

流式细胞仪的简要介绍和注意事项

一、流式细胞仪的检测范围

1. 流式细胞仪可以检测细胞结构, 包括: 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。
2. 流式细胞仪可以检测细胞功能, 包括: 细胞表面/胞浆/核的特异性抗原、细胞活性、细胞内细胞因子、酶活性、激素结合位点和细胞受体。

二、流式细胞仪的临床应用

1. 流式细胞术在肿瘤学中的应用: 流式细胞术可以检测肿瘤细胞增殖周期、检测肿瘤细胞表面标记、癌基因表达产物、进行多药耐药性分析、检测凋亡;
2. 流式细胞术在血液学中的应用: 检测白血病和淋巴瘤细胞、活化血小板、造血干细胞(CD34+)计数、白血病与淋巴瘤的免疫分型、网织红细胞计数、细胞移植的交叉配型和免疫状态监测;
3. 流式细胞术在免疫学中的应用: 可以进行淋巴细胞及其亚群分析、淋巴细胞免疫分型、检测细胞因子。

三、流式细胞仪的科研应用

主要有细胞动力学功能研究、环境微生物分析、流式细胞术与分子生物学研究。

四、流式细胞术常规检测时的样品制备

(一) 直接免疫荧光标记法

取一定量细胞(约 1×10^6 细胞/ml), 直接加入连接有荧光素的抗体进行免疫标记反应(如做双标或多标染色, 可把几种标记有不同荧光素的抗体同时加入), 孵育 20-60 分钟后, 用 PBS (pH 7.2 - 7.4) 洗 1-2 次, 加入缓冲液重悬, 上机检测。本方法操作简便, 结果准确, 易于分析, 适用于同一细胞群多参数同时测定。虽然直标抗体试剂成本较高, 但减少了间接标记法中较强的非特异荧光的干扰, 因此更适用于临床标本的检测。

(二) 间接免疫荧光标记法

取一定量的细胞悬液(约 1×10^6 细胞/ml), 先加入特异的第一抗体, 待反应完全后洗去未结合抗体, 再加入荧光标记的第二抗体, 生成抗原-抗体-抗抗体复合物, 以 FCM 检测其上标记的荧光素被激发后发出的荧光。本方法费用较低, 二抗应用广泛, 多用于科研标本的检测。但由于二抗一般为多克隆抗体, 特异性较差, 非特异性荧光背景较强, 易影响实验结果。所以标本制备时应加入阴性或阳性对照。另外, 由于间接法步骤较多, 增加了细胞的丢失, 不适用测定细胞数较少的标本。

五、质量控制和注意事项

流式细胞仪并非是完全自动化的仪器, 准确的实验结果还需要准确的人工技术配合, 所以标本制备需要规范, 仪器本身亦需要质量控制。

(一) 流式细胞术免疫学检测的影响因素和质量控制

流式细胞术在免疫学中有广泛的应用, 其免疫荧光染色的标本制备非常重要, 常常由于标本制备过程中出现人为非特异性荧光干扰(尤其在间接免疫荧光染色中)或细胞浓度低等影响检测结果。解决这些影响因素的方法如下:

- (1) 确保标本上机检测前的浓度为 1×10^6 /ml, 细胞浓度过低直接影响检测结果。
- (2) 使用蛋白封闭剂, 封闭非特异结合位点, 尤其在间接免疫荧光标记时必不可少。常用的蛋白封闭剂为 0.5% 牛血清白蛋白和 1% 胎牛血清。
- (3) 荧光抗体染色后充分洗涤, 注意混匀和离心速度, 减少重叠细胞和细胞碎片。
- (4) 设置对照样品, 采用与抗体来源同型匹配的无关对照和荧光抗体的本底对照。
- (5) 判定结果时, 应注意减去本底荧光, 为使免疫荧光的定量分析更精确, 应用计算机程序软件, 用拟合曲线方法从实验组的曲线峰值中减去对照组的曲线峰值, 可以得到更准确的免疫荧光定量结果。
- (6) 注意染色后避光, 保证细胞免疫荧光的稳定。

(二) DNA 倍体分析的质量控制仍没有统一的标准，各文献报道的实验结果差异较大，1993 年 10 月美国癌症研究组织制定了 FCM DNA 测定的统一标准，我们根据这些标准并结合国内有经验的专家多年的实践，对 FCM 的 DNA 分析技术的质控和注意事项进行说明。

- (1) 手术切除的新鲜标本或活检针吸标本取材时，要避免出血坏死组织。
- (2) 标本采集后要及时固定或深低温保存，以免组织发生自溶，DNA 降解，而造成测试结果的误差。
- (3) 固定剂要采用对组织细胞穿透性强的浓度，70%的乙醇固定效果较好。
- (4) 单细胞悬液制备过程中，注意将待测细胞成分分离出来，减少其他成分的干扰，并注意不要损伤该群细胞。
- (5) 细胞样品的采集要保证足够的细胞浓度，即 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ ，杂质、碎片、团块和重叠细胞应 $< 2\%$ ，对肿瘤细胞 DNA 异倍体的分析样品，至少有 20% 的肿瘤细胞存在。

(6) 石蜡包埋组织单细胞制备时要注意：

取材时应选取无自溶、坏死的组织，对肿瘤组织标本，选取含肿瘤细胞丰富的区域；

石蜡组织片的厚度要适宜，最好为 $40-50 \mu\text{m}$ 。过薄或过厚的切片均会影响检测结果；

彻底脱蜡，以免残留的石蜡影响酶的消化活性，验证脱蜡是否完全的方法是弃去二甲苯，加入 100%乙醇，如果无絮状物浮起，说明蜡已脱净；

水化要充分，使组织还原到与新鲜组织相似的状态；注意消化的时间和消化酶的活性。常规使用 0.5%胃蛋白酶，pH 1.5。

(三) 操作方面

- (1) 流式细胞仪在整个工作过程中处于最佳状态，能保证定量检测的准确性和检测精度。使用标准样品调整仪器的变异系数在最小范围，分辨率在最好状态，能避免在测量过程中仪器条件的变化引起的检测误差。
- (2) 评价仪器精度的重要指标是仪器的变异系数(CV)，对于校准样品，其 CV 值越小越好，CV 值越小，说明仪器校正的精度越高。校准样品包括非生物样品(荧光微球)和生物细胞样品(人淋巴细胞、鸡红细胞等)。目前，非生物荧光微球已有商品试剂，CV 一般 $< 2\%-3\%$ 。

(四) 资料分析方面

- (1) 当样品中碎片杂质或团块过多，所测细胞数在 20% 以下，组方图的基线抬高时，应放弃分析处理。
- (2) 做细胞周期分析时，样品细胞数应在 1 万个，排除碎片、杂质和团块，当异倍体细胞数占总细胞数 10% 以下时，需要结合其他诊断指标，不可盲目下结论，至少异倍体细胞占总细胞数的 20% 以上，可以确定异倍体的存在。
- (3) DNA 分析时，正常二倍体细胞组方图 CV 值 $> 8\%$ 时放弃分析，但肿瘤细胞的 CV 值 $> 8\%$ ，与肿瘤细胞的异质性有关。另外，DNA 倍体分析时，同源组织的不同个体会出现 10% 的漂移。
- (4) DNA 倍体标准的质量控制，采用相同个体同源正常组织、同样固定方法、相同的样品处理方法、相同的染色方法、同步染色、同样的仪器检测条件、正常的二倍体组织作为内标准。