD公司的流式细胞分选仪



FACSVantage & Diva

FACS Aria™ Ⅱ

Influx™

Beckman公司的流式细胞分析仪

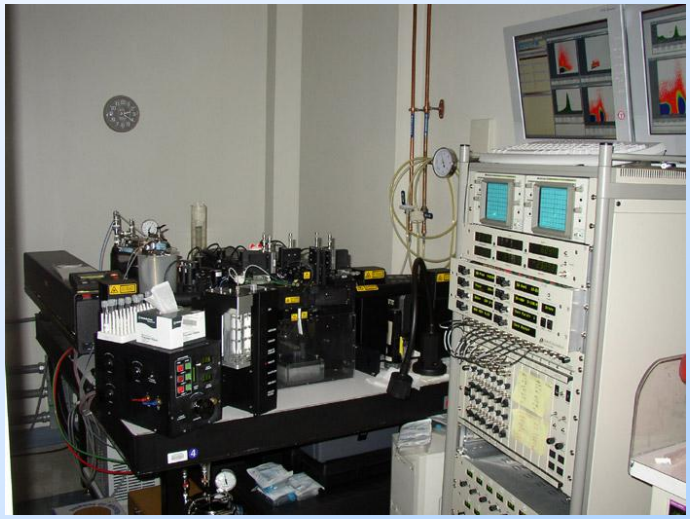
EPICS XL/XL-MCL

CytomicsTM FC 500

CyAn ADP

Beckman公司的流式细胞分选仪

EPICS Altra



MoFlow Ⅰ

MoFlow XDP II

细胞室流式仪介绍

FACS Calibur

FACS LSR

FACS Vantage SE

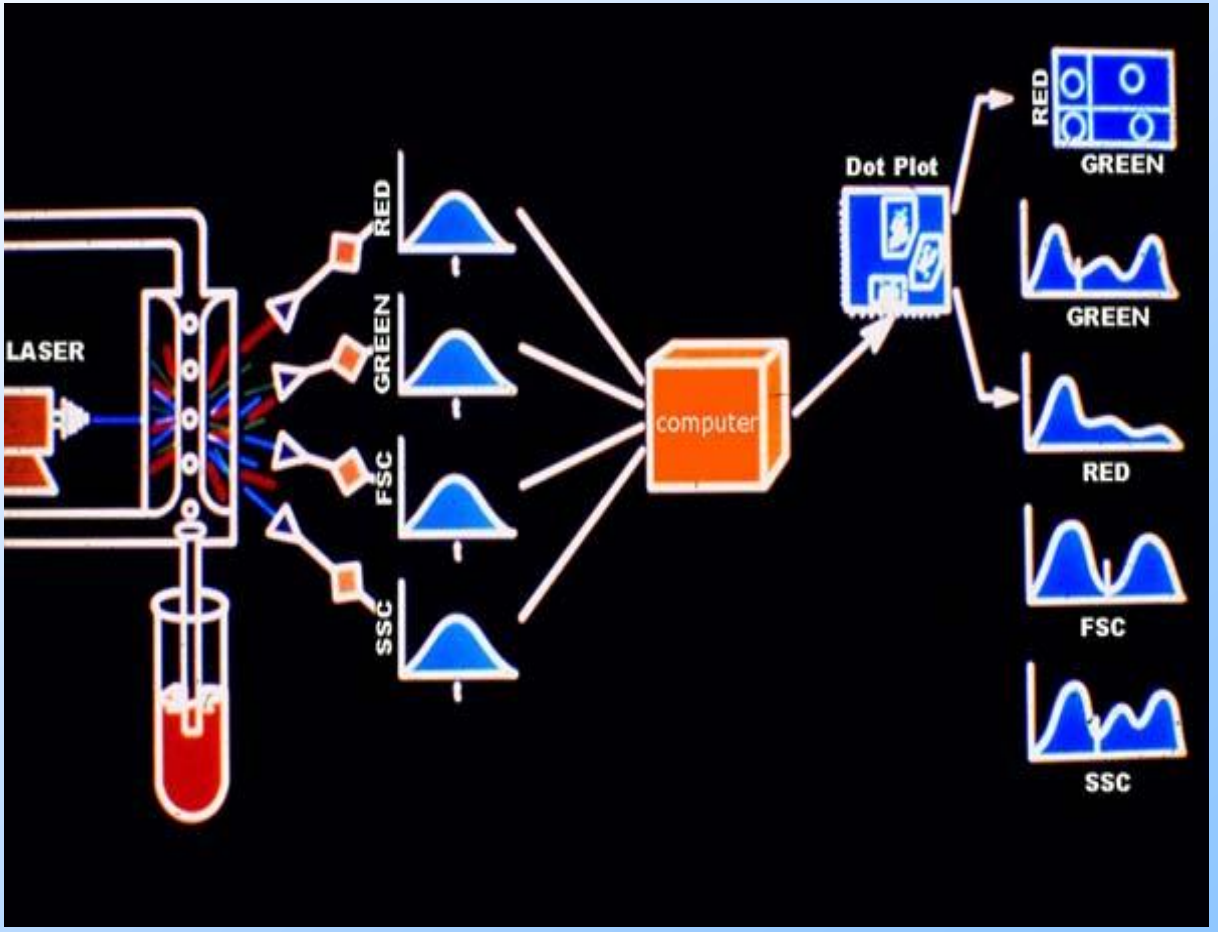
FACS Aria

流式细胞仪的结构与原理

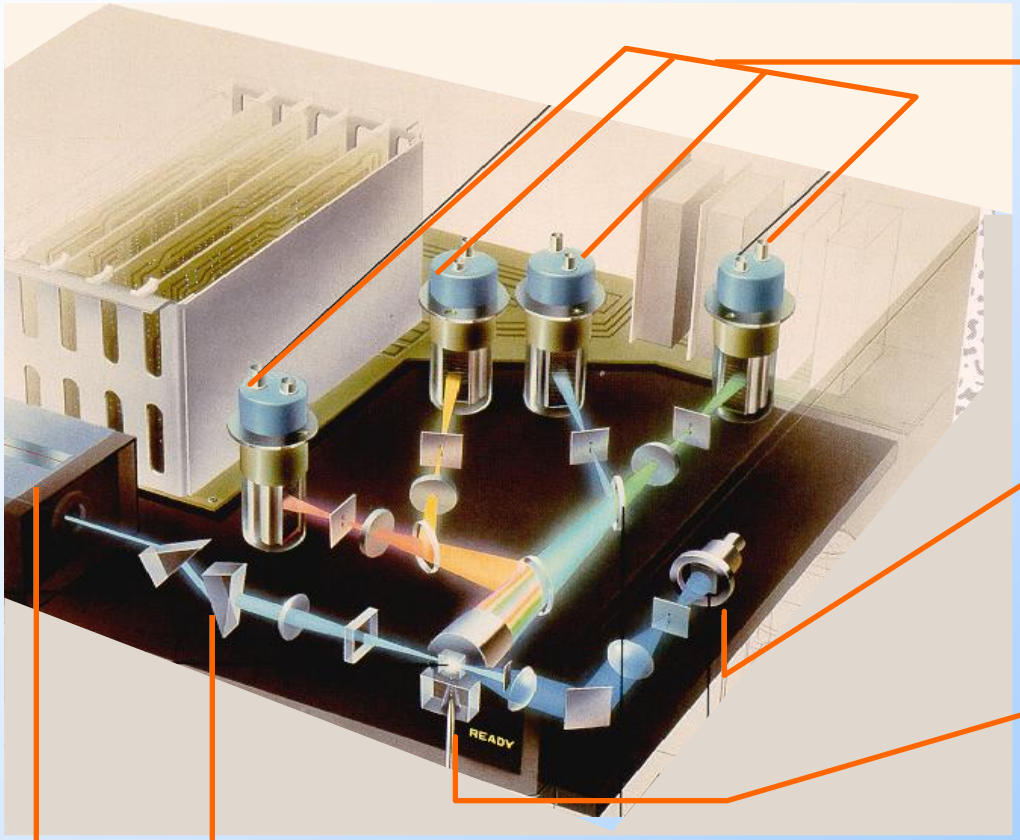
- 流式细胞术和流式细胞仪简介
- **流式细胞仪的结构**
- 流式细胞术的信号检测原理

- 流式细胞仪内部结构

➢ 光学系统
  激光光源
  光收集系统
➢ 液流系统
  流动室
  液流驱动系统
➢ 电子系统
  光电转换器
  数据处理系统
➢ 细胞分选系统
  喷嘴
  电偏转板
  样品收集器



单激光光路结构图



荧光和SSC散射光收集器（PMT）

FSC散射光收集器

流动室

高强度激光束形成棱镜

氩离子激光

➢ 光学系统

◆ 激发光源

⅄ 种类

弧光灯：

氙灯、高压汞灯：价廉，激发光谱广（优点）；

单一谱线上能量弱、功率不稳定（局限性）

激光器：

气体激光器：氩离子（488nm、355nm）、氦氖（633nm）、氪离子（647nm）、氪氩（568nm）

染料激光器：如氩离子激光泵浦的Rhodamin 6G水溶液染料激光器，发出550-650nm可变波长激发光

半导体激光器：价格低、结构简单、寿命长。BD的FACS Calibur已采用635nm半导体激光器

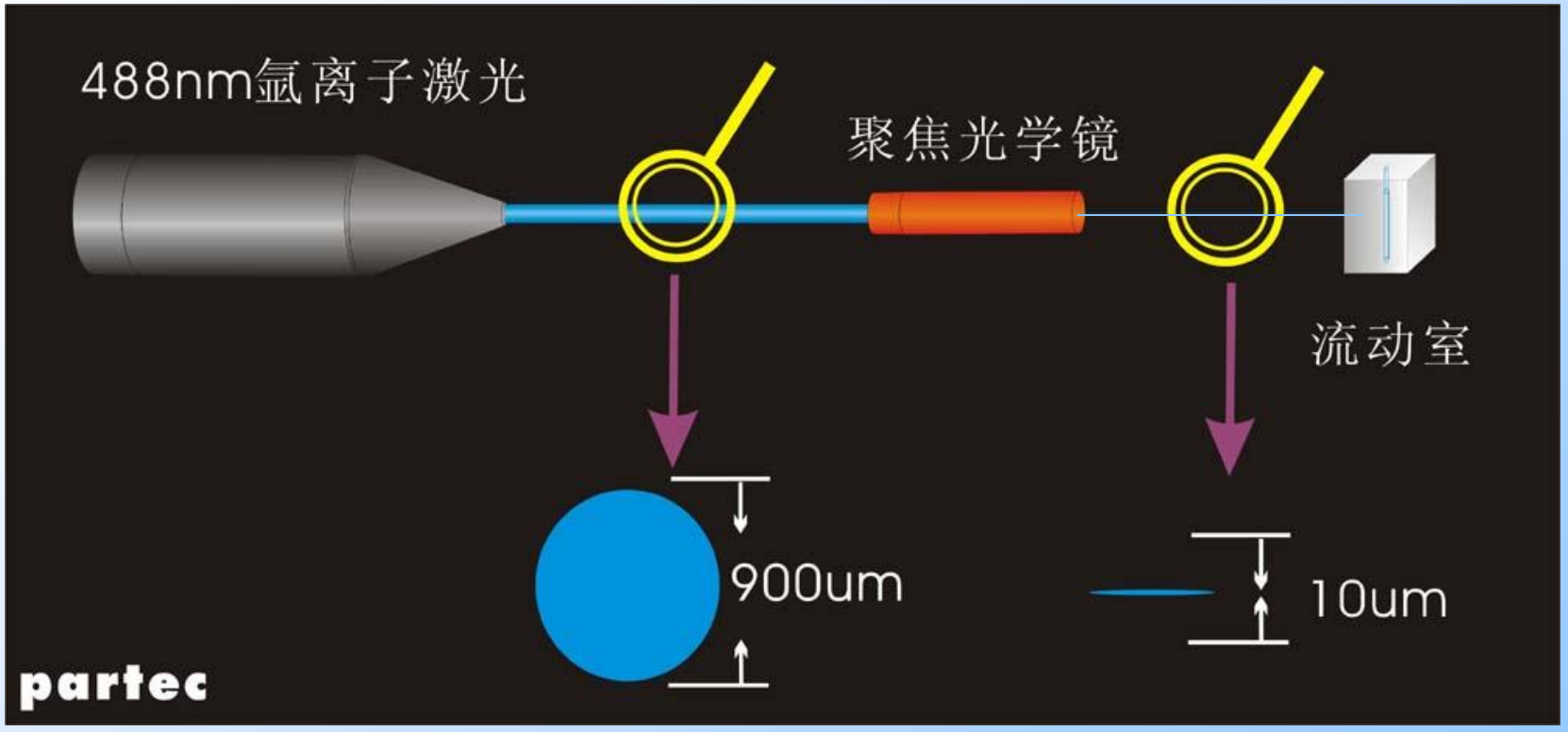
- **激光特点**：相干光源、单波长、高能量、小发散角、高稳定性光照
- **目前主流产品标准配置：**

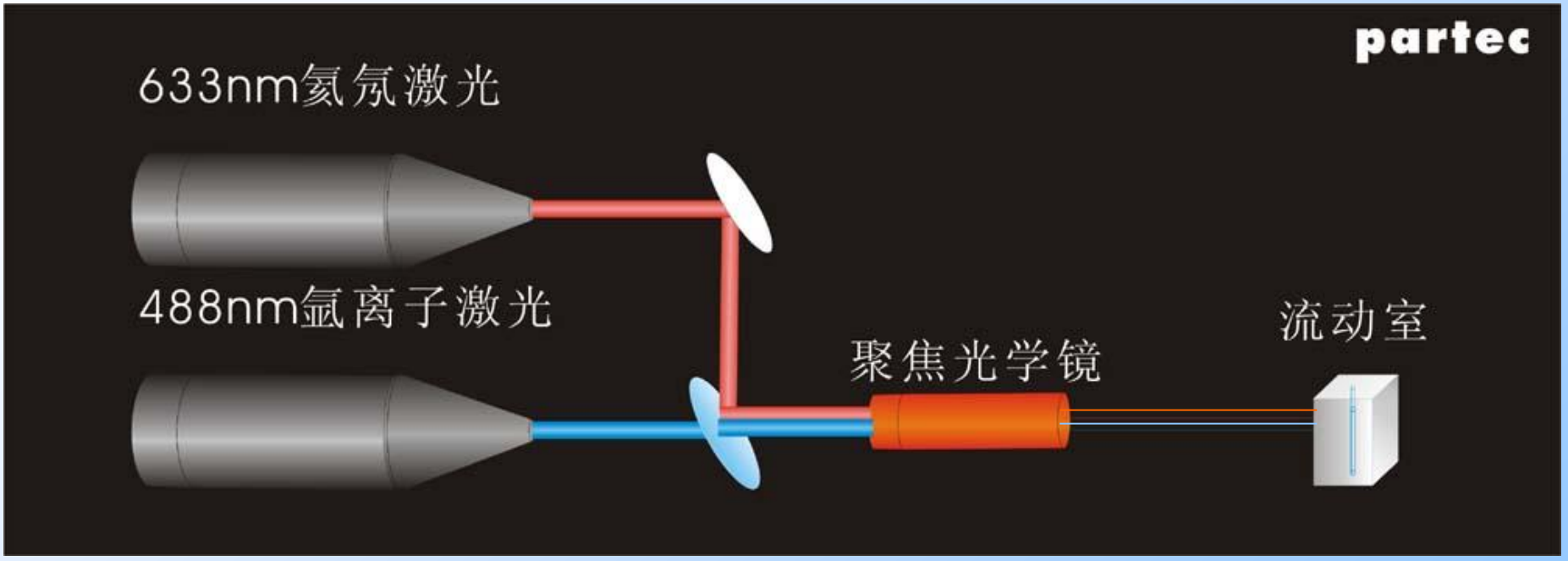
  采用氩离子或氦氖激光器

  仪器选配2-4根激光

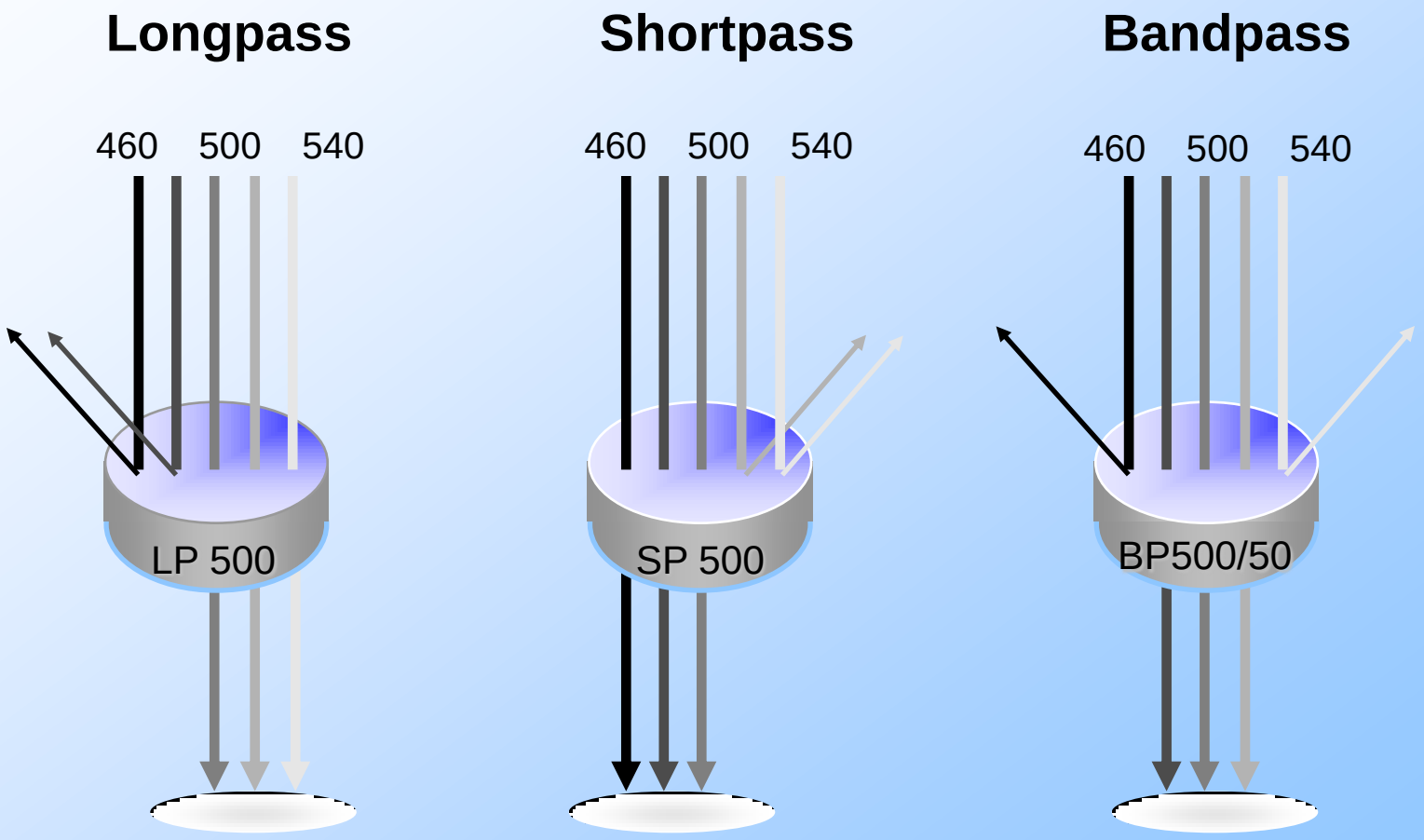
  波长多为488nm 、633nm和 355nm、407nmUV

  最多检测13个荧光参数


488nm氩离子激光
聚焦光学镜
流动室
900um
10um
partec

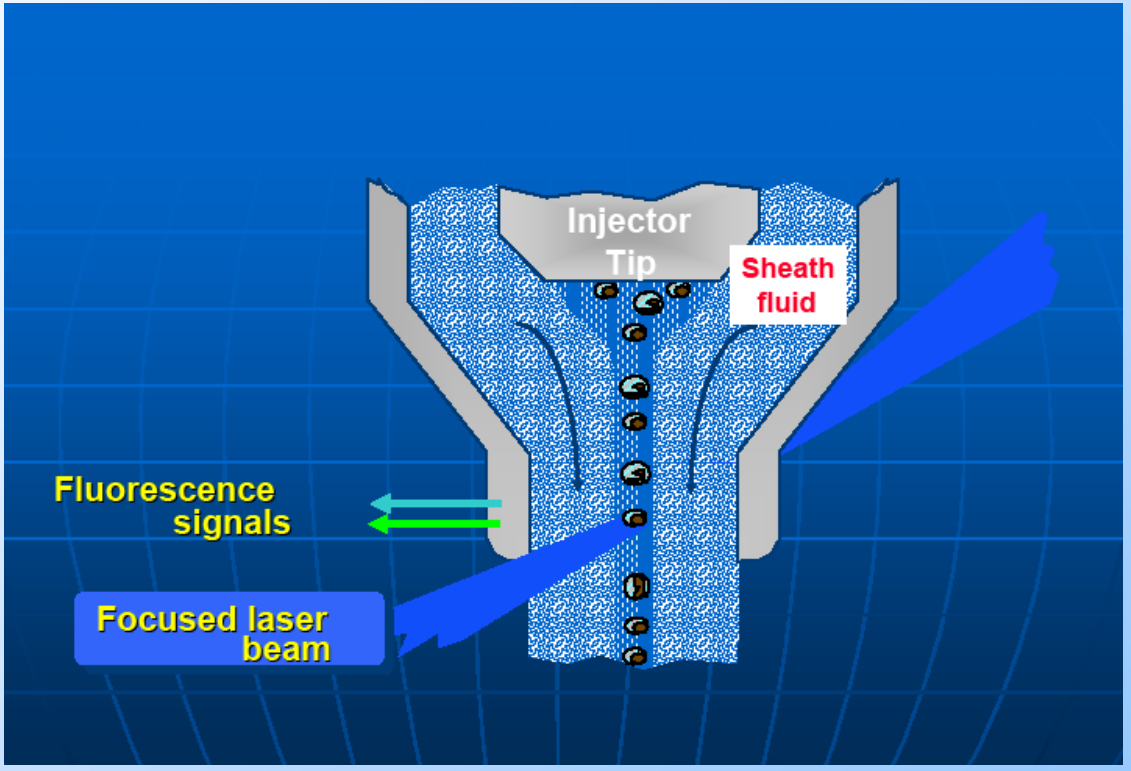

partec
633nm氦氖激光
488nm氩离子激光
聚焦光学镜
流动室

◆ 光收集系统：滤光片

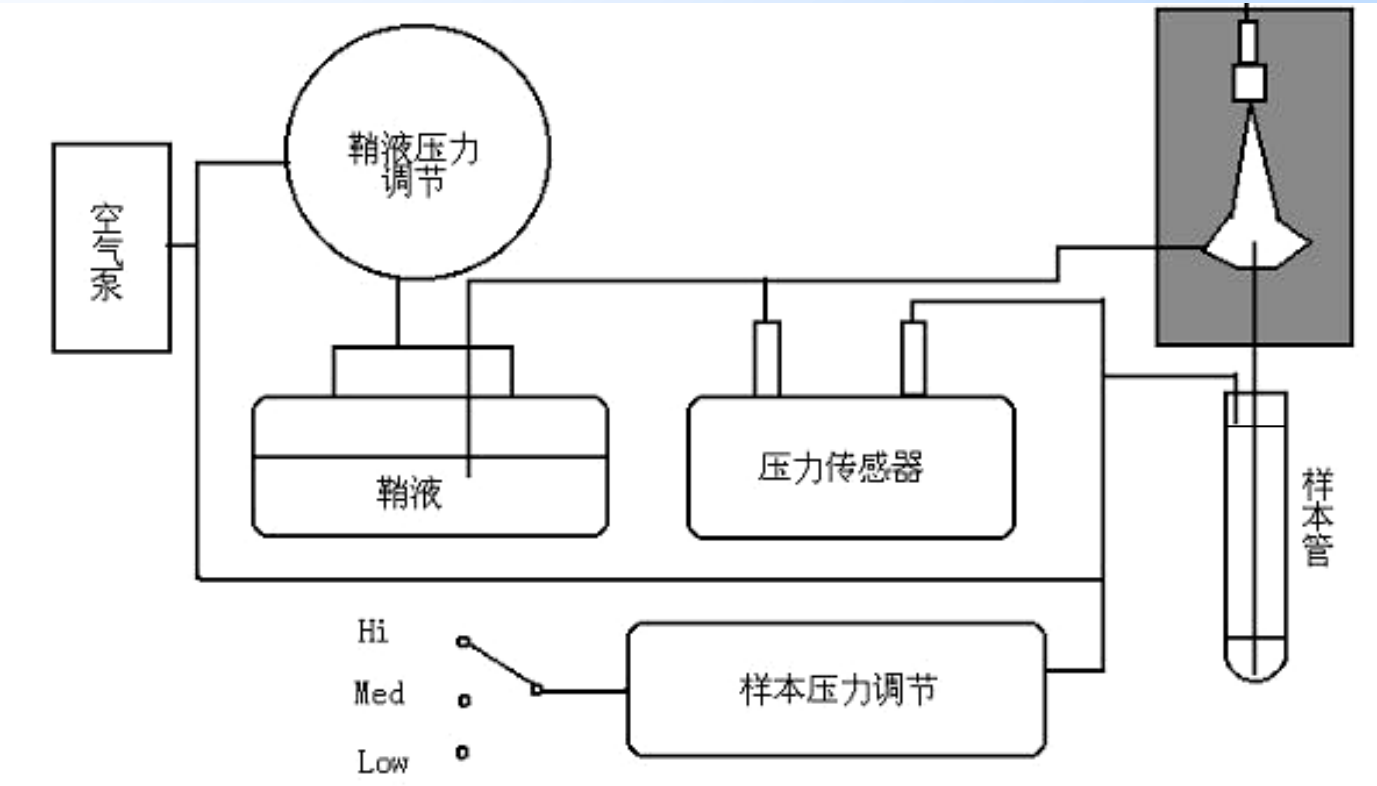

Longpass
460
500
540
LP 500
Shortpass
460
500
540
SP 500
Bandpass
460
500
540
BP500/50

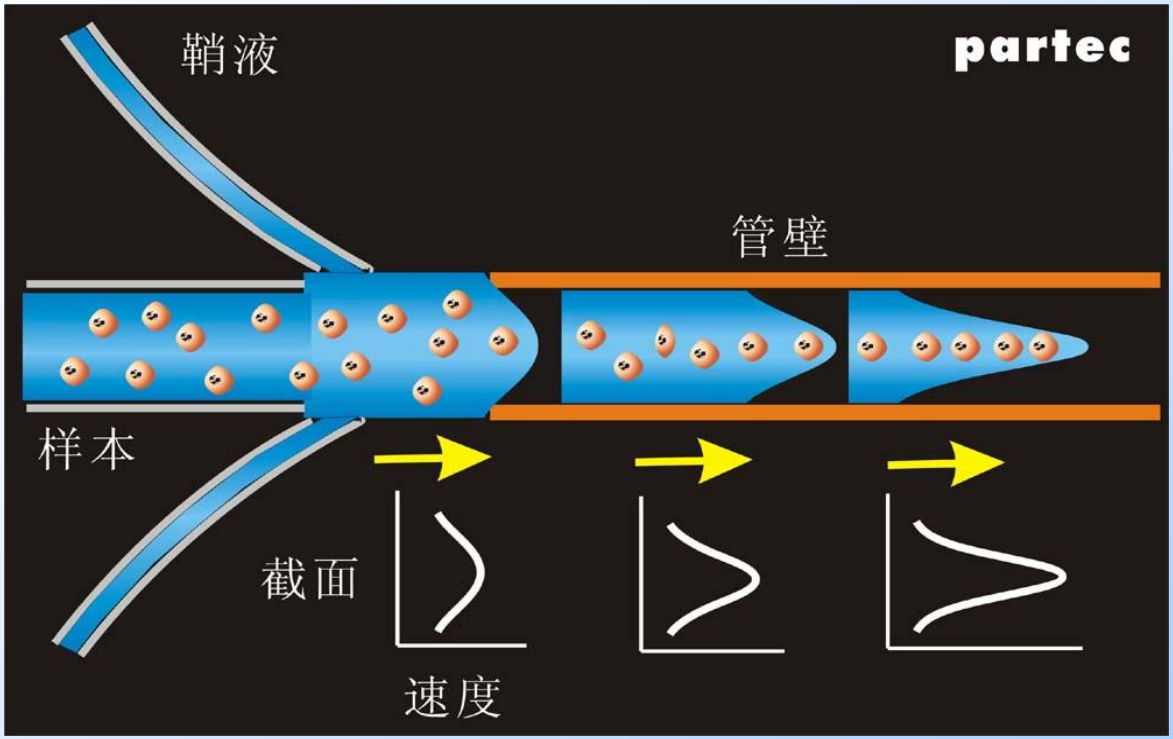
➢ 液流系统

- ◆ 流动室：仪器核心部件，被测样品在此与激光相交
- ◆ 液流驱动系统（压力泵）：空气泵+压力传感器

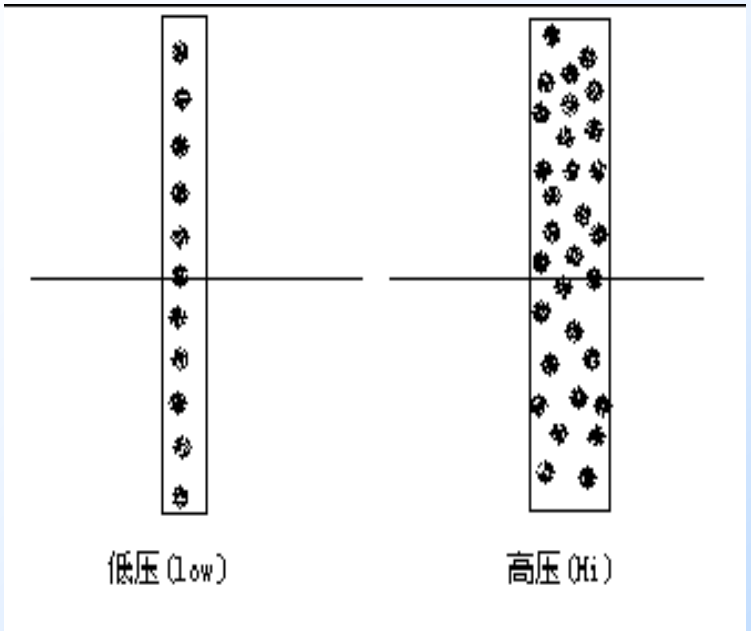


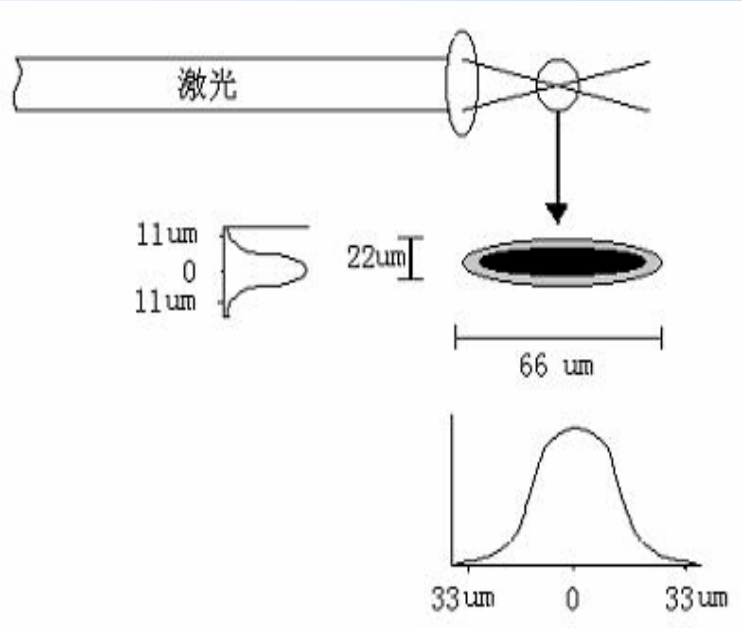
流动室与液流驱动系统模拟图





▲入管道前，边缘与中心速度一致。
▲入管道后，受管壁粘性阻力边缘速度下降，中心速度不变
▲大约管道50倍直径处，稳定层流形成，产生流体聚焦效应
▲液流中心由单列匀速运动颗粒组成的液柱。

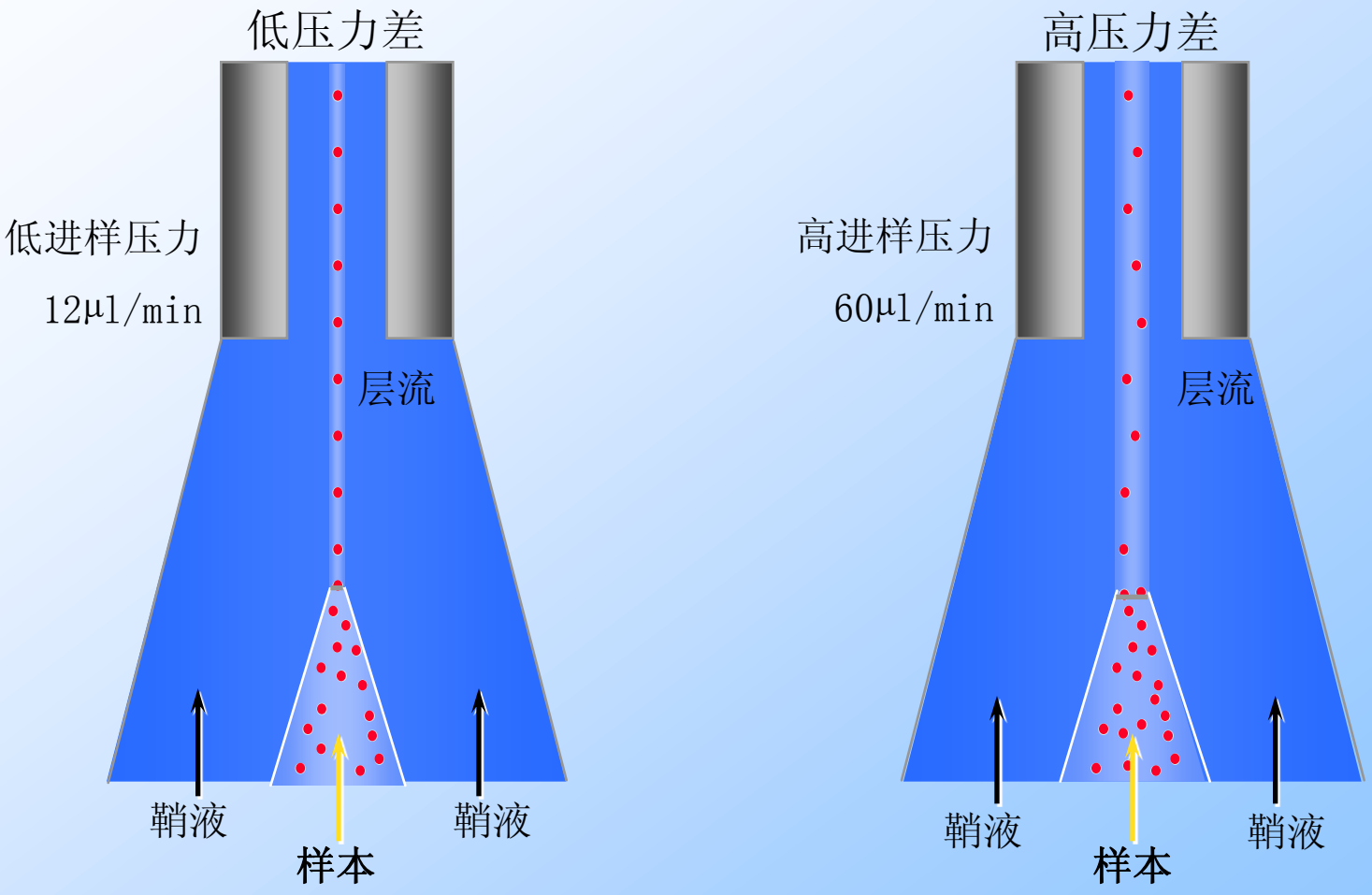




整个系统运行中流速不变，可改变进样速率开关，提高采样速度

上图所示：改变样品的检测速度会影响细胞向上移动的样本流的直径大小。高速时样本流变宽，细胞间距缩短，单位时间内流经照射区细胞数增加。因激光焦点处能量分布为正态分布，中心处能量最高，高速（Hi）时细胞可偏离中轴、不同位置细胞受激光照射能量不同，被激发的荧光强度也不同，造成测量误差。当检测分辨率要求高的实验应选择Low，如DNA分析。

流体的聚焦



➢ 电子系统

◆ 光电转换系统

前置放大电路：输出脉冲信号

光电转换器：将光信号转换为电信号

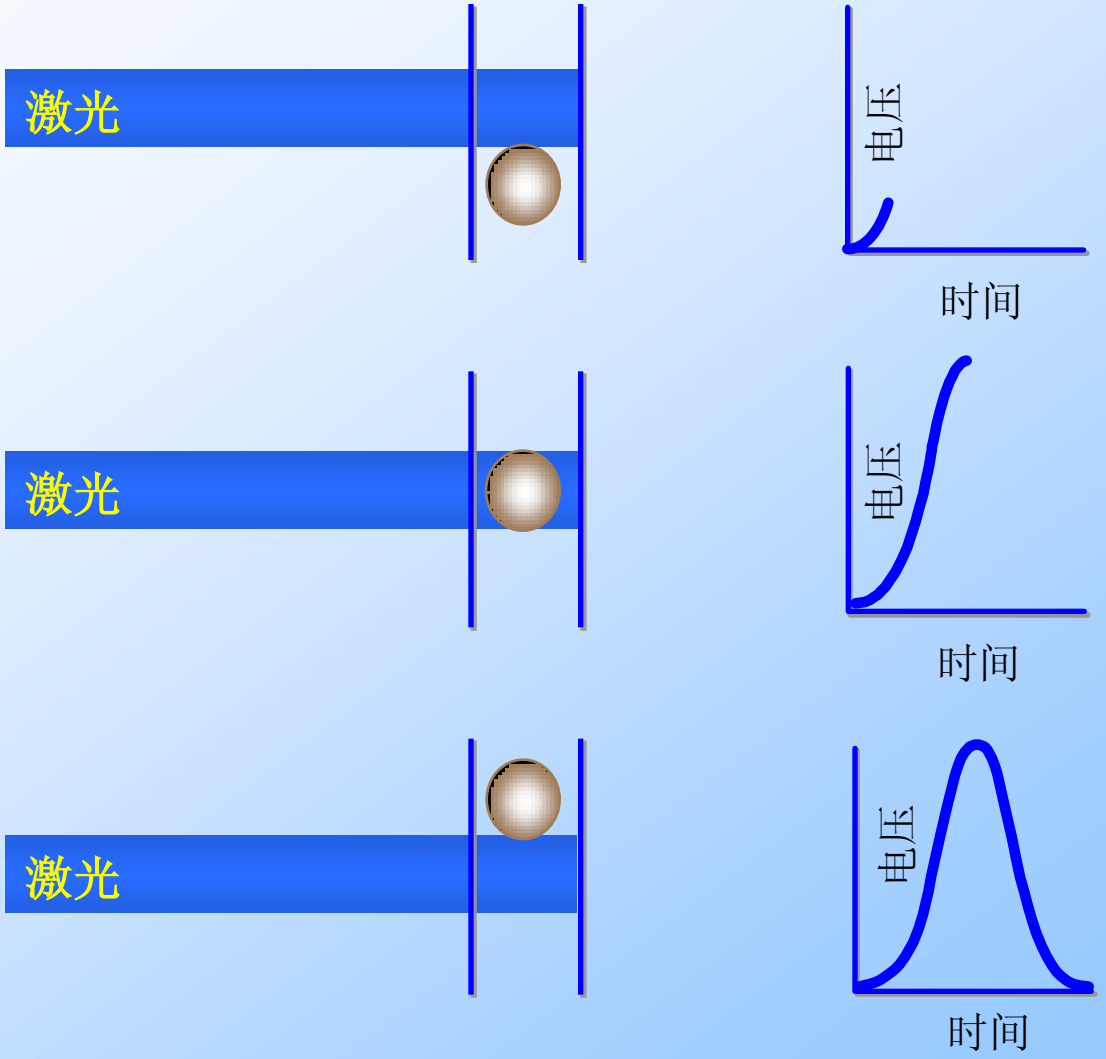
光电二极管：光灵敏度低，测定强信号（FSC）

光电倍增管（PMT）：放大电信号,光灵敏度高，测定弱信号（SSC、FL1、FL2、FL3、FL4）

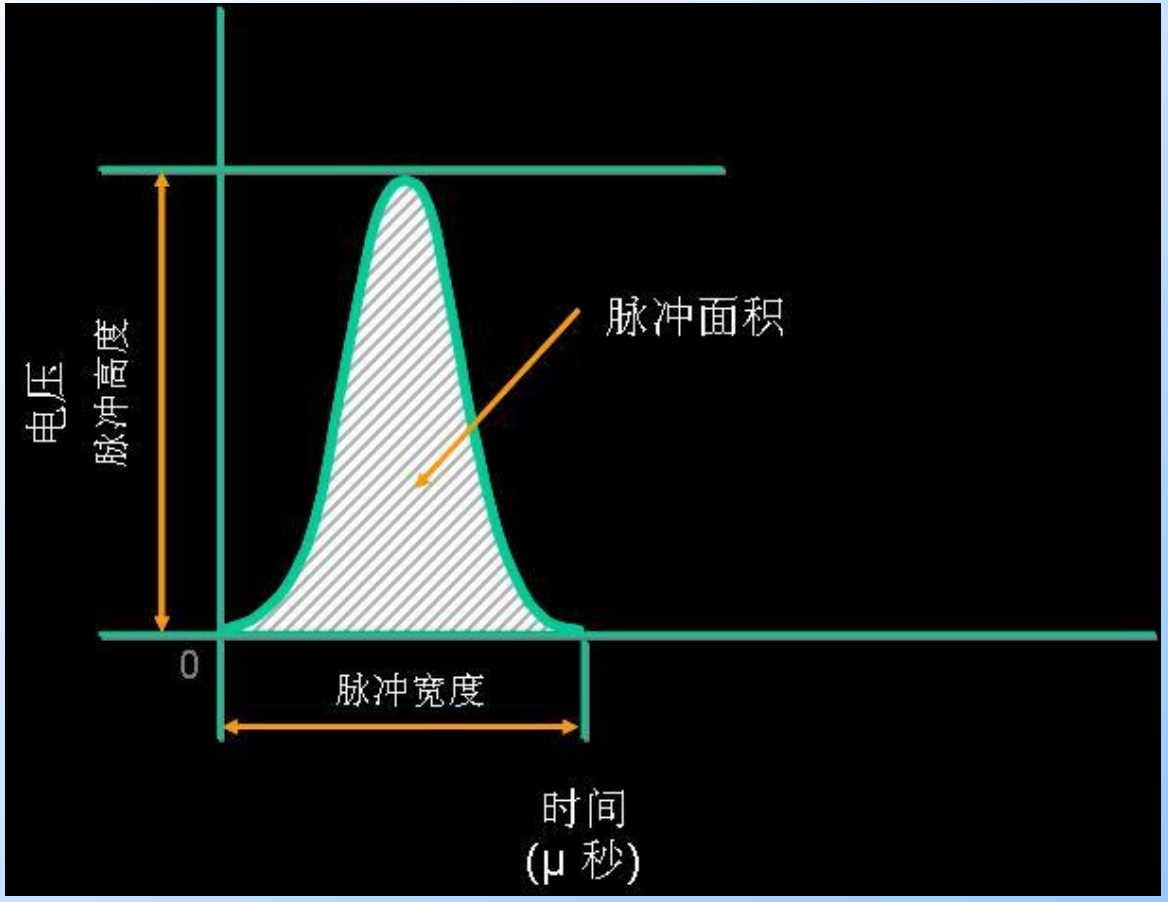
模数转换电路：将模拟的峰值转换为数字信号

◆ 数据处理系统：计算机系统数据采集、分析

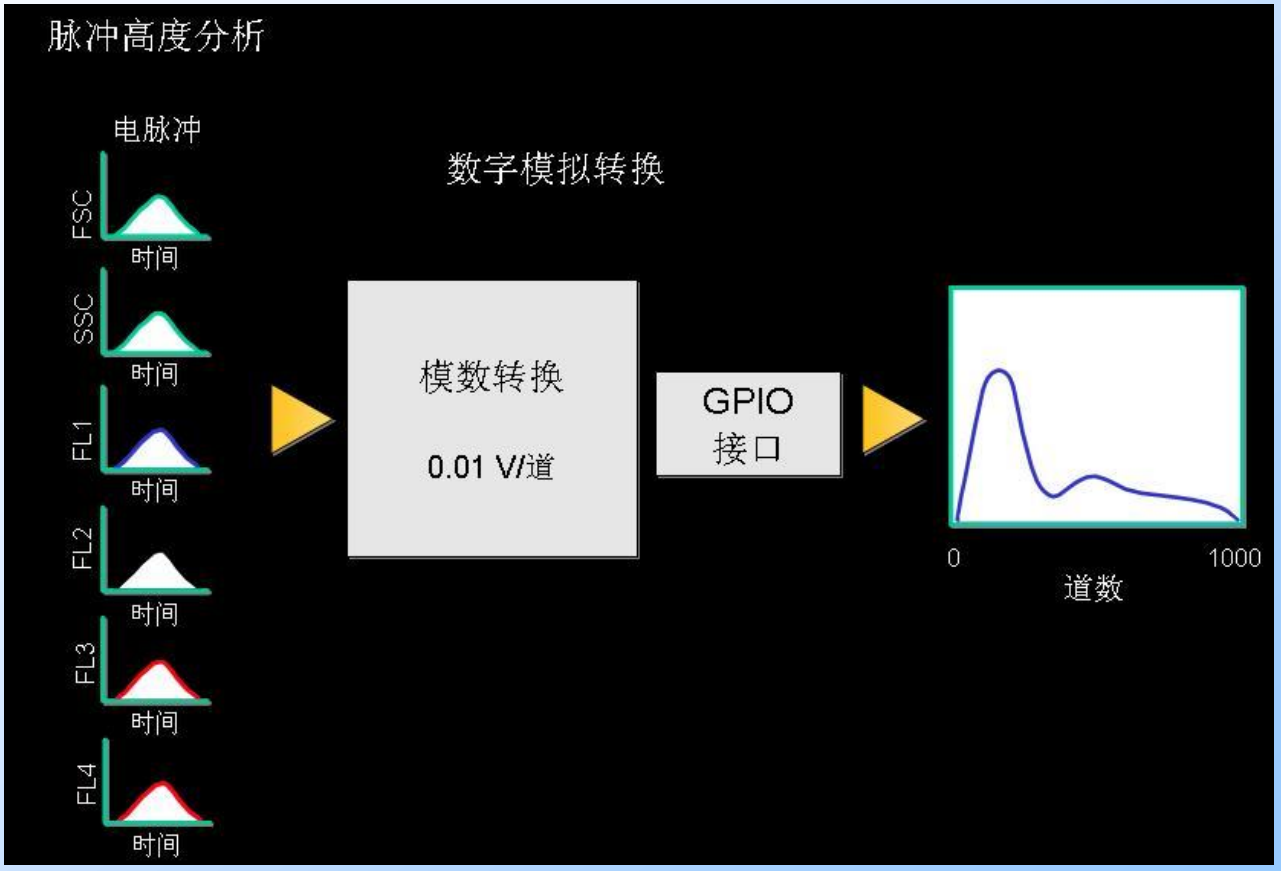
PMT 信号



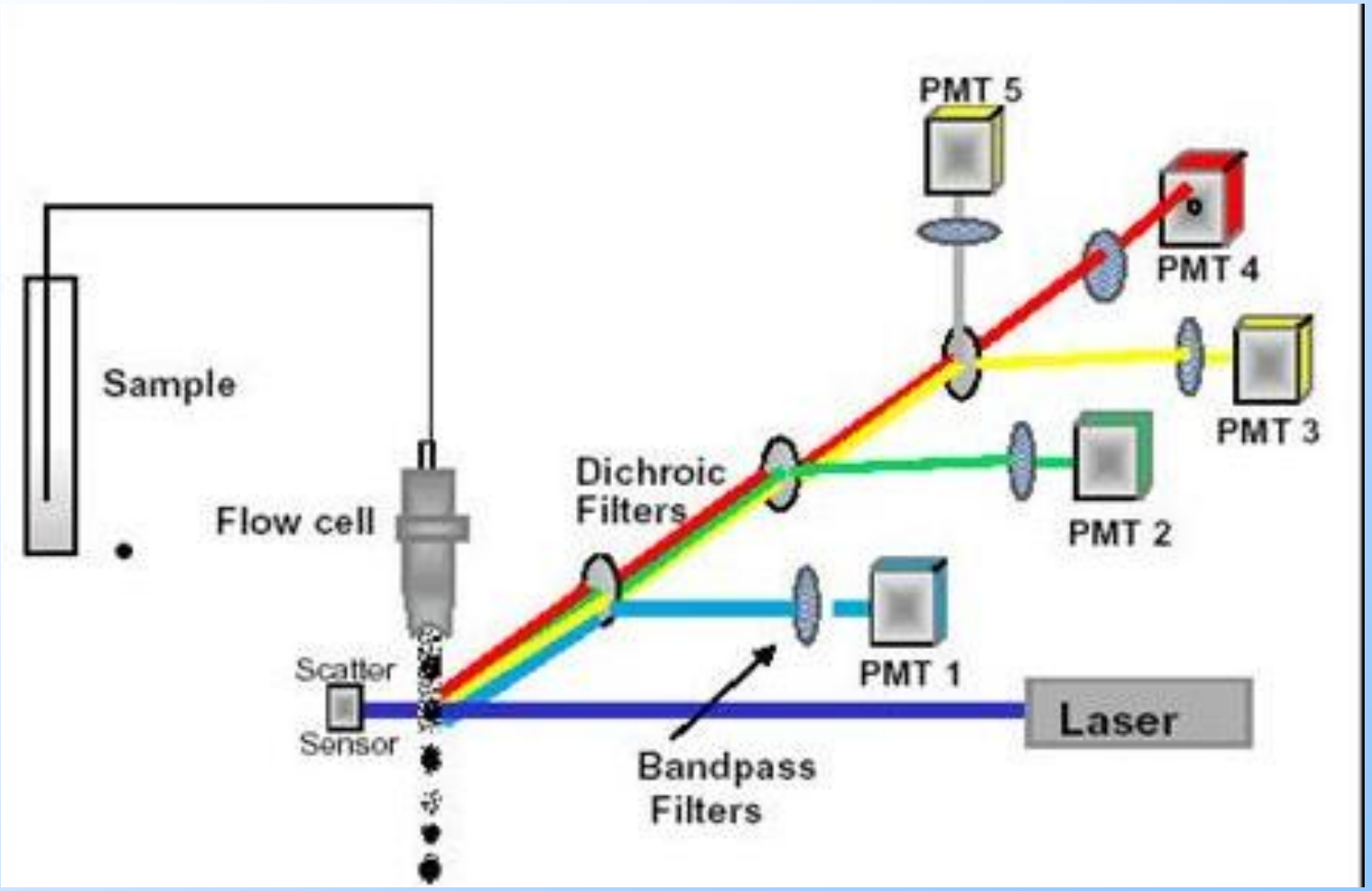
电脉冲定量



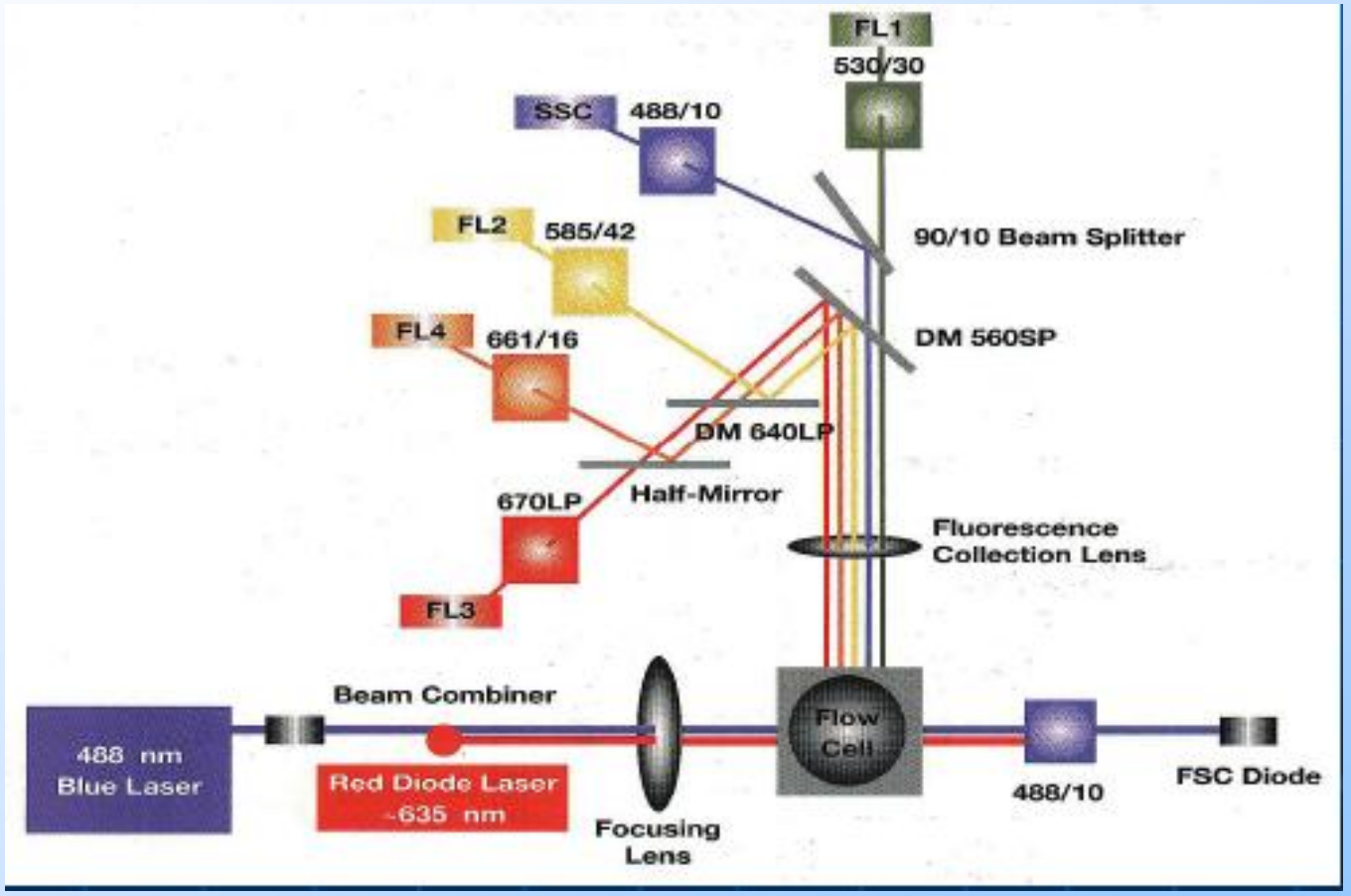
脉冲高度分析和数字转换



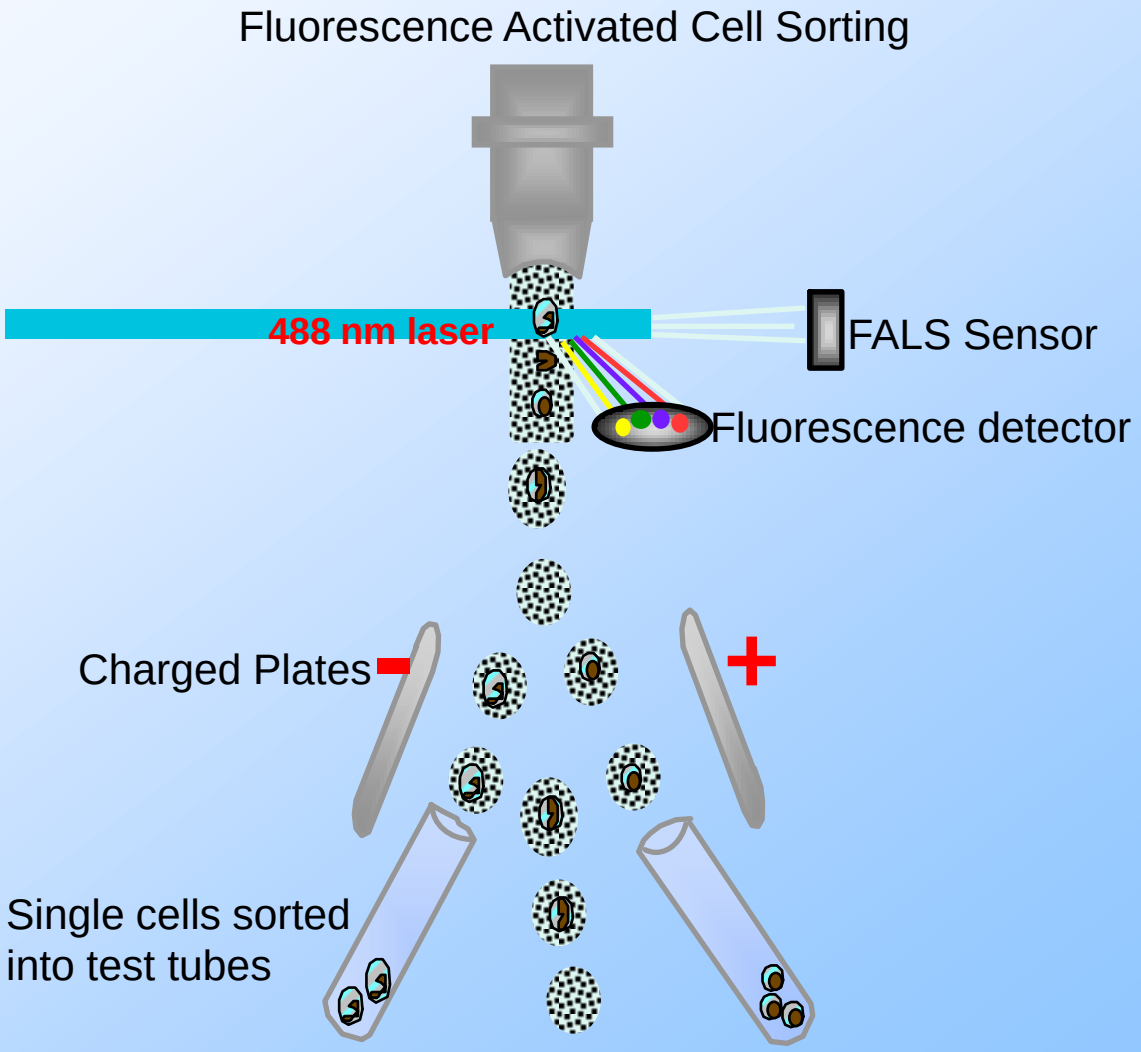
流式细胞分析仪

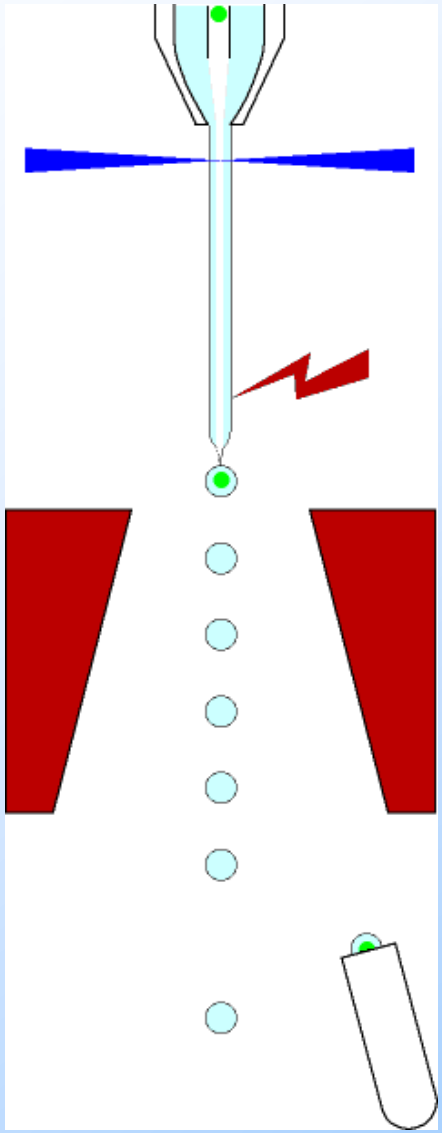

PMT 5
PMT 4
PMT 3
PMT 2
PMT 1
Sample
Flow cell
Dichroic
Filters
Scatter
Sensor
Laser
Bandpass
Filters

BD FACS Calibur (双激光四色）

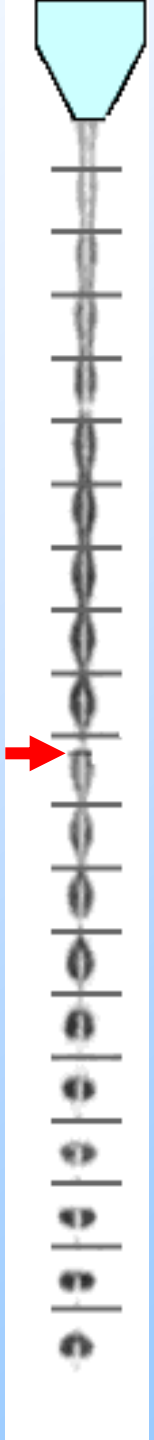


- 细胞分选系统
  - 通道式分选
  - 电荷式分选





充电



电荷式分选原理

流式细胞仪的结构与原理

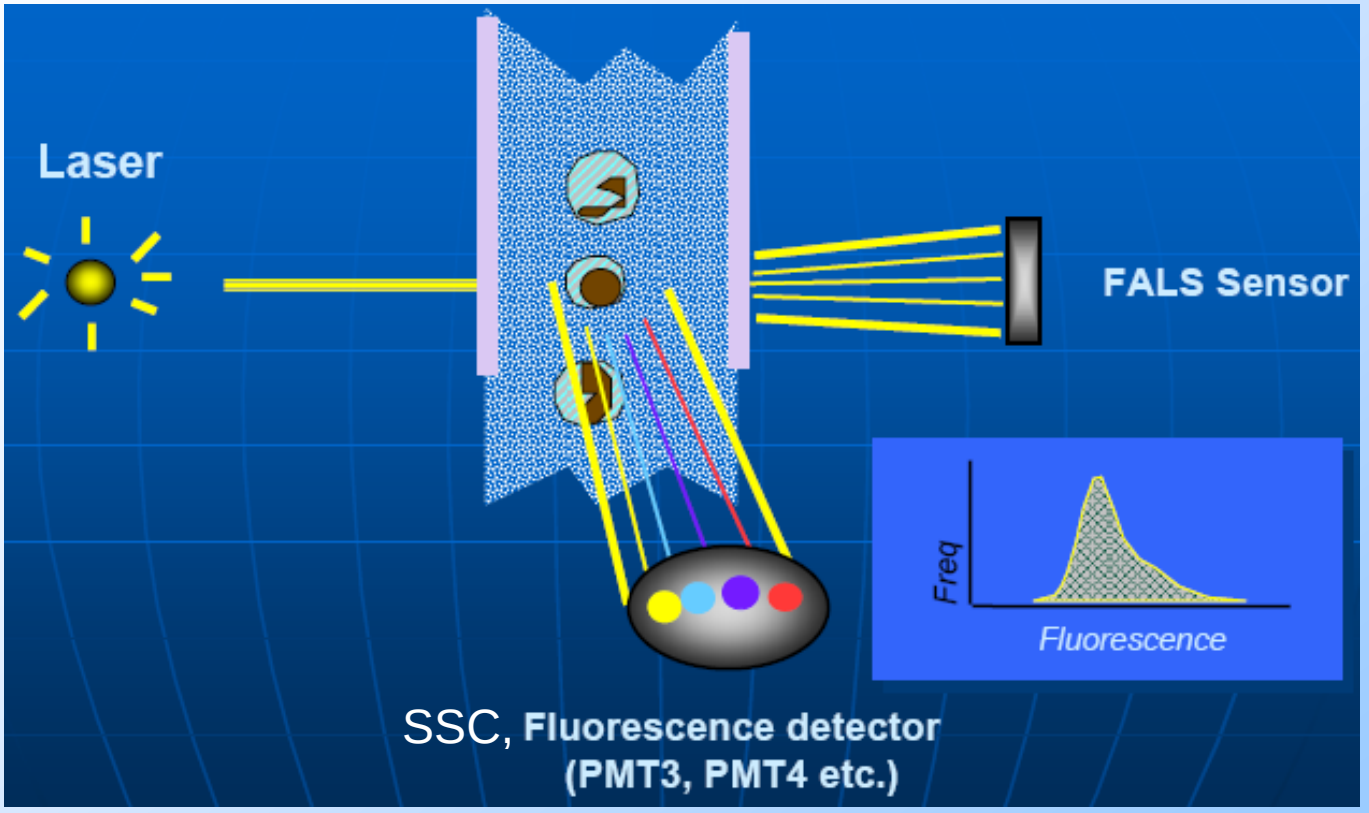
- 流式细胞术和流式细胞仪简介
- 流式细胞仪的结构
- **流式细胞术的信号检测原理**

流式细胞术的信号检测原理

- 流式细胞仪检测信号的机理
- 常用的荧光染料
- 如何减少检测信号中的荧光交叉
- 如何选择荧光抗体

◆ 流式细胞仪检测信号的类型

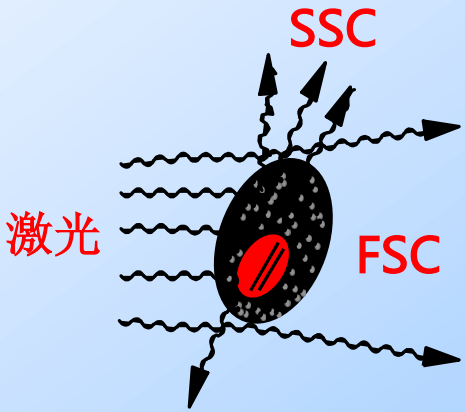
- 散射光信号（FSC、SSC）
- 荧光信号：自发荧光、特异荧光

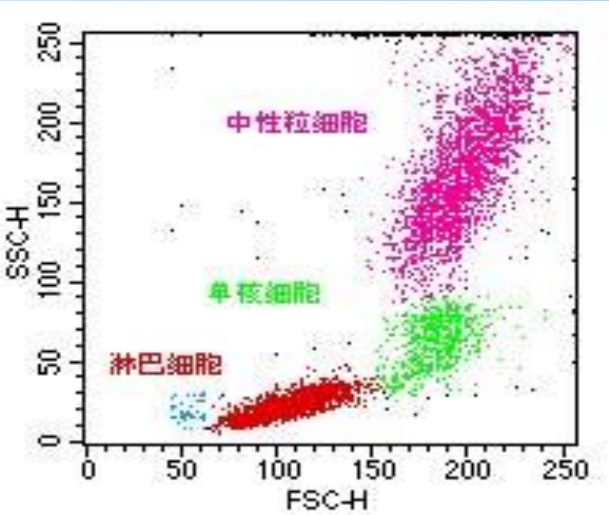

Laser
FALS Sensor
Freq
Fluorescence
SSC, Fluorescence detector
(PMT3, PMT4 etc.)

◆ 散射光信号

▲ **FSC**（小角散射光**1~6°**） **与细胞大小有关**

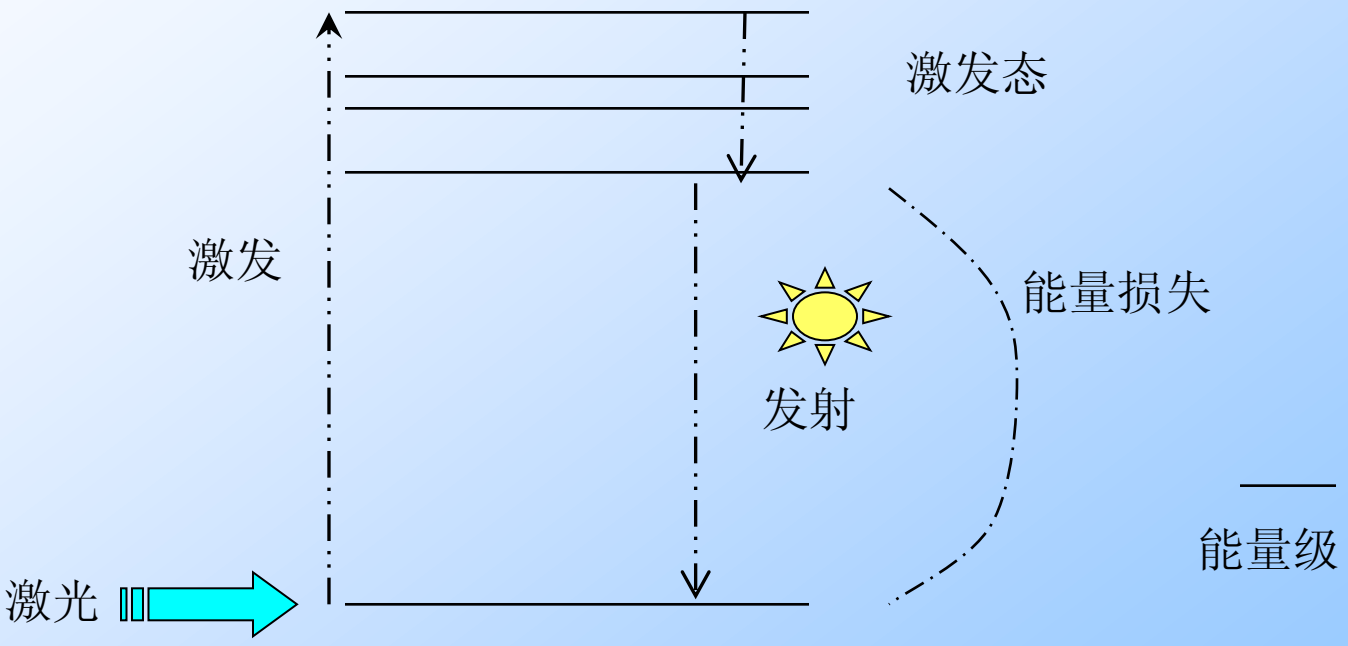
▲ **SSC**（90° 角散射光）**与细胞精细结构和颗粒性质有关，对胞膜、胞质、核膜变化更敏感**





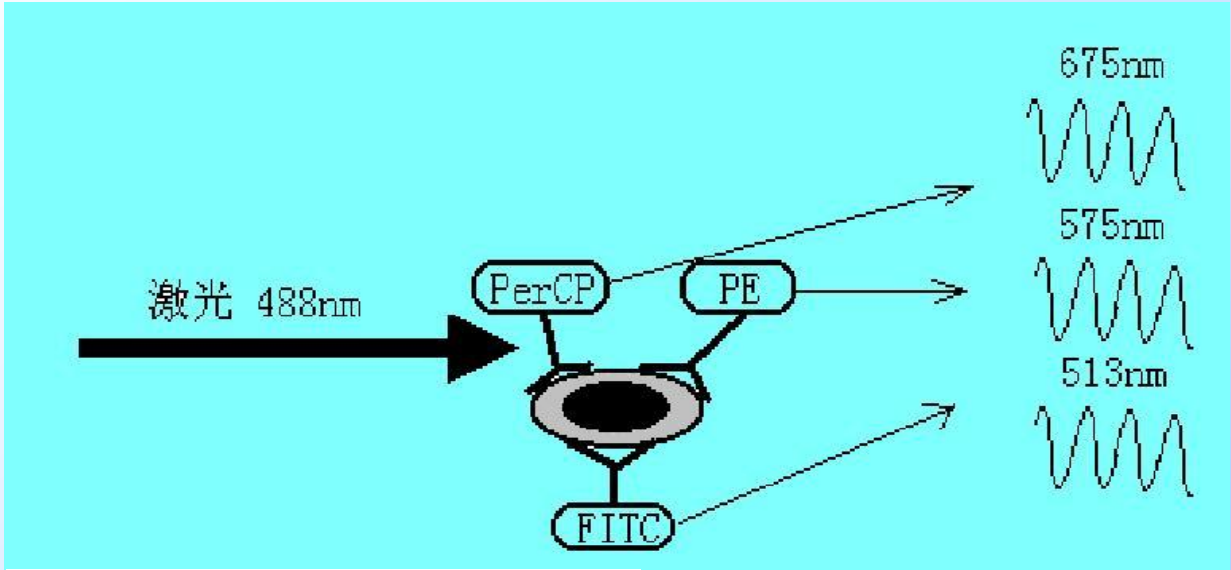
荧光信号

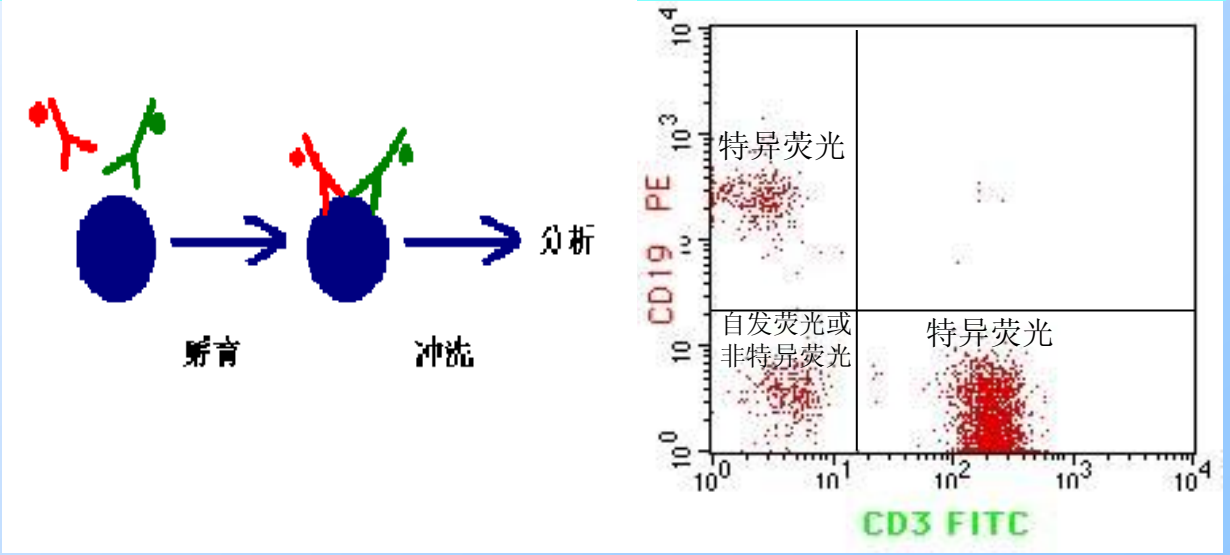
荧光激发及发射原理



特点：荧光方向与SSC相同，SSC的波长与激发光波长相同，荧光波长比激发光波长要长（双色反射镜和带通滤光片将二者分开）

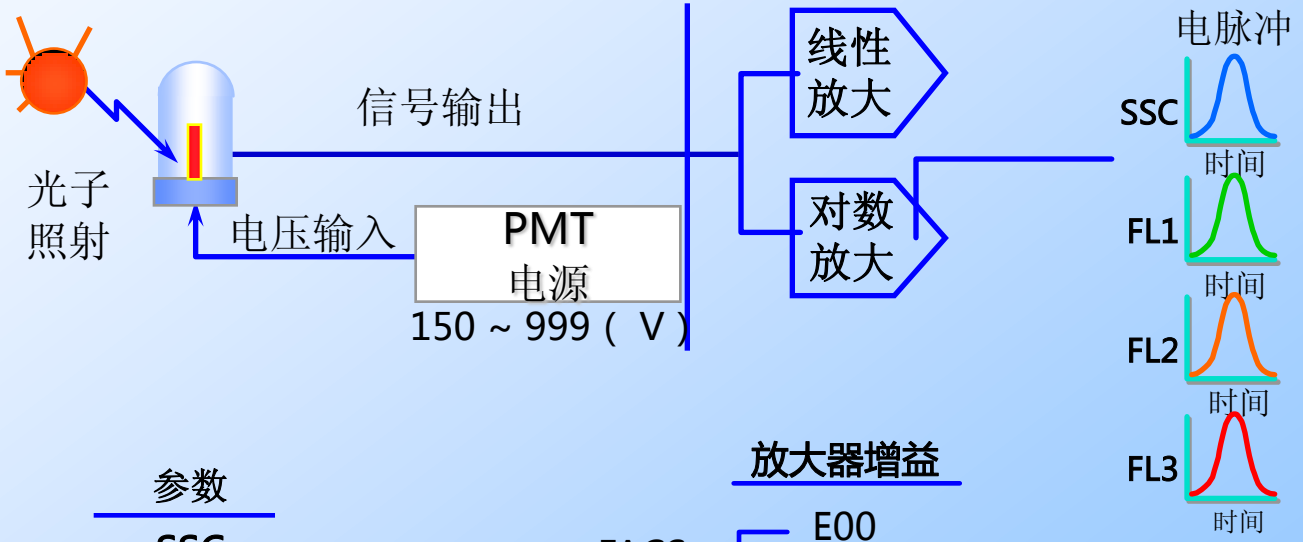
不同荧光染料荧光信号


675nm
575nm
513nm
激光 488nm
PerCP
PE
FITC


孵育
冲洗
分析
特异荧光
自发荧光或
非特异荧光
特异荧光
CD19 PE
CD3 FITC

荧光信号 → PMT → 电信号 → 放大器

- **线性放大**：输入与输出线性关系
  如DNA、RNA、总蛋白
- **对数放大**：输入与输出对数关系
  如细胞膜表面抗原



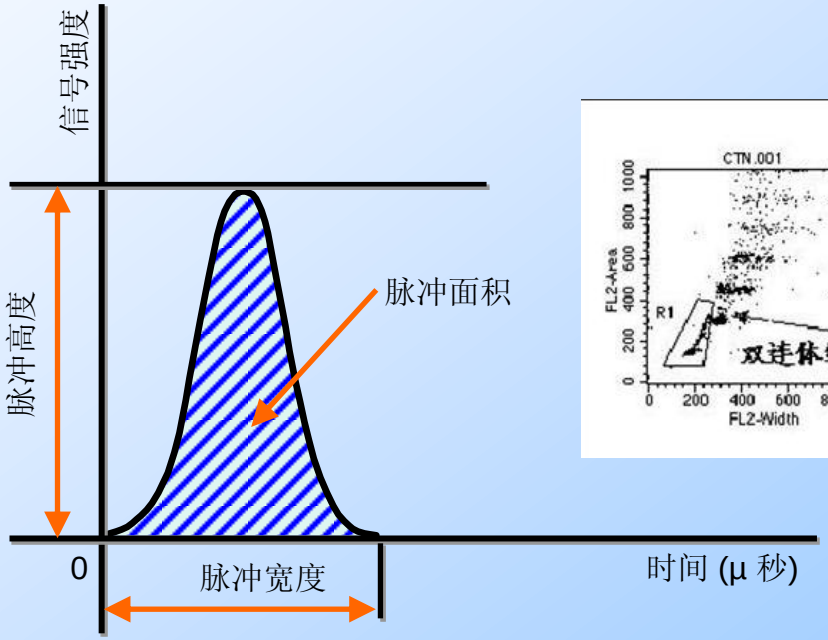
参数
SSC
FL1
FL2
FL3

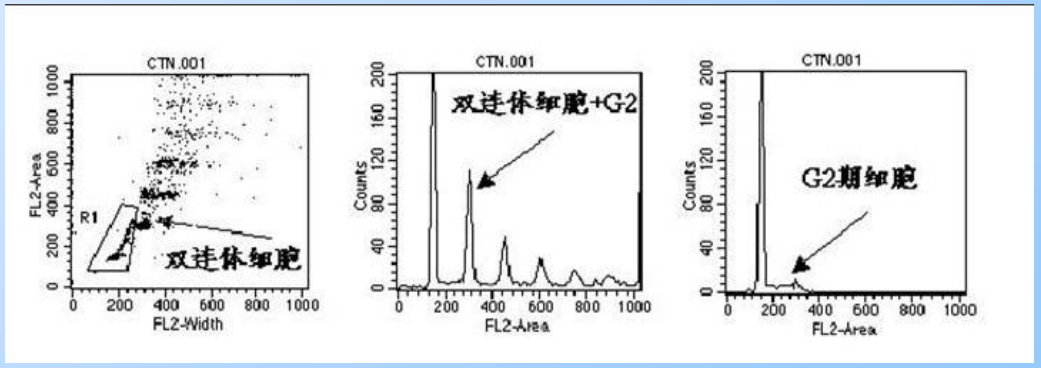
放大器增益

FACS Calibur
- E00
- E01
- E02
- E03
- E-1

荧光信号面积和宽度

- 面积（A）：对光通量进行积分测量结果，一般对DNA倍体测量采用面积，因为比荧光脉冲高度更准确反映DNA含量
- 宽度（W）：用来区分双联体细胞（BD专利技术），原理为双联体得到的荧光宽度信号（FL2-W）比单个G2期细胞大，经设“门”得到真正DNA含量分布曲线和细胞周期





DDM (Doublet Discrimination Module)
双粘体辨别—DNA分析的解决之道

- 通过信号脉冲分析（FL2-W和FL2-A）区别实体组织中的粘连细胞，最大程度减少假阳性
- BD专利技术

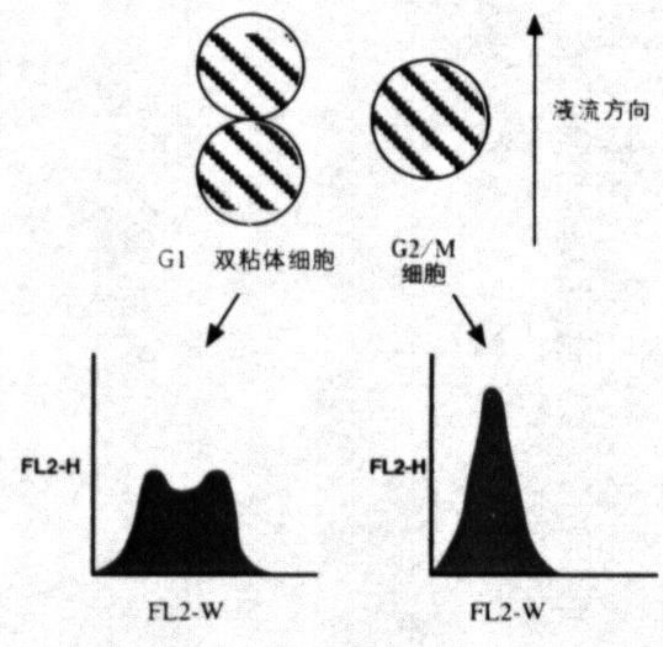


图1：单细胞和双粘体峰区别

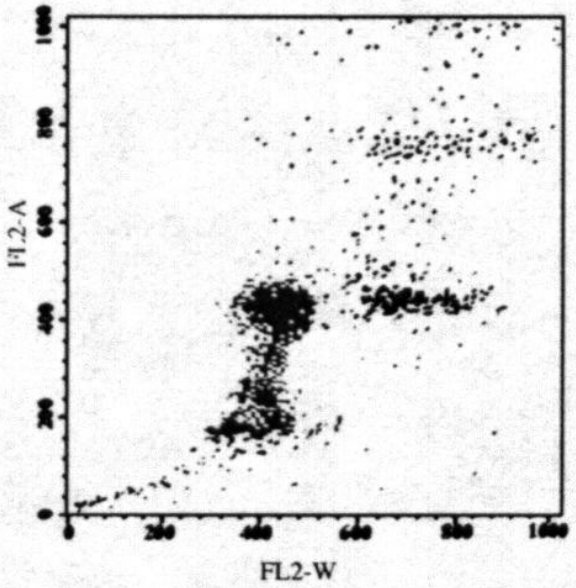


图2：单、双粘体辨别

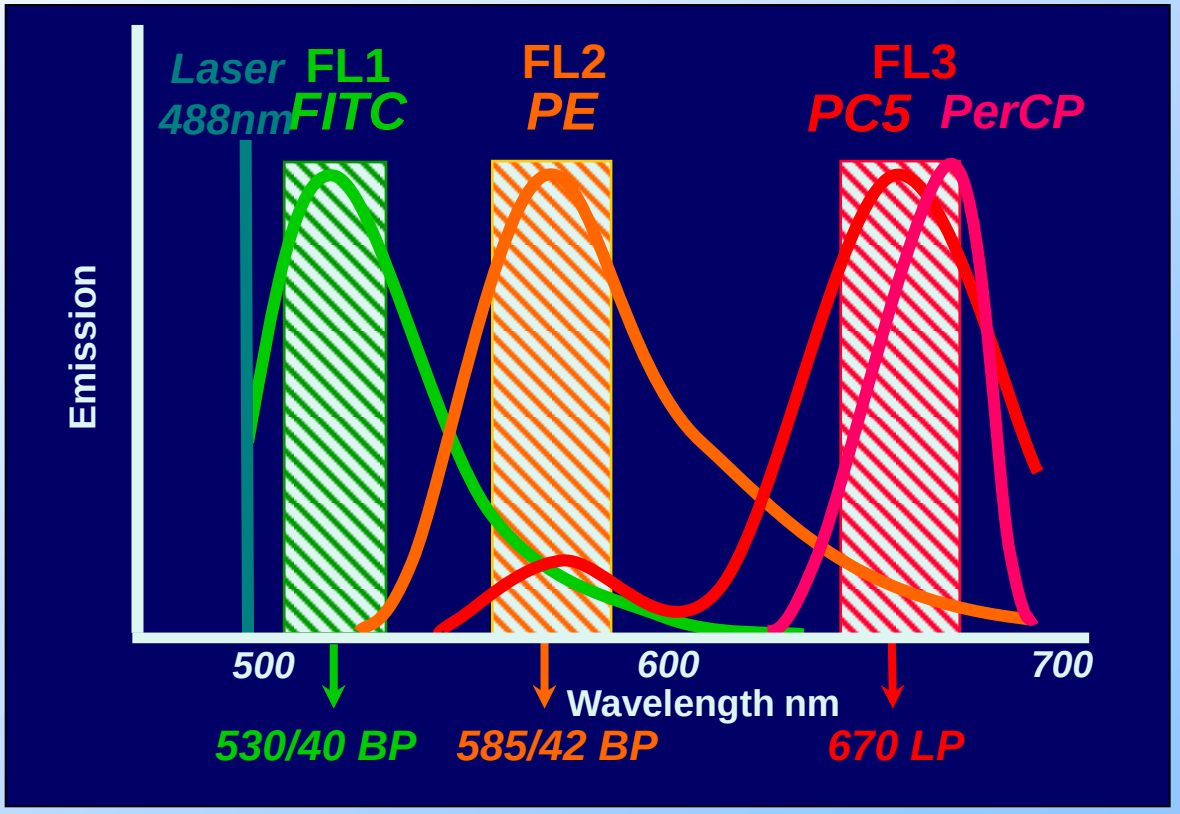
常用的荧光染料

氩离子激光(L1) 488	绿色	FITC	Alexa Fluro 488	
	黄色	PE		
	红色	PE-Texas Red	PE-Cy5	PerCP
	远红	PerCP-Cy5.5		
	红外	PE-Cy7		
氦氖激光(L2) 633	红色	APC	Alexa Fluro 647	
	红外	APC-Cy7		
紫色激光(L3) 405	蓝色	Alexa Fluro 405	Pacific Blue	
	绿色			

- 光谱交叉

▲2色以上荧光分析存在光谱交叉

▲必做荧光之间补偿

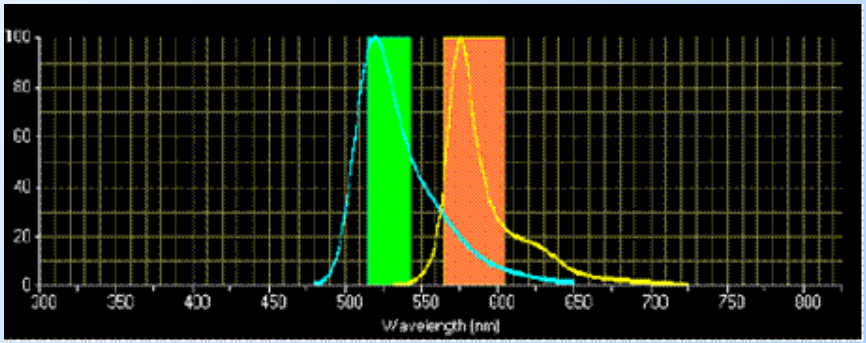


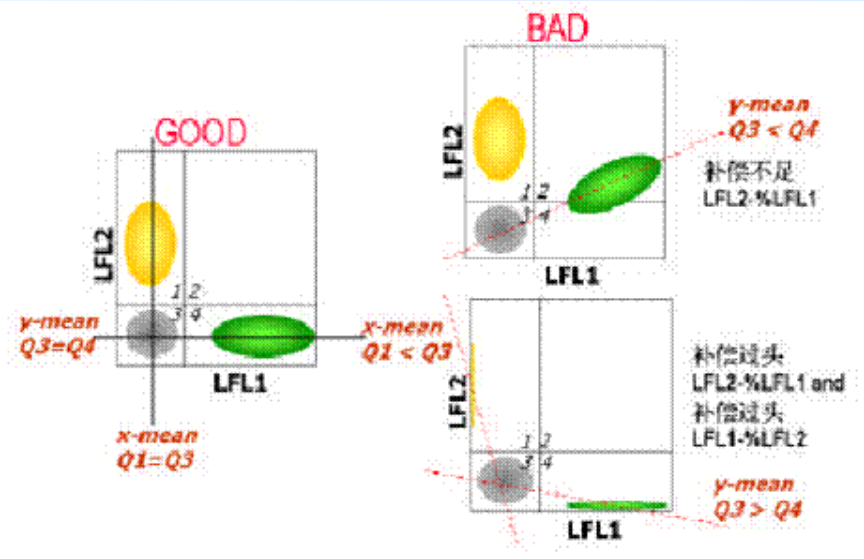
- 荧光补偿调节

▲ 先将所有补偿和电压调为“0”

▲ 用同型对照或阴性对照管调节电压使阴性群位于“左下角”

▲ 用单阳性管依次调节相邻荧光之间补偿，如FL1-%FL2，FL2-%FL1





- 荧光抗体的选择

▲ 根据仪器型号和抗原表达强弱合理选择荧光抗体（∵不同仪器荧光素相对强度有所不同）

FACS Vantage仪器：

APC＞PE ＞ PE-Cy5 ＞PerCP-Cy5.5 ＞FITC ＞PerCP

FACS Calibur仪器：

PE ＞ APC ＞ PE-Cy5 ＞ PerCP ＞ FITC ＞ PerCP-Cy5.5

▲ **低表达抗原要标记高信噪比**（ S/N ：特异性荧光信号signal和非特异结合噪音noise的比值）荧光素，如PE、APC

▲ **首选直标荧光抗体**，双标以上抗体标记必做荧光补偿

- 影响荧光标记效果的因素

▲ 温度：温度升高荧光量减弱

▲ 溶液pH值：发生改变造成荧光光谱的改变，荧光强度的降低

▲ 荧光染料浓度：荧光染料形成的缔合分子中存在电子共振作用

▲ 杂质：产生猝灭作用

▲ 固定剂：染DNA时用醛类固定剂（戊二醛、甲醛）时荧光强度降低50%，醇类影响较小

▲ 其他：溶剂的性质、浓度对荧光猝灭也有一定影响

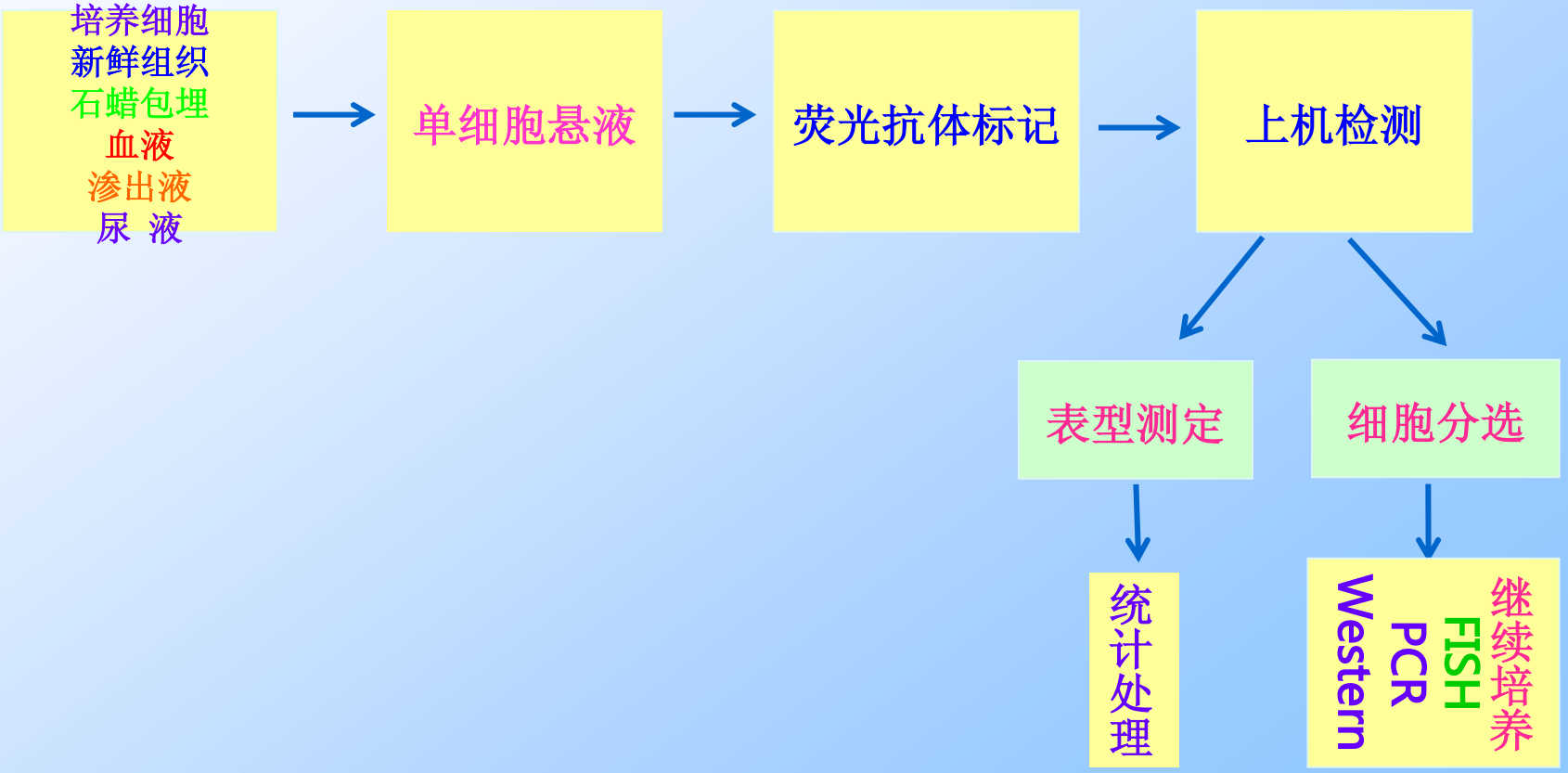
- 流式细胞仪的结构与原理
- **流式细胞仪的数据获取与分析**
- 流式细胞术的样本制备
- 流式细胞术的应用
- 流式细胞术的优越性与展望

流式细胞仪的数据获取与分析

- 流式细胞仪的选择与使用
- FCM数据的采集
- BD流式细胞仪常用分析软件

- FCM主要技术指标
  - 荧光测量灵敏度：衡量仪器检测微弱光信号的重要指标，能检测到单个细胞最少标有荧光分子数目表示，一般FCM可达到＜600个荧光分子，FACSAria达125个MESF
  - 仪器分辨率：衡量仪器测量精度指标，以变异系数CV值（Coefficient of variation)表示,一般FCM最佳状态时CV＜2%
  - 前向角散射光检测灵敏度：能够检测到的最小颗粒大小，商品化FCM可测到0.2~0.5μm
  - 分析速度：一般达6000个细胞/秒以上，大型机达几万个细胞/秒
  - 分选指标：速度、纯度、收获率。台式带分选仪速度300/秒，大型机最高达50000/秒，纯度可达99%

- 仪器质量控制：每日上机之前，务必用质控品做仪器调校，确保仪器状态正常。不同仪器有不同质控程序。如FACSCalibur仪器，先用CaliBRITE beads（已知光散射和荧光强度标准微球）运行FACScomp软件，确定电压、荧光补偿、散射光状态是否正常，每一部分均“通过”后方能进入测试工作。
- 流式细胞术操作流程



- **FCM使用注意事项**

- 保证仪器处于最佳状态：

  光路和流路校正、线性度测试、荧光强度标准化和荧光补偿是保证一个实验室批间数据重 复性、与其他实验室数据间可比性的前提

- 严格制备标本：

  a.单细胞悬液制备：细胞浓度至少1×10^6，避免人为造成死细胞，若死细胞＞20%DNA分析结果不可靠（造成G_0/G_1期前锋，可误认为是亚二倍体峰或凋亡峰）。

  b.荧光抗体标记：使用同厂家、同批次抗体，足量、足程标记，抗体过少或过量均会出现问题。

  c.减少非特异染色：充分洗掉未结合抗体，使用间标抗体注意非特异背景干扰（如Fc受体）

  d.每批、每步实验条件要一致：如PBS、PH值、温度等

  e.未固定样本在2h内，固定样本24小时内测定完毕：避免荧光强度衰减

- **合理设计对照，切忌不设对照：对照样本应与实验样本平行操作**

  阴性对照：评估非特异反应水平，界定阴性范围

  阳性对照：在诊断抗原表达确失性疾病时，需确定抗原表达正常时的抗原表达强度和百分含量

  补偿调整管：单阳管
- 避免假阴性/假阳性结果

  荧光素浓度、配伍不当、试剂的质量问题
- 需要测试者与样本制备者共同配合完成测试

  因为FCM有别于一般的生化仪、血球计数仪等医疗仪器，根据检测目的来判断和分析结果
- 做好每日、每月仪器维护，特别是使用PI、AO等染料后及时用2%次氯酸和蒸馏水彻底冲洗管路，确保仪器清洁，延长仪器寿命
- 每日用84消毒液擦净操作台、键盘、鼠标、地面等可疑污染部位，废弃的样品管放置指定地点统一处理，防止生物制品污染，做好自我保护

- 流式细胞仪检测范围

  - 细胞结构
    ▲细胞大小
    ▲细胞粒度
    ▲细胞表面面积
    ▲核浆比例
    ▲DNA含量与细胞周期
    ▲RNA含量
    ▲蛋白质含量
  - 细胞功能
    ▲细胞表面/胞浆/核的特异性抗原
    ▲胞浆内细胞因子：Ca2+、Mg2+、pH
    ▲细胞活性：线粒体膜电位、ROS、凋亡
    ▲酶活性
    ▲激素结合位点
    ▲细胞受体

- 流式分选的使用范围及用途

  - 范围：
    ▲普通细胞亚群分选
    ▲干祖细胞分选：CD34+、CD44+、CD24+、CD133+
    ▲染色体分选
    ▲性别选择（精子分选）
    ▲胎儿红细胞产前诊断
    ▲单克隆细胞分选
    ▲成分分选
  - 用途：
    ▲形态学研究：干细胞发育
    ▲纯化细胞传代培养：稳定转染细胞系的建立
    ▲分子生物学研究（FISH、PCR、Western）
    ▲细胞功能研究

流式细胞仪的数据获取与分析

- 流式细胞仪的选择与使用
- FCM数据的采集
- BD流式细胞仪常用分析软件

- **FCM数据的采集**

  - 基本程序：

    开机→光路校正→建立获取模板→条件优化→采集数据

  - **注意事项：**

    1.一般采集数据之前先“设门”：指在细胞分布图中指定一个范围或一片区域，对其中的细胞进行单参数或多参数分析

    2.设定获取细胞总数：一般对目的细胞收集1万以上

    3.获取条件优化：用阴性管和单阳管调电压、补偿、域值

- FCM数据显示与分析

  - 单参数直方图（Histogram）
  - 双参数数据显示：

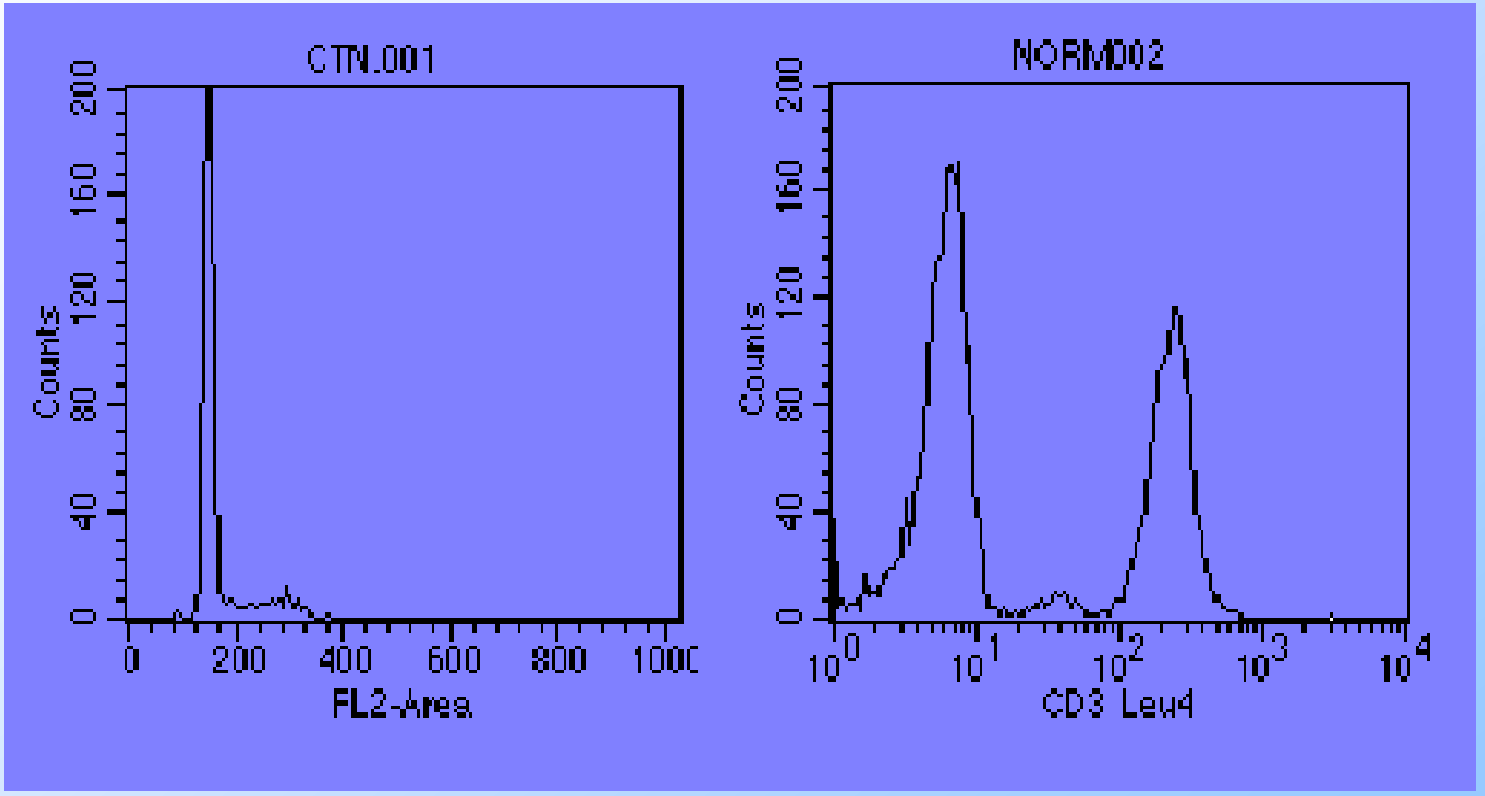
    二维点图(Dot Plot)

    等高线图(Contour Plot)

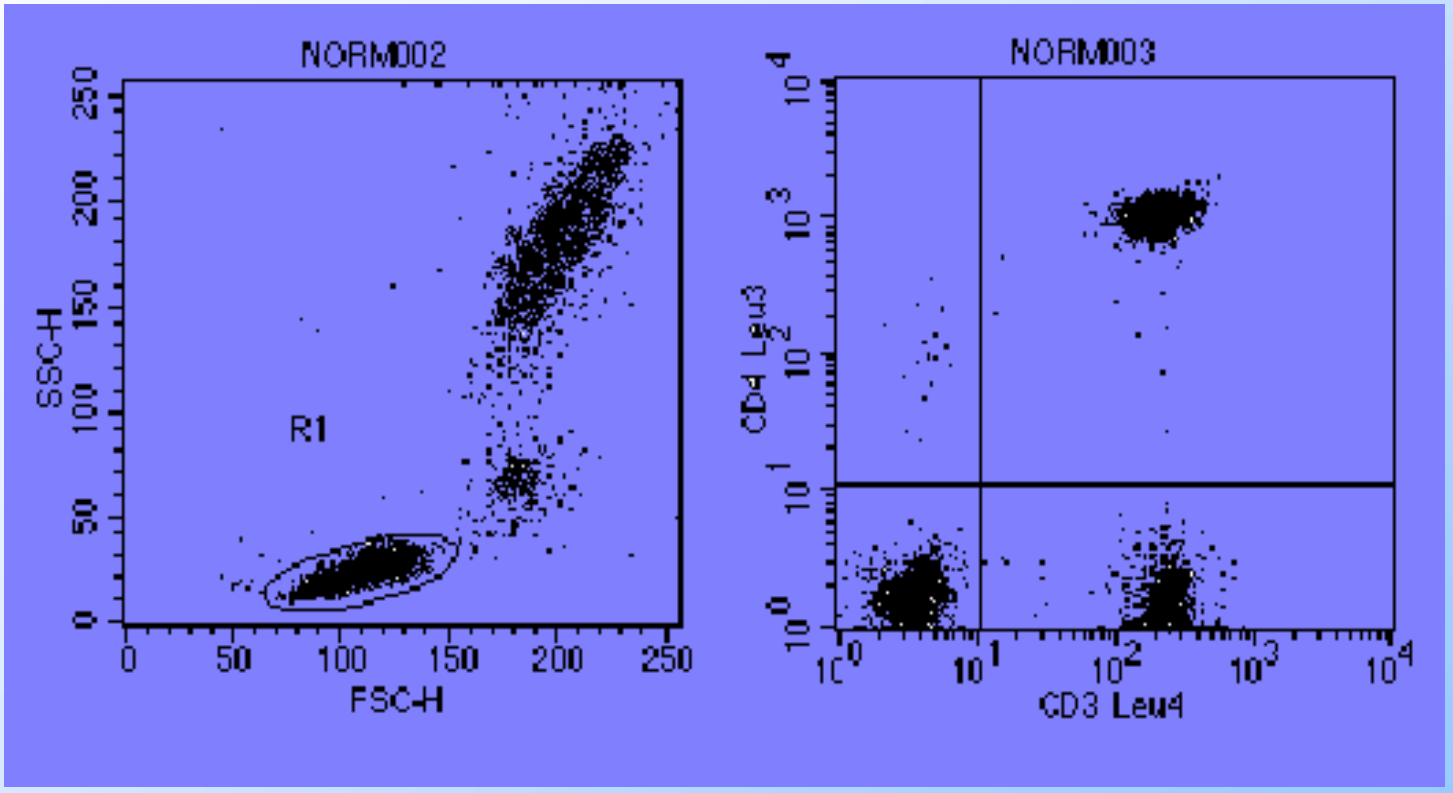
    二维密度图(Density Plot)

    假三维图(Pseudo 3D Plot)
  - 三维图(3D Plot)

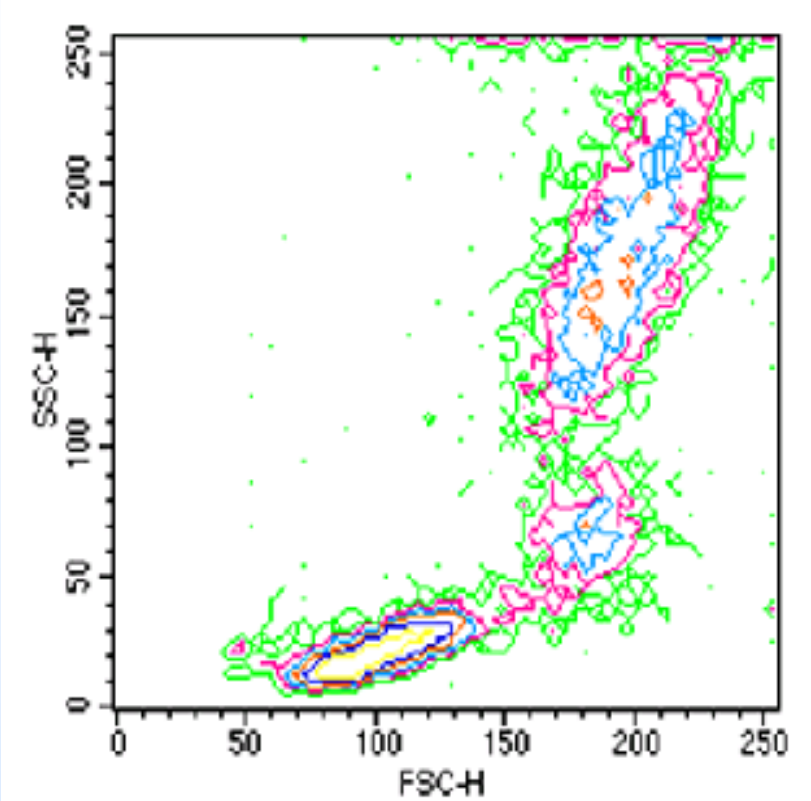
直方图Histogram



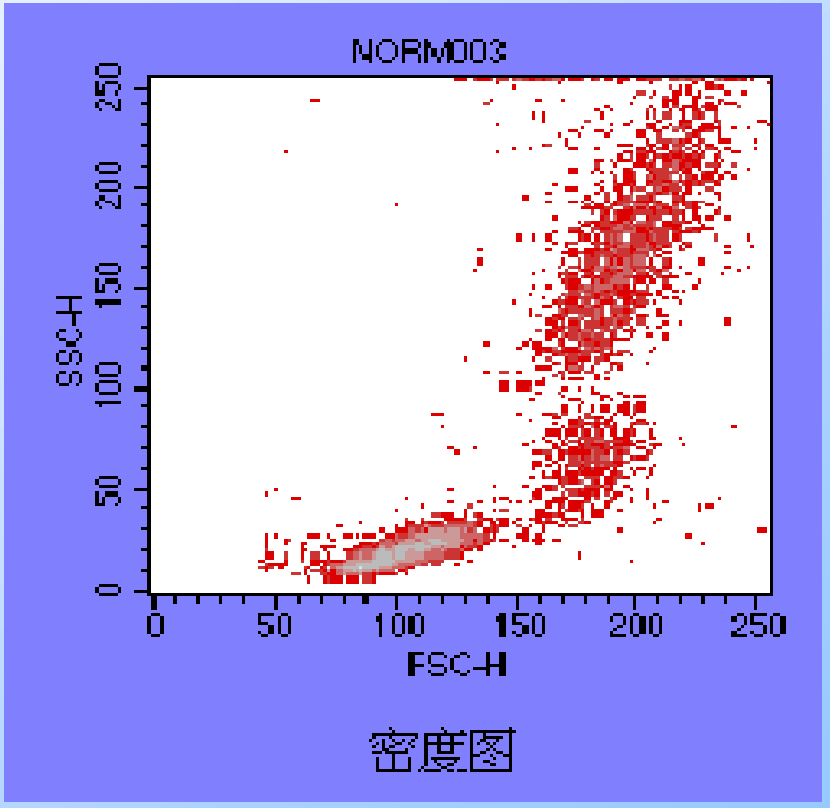
二维点图Dot Plot



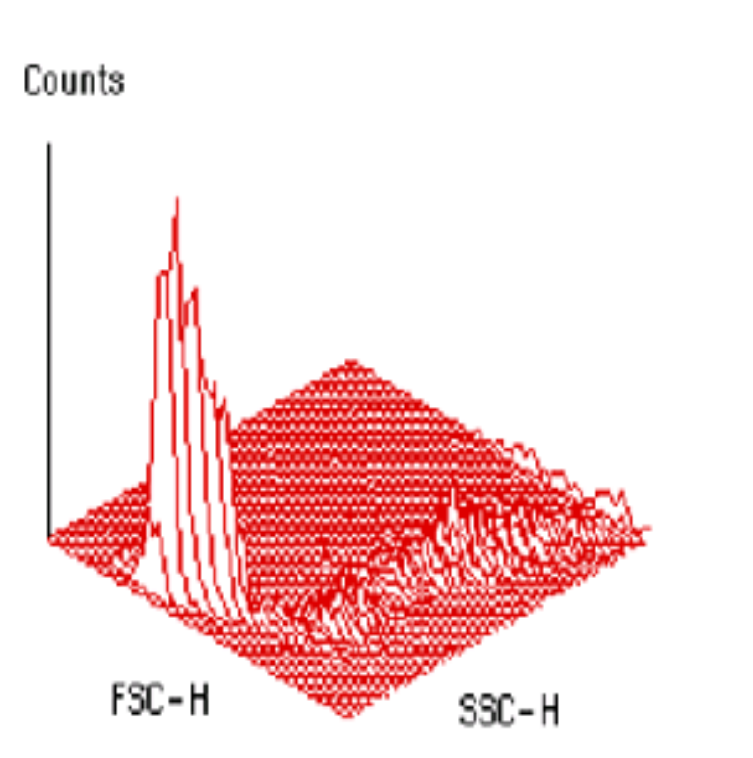
等高线图 Contour Plot



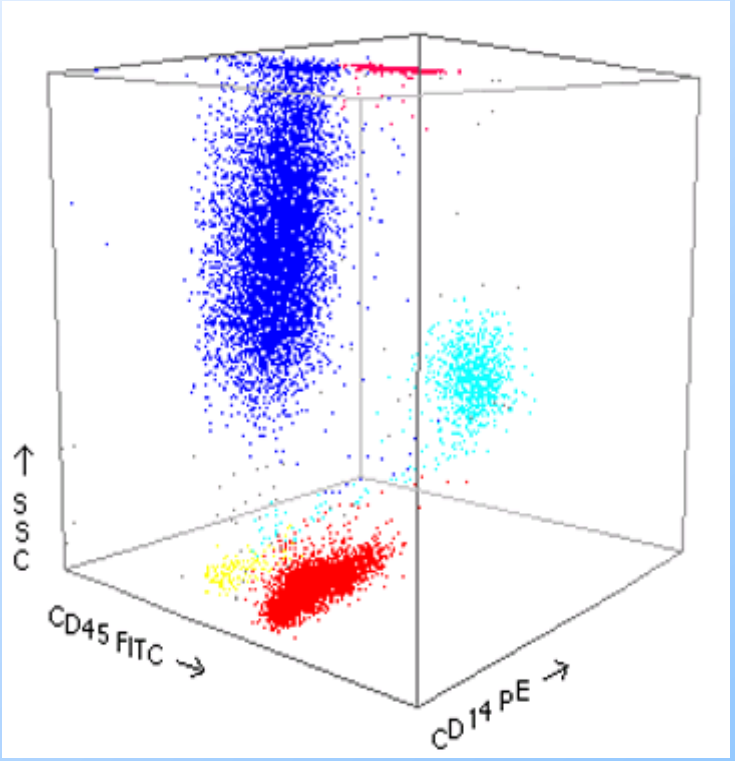
二维密度图Density Plot



假三维图Pseudo 3D Plot



三维图3D Plot



流式细胞术的数据获取与分析

- 流式细胞仪的选择与使用
- FCM数据的采集
- BD流式细胞仪常用分析软件

BD仪器软件

- 基本应用软件：

  CellQuest:完成仪器设置、数据获取、统计分析等全能工具

  FACSComp:自动调整仪器设置
- 自动化获取分析软件

  1）SimulSET/MultiSET：双色和多色免疫表型分析或绝对计数

  2）ProCOUNT：造血干/祖细胞自动化分析，报告CD34+细胞绝对值

  3）HLA-B27分析软件：血液T淋巴细胞HLA-B27定量分析

  4）ReticCOUNT：网织红细胞自动化分析
- 分析软件

  1）ModFit软件：DNA周期、倍体和凋亡的自动或手动分析

  2）QuantiCALC：荧光定量分析，报告每个细胞抗体结合量（ABC），主要检测白细胞表面分化抗原和细胞活化指标

  3）PAINT-A-GATE：多维参数资料分析，同时分辨显示多个细胞群体

  4）ATTRACTOR软件：多参数资料的自动快速批量分析
- 分选软件：FACS Diva

CellQUEST软件

完成仪器设置、数据获取、统计分析等全能工具（实习1）

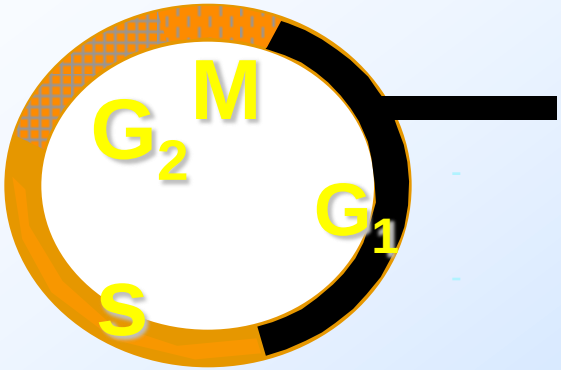
操作步骤

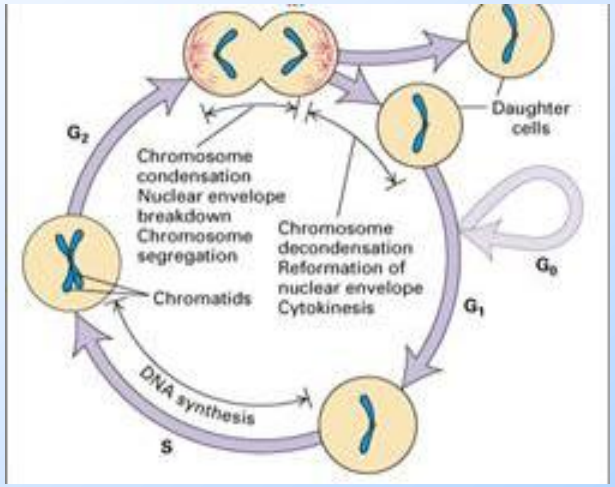
- 开机
- 运行FACSComp：监测仪器工作状态并记录数据
- 建立获取模板
- 调出FACSComp生成的仪器条件
- 条件优化：用阴性和单阳性样本确定电压、补偿和域值，确定获取的目的细胞数＞10000
- 确定存储数据的地址
- 记录数据
- 分析数据：建立分析模板-调出已存储的原始数据-调整Gate(门)或Region(区域)-设置Marker(标尺)-显示象限统计框（Quadrant Stats）-打印分析数据

ModFit软件

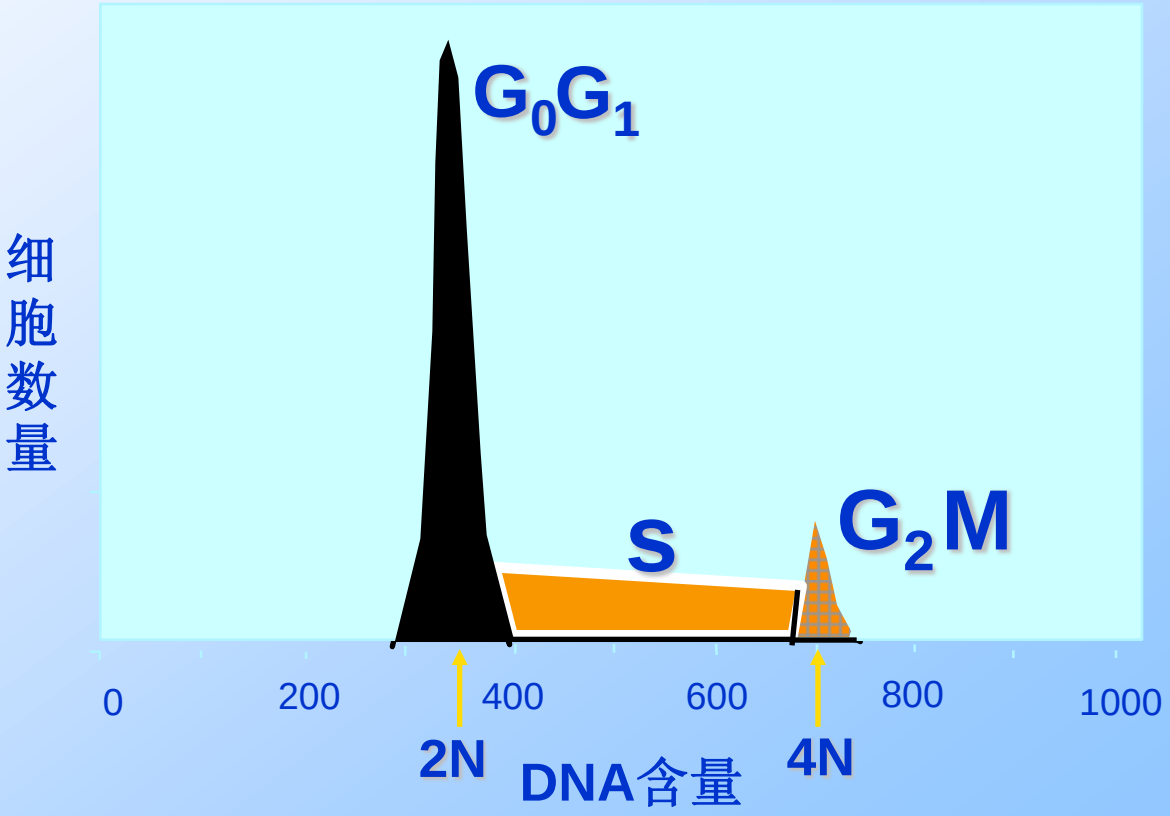
DNA周期、倍体和凋亡的自动或手动分析软件（实习2）

周期概念





DNA分析



DNA分析常用术语

- CV值（变异系数）：衡量仪器测量分辨率或精度的指标，DNA分 析中通常用G0/G1峰的CV来反映，一般FCM最佳状态CV＜2%，CV=δ/μ×100%（δ分布的标准误差，μ分布的平均值）
- DNA指数（DNA index, DI)：样本G0/G1峰平均道数和正常2倍体G0/G1峰的比值。
- 倍体（Ploidy）：染色体数目。流式中用来描述总的DNA含量。**DI=1为二倍体**（2c），**DI=2±0.1范围四倍体**（CV＜5%），二倍体和四倍体之外的统称**异倍体**
- S期含量（SPF）：S期细胞占总周期细胞的比例
- 增殖指数PI：增殖细胞占总周期细胞的比例

DNA分析的影响因素

- 分辨率（CV）：

  仪器因素：液流、光路调试、光学元件

  人为因素：样本制备过程均导致CV变化。DNA直方图中CV越小越好，新鲜标本CV好于石蜡标本，一般新鲜CV≤3，石蜡≤5%，当G1峰CV≥8时，不再合适做S期评估
- 线性度：DNA分析中G2/M期道数应该是G0/G1期的2倍，若G2/M期与G0/G1期的比值不在1.95-2.05范围，放大器的线性度需要检查调节
- 碎片：较多碎片干扰S期计算，也防碍分析较小2倍体峰，若太多碎片需重新制备样本
- 细胞双粘体：通过双粘体辨别模式DDM（Doublet Discrimination Module)来区分

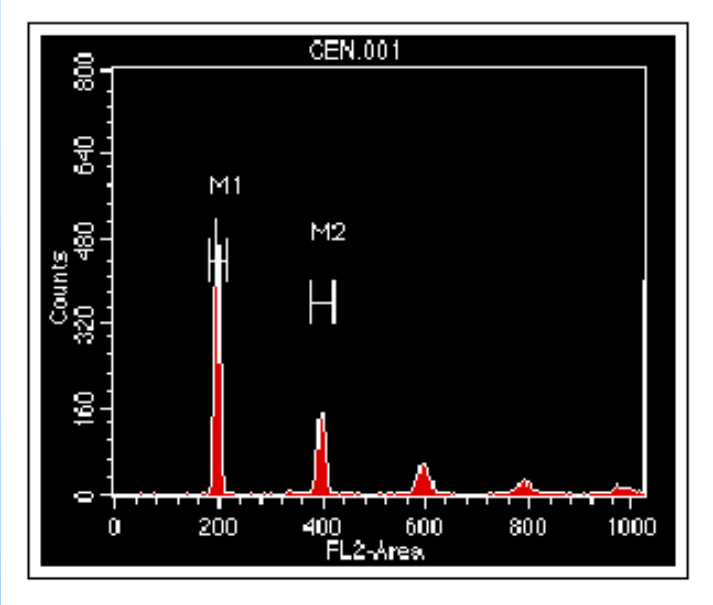
DNA质量控制（DNA QC Particles)

试剂A：小鸡红细胞核（CEN），用于建立测试条件（PMT，放大，测仪器线性度和分辨率。有4个以上峰，与第一峰比值为1、2、3、4

试剂B：小牛胸腺细胞核（CTN），具有完整细胞周期，可检查DDM和脉冲处理器，也可做周期分析质控。

试剂C：2μm荧光微球，确认仪器CV，当CEN和CTN的CV值大于建议值，可用微球来确定是生物样品问题还是仪器本身问题

试剂D：核酸染料 PI



双粘体辨别
DDM (Doublet Discrimination Module)

通过信号脉冲FL2-W和FL2-A分析区别标本中的粘连细胞，最大程度减少假阳性（图1、图2、图3）

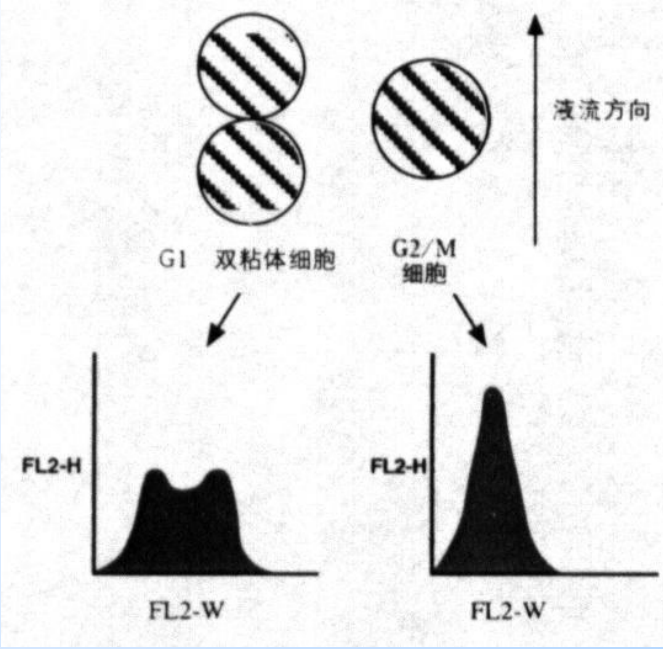


图1：单细胞和双粘体峰区别

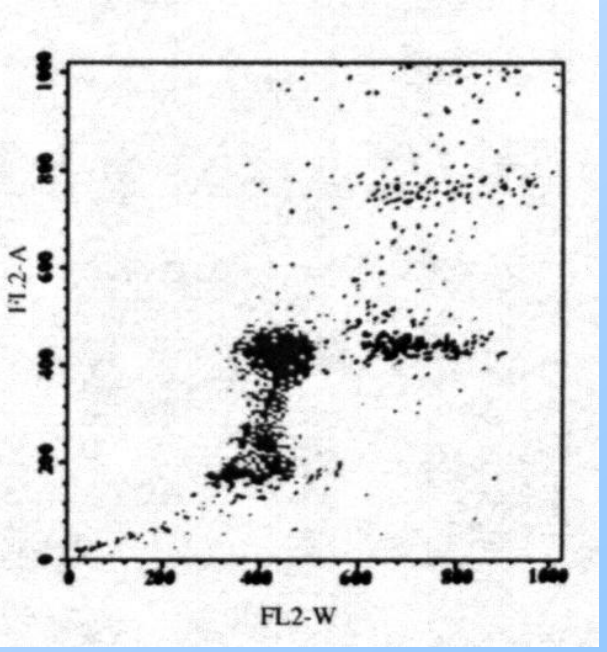


图2：单、双粘体辨别

DDM辨别模式

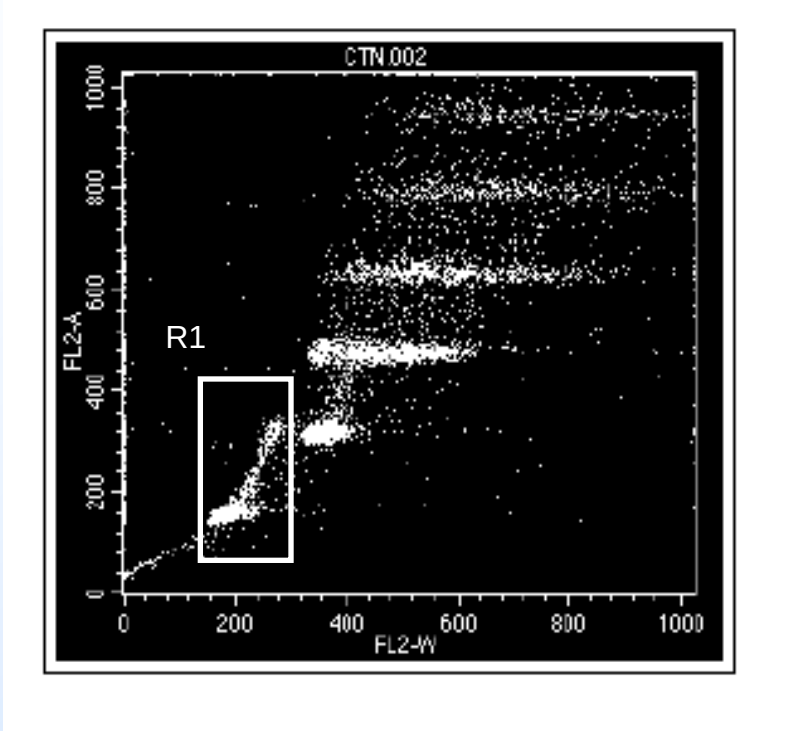
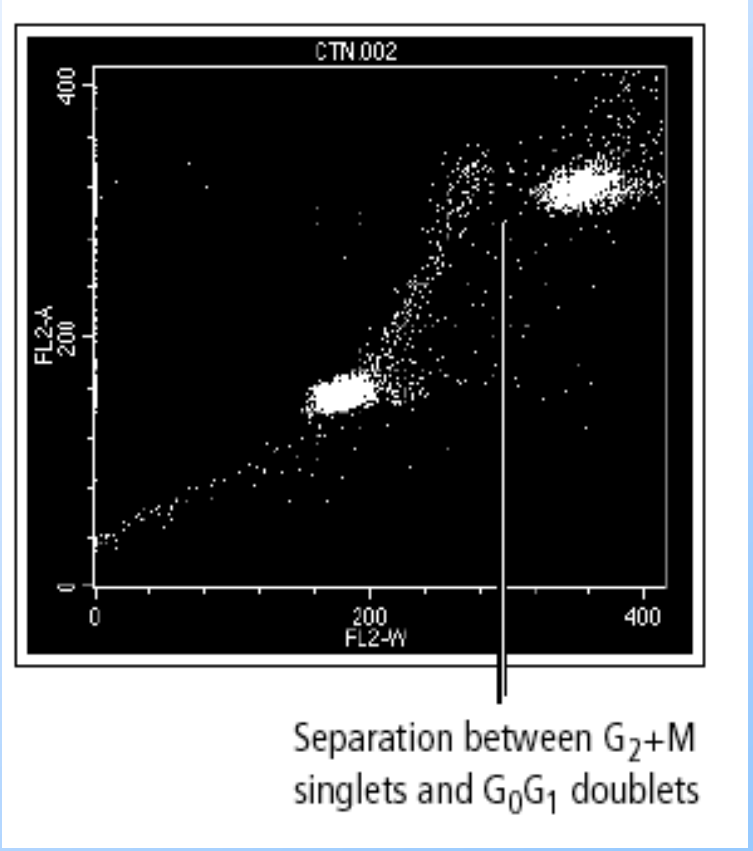


图3：单、双粘体辨别



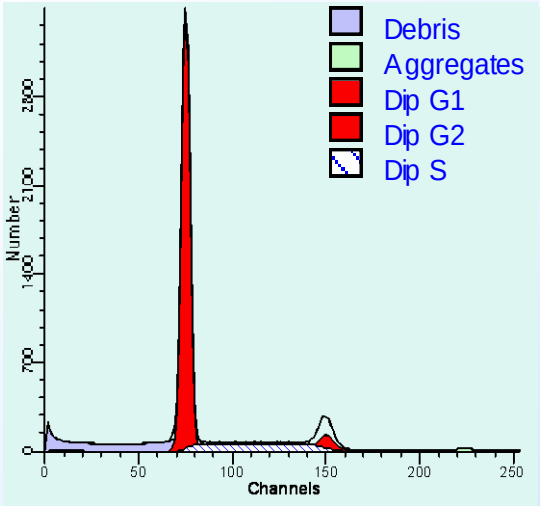
DNA数据获取（用CellQuest 软件）与分析（ ModFit ）

操作步骤

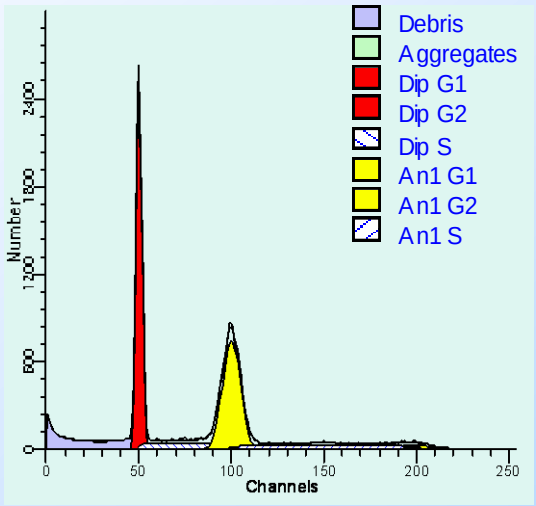
- 开机
- 运行FACSComp：监测仪器工作状态并记录数据
- 建立获取模板：散点图（FL2-W—FL2-A）、两个直方图（FL2-A和FL2-W）
- 运行DNA QC质控：建立测试条件，检测仪器线性度、分辨率和脉冲处理器
- 确定存储数据的地址
- 记录数据：倍体分析建议做3个平行管，一管：2倍体标准品，二管：未知样品+2倍体标准品，三管：未知样品。低速进样，以第一管为准优化条件，同条件下按顺序获取数据，≥2万细胞
- 分析数据：用ModFit软件分析结果

DNA分析结果（举例）

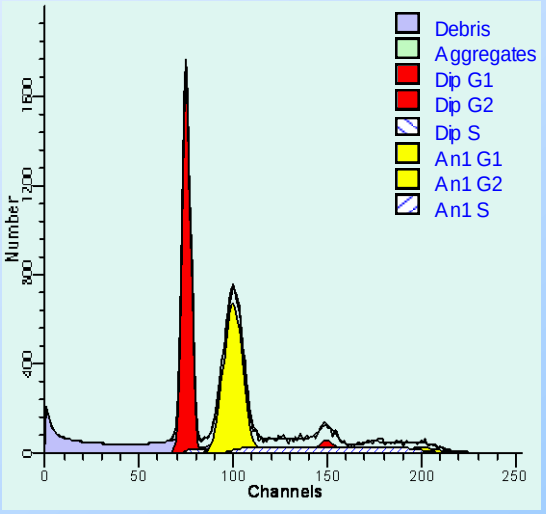
A



B



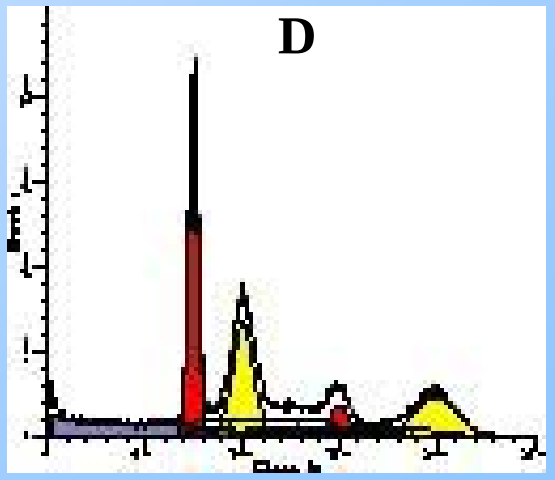
C



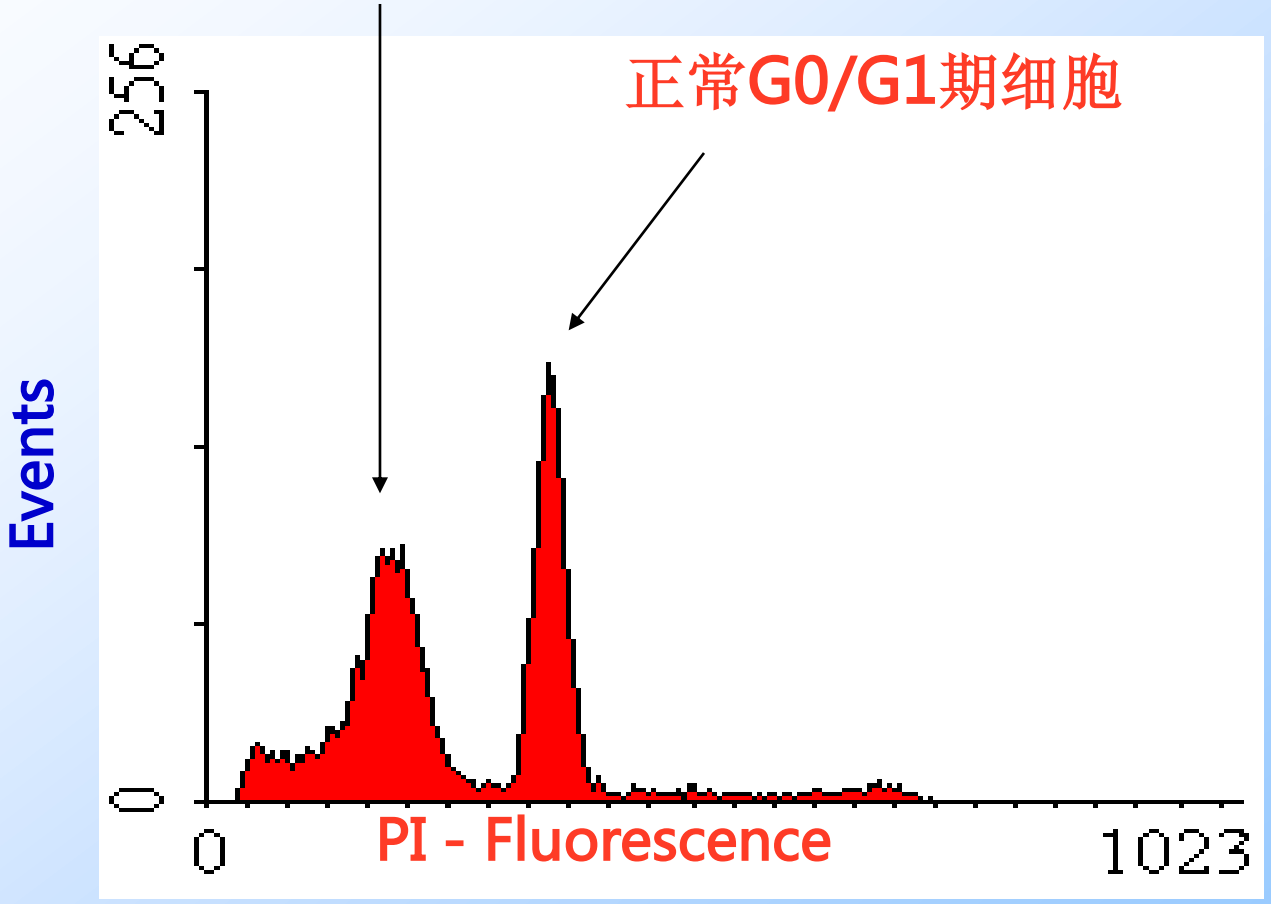
A：2倍体

B~D：异倍体

D



凋亡细胞



- 流式细胞仪的结构与原理
- 流式细胞术的数据获取与分析
- **流式细胞术的样本制备**
- 流式细胞术的应用
- 流式细胞术的优越性与展望

流式样本

来源

- 血液
- 骨髓
- 体液
- 灌洗液
- 外科手术活检
- 细针穿刺物
- 培养细胞系

性质

- 新鲜
- 冰冻
- 固定保存
- 石蜡包埋组织

流式分析样本的制备

- 单细胞悬液的制备
- 目的分子标记
- 样本过滤等待上机

石蜡包埋组织样品制备

1. 将石蜡组织切成50μm厚的组织片3~5片，放入10ml试管中
2. 加入二甲苯5~8ml，室温下脱蜡1-2天，更换1-2次二甲苯待脱石蜡后，弃二甲苯
3. 水化：依次加入100%、95%、70%、50%梯度乙醇5ml，每步为10min，弃乙醇加入蒸馏水3-5ml
4. 消化：加入2ml 0.5%胰蛋白酶（pH）消化液，置37℃恒温水浴中消化30min，每隔10min振荡器振荡一次
5. 加入生理盐水终止消化
6. 用300目尼龙网过滤，未消化好的组织可做第二次消化
7. 收集细胞悬液，离心1500rpm，再用生理盐水漂洗1-2次，离心沉淀，500-800rpm，去碎片
8. 根据具体实验目的可标记荧光抗体，或保存细胞备用

新鲜组织的样品制备

1. **酶消化法：**根据分散组织类型来确定使用的酶类

胰蛋白酶—水解酯键、肽键；

胶原酶—降解几种分子类型的胶原；

溶菌酶—水解糖蛋白、酞的糖苷键；

弹性蛋白酶—消化糖蛋白、弹性纤维。

1）将新鲜组织置于离心管中，加入1-2ml酶消化20-30ml（37℃恒温或室温）间断振荡或吹打

2）终止消化，收集细胞悬液，300目尼龙网过滤，除去细胞团快，低速离心除去细胞碎片

3）将制备好的单细胞悬液进行荧光标记或保存备用

注意！酶的使用浓度、消化时间、酶活性的pH值（胃蛋白酶在碱性环境中失去活性；胰蛋白酶在中性溶剂中活性欠佳等）

2. 机械法

1）剪碎法：a.组织快放入平皿，加入少许生理盐水

b.用剪刀将组织剪至匀浆状，加入10ml生理盐水

c.用吸管吸取组织匀浆，先以100目尼龙网过滤到试管中

d.离心沉淀1000r/min，4-5分钟，再用生理盐水洗3遍，每次以低速500-800r/min短时离心沉淀去除细胞碎片

e.300目尼龙网滤去细胞团块，细胞固定或低温保存备用

2）网搓法：a.将100目、300目尼龙网扎在小烧杯上

b.将剪碎的组织放在网上，以眼科镊子轻轻搓组织快，边搓边加生理盐水冲洗，直到将组织搓完

c.500-800 r/min离心沉淀2min

d.固定细胞或低温保存备用

3）研磨法：

a.先将组织剪成1-2mm3大小组织块

b.放入组织研磨器中加入1-2ml生理盐水

c.转动研磨棒研至匀浆

d.加入10ml生理盐水，冲洗研磨棒

e.收集细胞悬液，经300目尼龙网过滤，离心沉淀500-800r/min，1-2min，再以生理盐水洗3遍，离心沉淀

f.固定或低温保存备用

机械法特点： 易造成细胞碎片和团快，常与其他方法（如酶消化法）配合使用。

3. 化学处理法

作用原理：将组织细胞间起粘着作用的钙、镁离子置换出来，从而使细胞分散开来

1）将组织切成薄片置入试管中，加入EDTA液5ml，室温0.5h，离心弃之

2）加入胰酶-EDTA液5ml，37℃恒温水浴振荡器内30min

3）300目尼龙网过滤，离心沉淀1000r/min，5min，再以生理盐水洗2-3次

4）细胞固定或低温保存备用

特点：用化学法细胞存活率低、细胞产额低、细胞碎片和聚集量不稳定

培养细胞的样品制备

a) 将培养细胞用0.04% EDTA-2Na或0.29%胰蛋白酶消化3-7分，至光镜下见到贴壁细胞间出现筛状间隙为止，弃去消化液，加PBS液

b) 用吸管将细胞从瓶壁上轻轻吹打下来，并移入离心管中

c) 短时低速离心，即800-1000r/min，5min

d) 弃上清，加pH7.4的PBS液5-8ml，低速短时离心， 800-1000r/min离心3-5min，重复2-3次，以去除细胞悬液中的细胞碎片

e) 加少许PBS液，将沉淀细胞轻轻吹打均匀，加固定液或低温保存备用

外周血单个核细胞样本制备

a) 取肝素抗凝外周血2ml，用生理盐水将血稀释成4ml混匀

b) 将稀释后的血沿试管壁缓慢加入4ml淋巴细胞分离液Ficoll到液面上（勿用力过大以免造成血液与分离液混合），保持清晰的分层状态

c) 离心2000r/min，30min，室温18-20℃，离心后可见试管内血液清楚地分4层，上层为血浆，中层为分离液（单个核细胞处于血浆层和分离液层之间），底层为红细胞，红细胞上为粒细胞

d) 用吸管将上层与中层之间的单个核细胞层吸出到另一个管中，用生理盐水洗2遍，每次均以1500r/min，离心10min，弃上清即得到高纯度的单个核细胞悬液

e) 用适当的固定液固定或低温冰箱中保存备用

流式分析样本的制备

- **单细胞悬液的制备**
- **目的分子标记：**最好选用直标抗体，即抗体-荧光素，标记后用PBS洗2-3次。
- **样本过滤等待上机：**标记好的单细胞样本重悬至10^6个/毫升、300-500微升的总体积，再用 300目的滤网过滤至5毫升流式管中等待上机。也可用1-2%的多聚甲醛等固定，24小时内上机测试。

流式分选样本的制备

- 样本制备的所有过程要在细胞培养间完成
- 样本制备过程中所需试剂均需做无菌处理：如胰酶、抗体类需用milipore的0·2μm滤器过滤，PBS等缓冲液需高压灭菌，所有器械、容器均需高压灭菌等。
- 样本制备完毕后需用无菌PBS重悬至10^7——10^8个/毫升，用400目筛网（经过高压灭菌处理）过滤至5毫升无菌流式管中密封后准备上机。娇气的细胞可加入≤2%的血清保持细胞活性。
- 样本收集管可采用5毫升无菌流式管、15毫升离心管、6—96孔板等。为了保持细胞活性，收集容器中可加入适量纯血清或完全培养基等备用。
- 制备好的样本及收集容器密封好后最好放在冰盒上待用。