

# 关于流式细胞分析

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。**BD**公司的临床型 **FACScan**也是最早可用于临床诊断的仪器。
- 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。

# •流式细胞仪实物



BD-Calibur



BD FACS Vantage

- 其特点是：
- ①测量速度快，最快可在1秒种内计测数万个细胞；
- ②可进行多参数测量，可以对同一个细胞做有关物理、化学特性的多参数测量，并具有明显的统计学意义；
- ③是一门综合性的高科技方法，它综合了激光技术、计算机技术、流体力学、细胞化学、图像技术等从多领域的知识和成果；
- ④既是细胞分析技术，又是精确的分选技术。

- 概要说来，流式细胞术主要包括了样品的液流技术、细胞的分选和计数技术，以及数据的采集和分析技术等。**FCM**目前发展的水平凝聚了半个世纪以来人们在这方面的**心血和成果**。

# 流式细胞仪发展的历史

- 起源: 1934年--- 细胞计数仪
- 雏形: 1949年--- Coulter 计数器
- 1959年--- B型Coulter计数器
- 1972年: BD(Becton-Dickinson)
- 第一台流式细胞仪, 具有分选功能

- **流式细胞仪主要由三部分组成：流动室和液流系统；光路系统以及电系统。其作用如下：**
  - **液流系统：依次传送待测样本中的细胞到激光照射区。**
  - **光路系统：细胞由激光激发，通过光学滤片产生光信号，并传送到相应的探测器。**
  - **电系统：把光信号转换为电信号。**

- 在流式细胞仪中，细胞被传送到液流中的激光照射区。任何存在于悬液中的直径为**0.2-150**微米的粒子或细胞都适用于流式分析。在实际工作中，用实体组织进行流式细胞分析往往是不可能的，分析之前必须对其进行分解。被液滴包绕的粒子称为细胞液柱，当粒子经过激光照射区时，通过激光激发产生散射光。含有荧光的粒子就会表现出其荧光特性。散射光和荧光由光路系统（相应的透镜，滤片和探测器）收集。分光器和滤光片引导散射光和荧光至相应的探测器，把光信号转换为电信号。

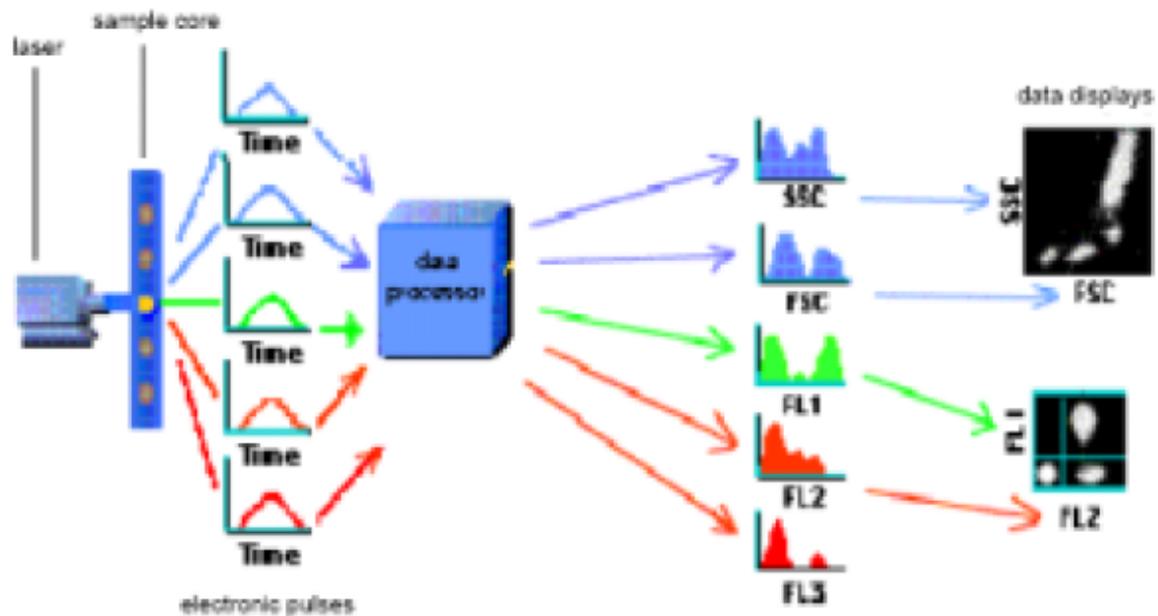


图 1-1 散射光和激发光信号转换为计算机可处理的充电脉冲

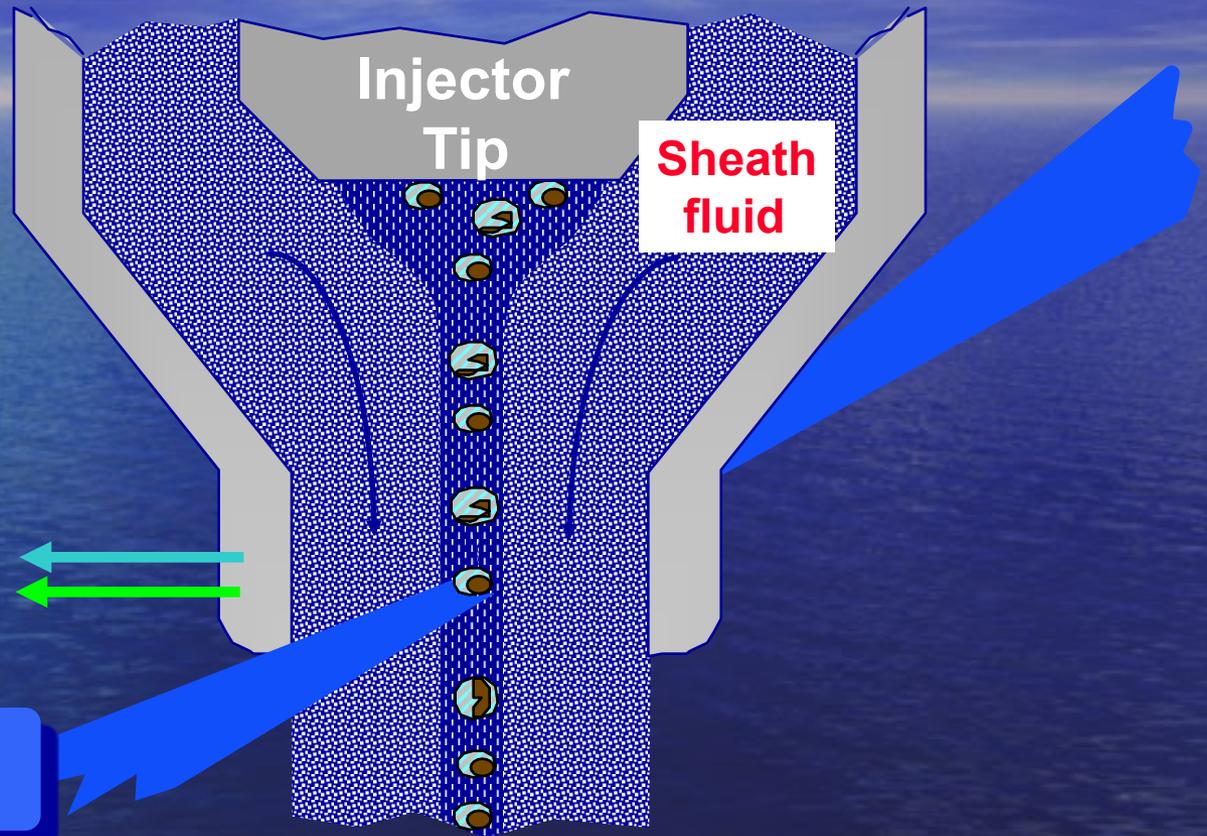
习题·综述

# 液流系统

液流系统的作用是依次传送待测样本中的细胞到激光照射区，其理想状态是把细胞传送到激光束的中心。而且在特定时间内，应该只有一个细胞或粒子通过激光束。

因此，必须在流动室内把细胞注入鞘液流。流动室是液流系统的核心部件，台式机中流动室称为样品槽，大型机称之为喷嘴。在流动室内细胞液柱聚焦于鞘液中心，细胞在此与激光相交。

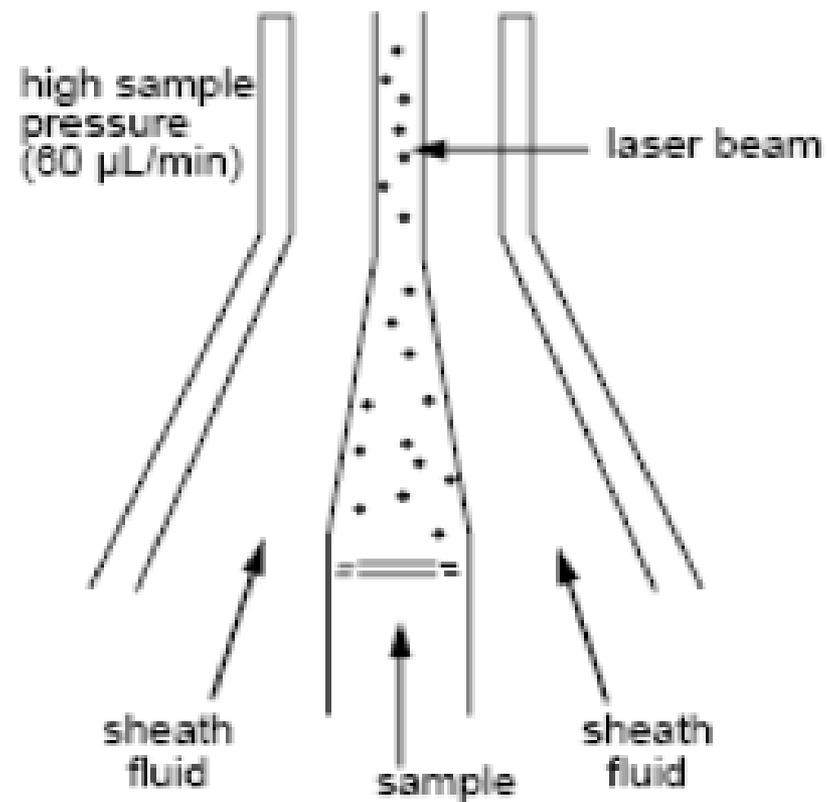
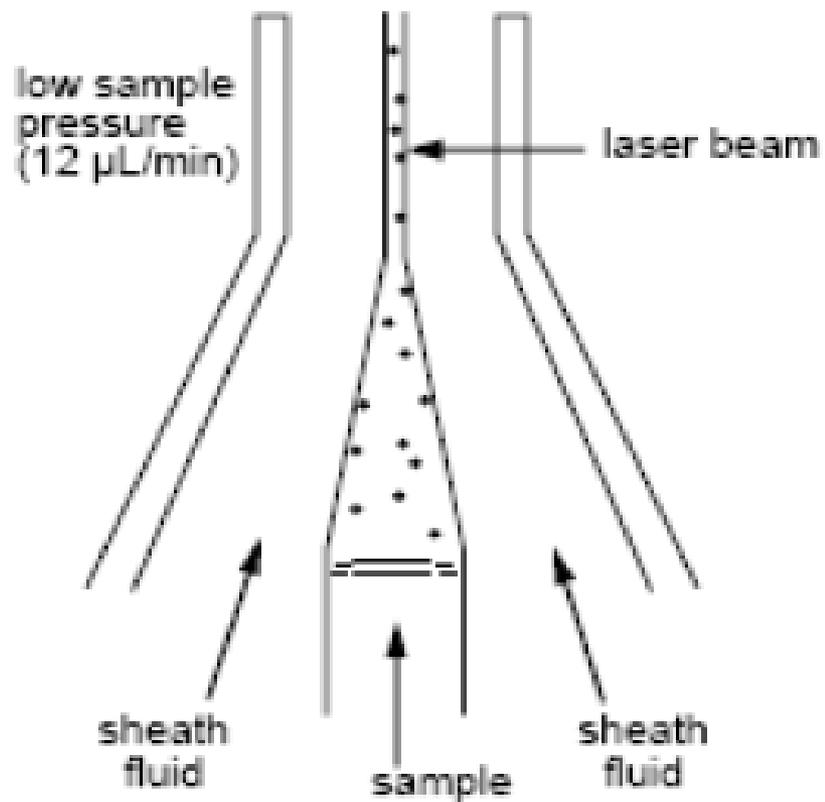
# Flow Cell



Fluorescence signals

Focused laser beam

Sheath fluid



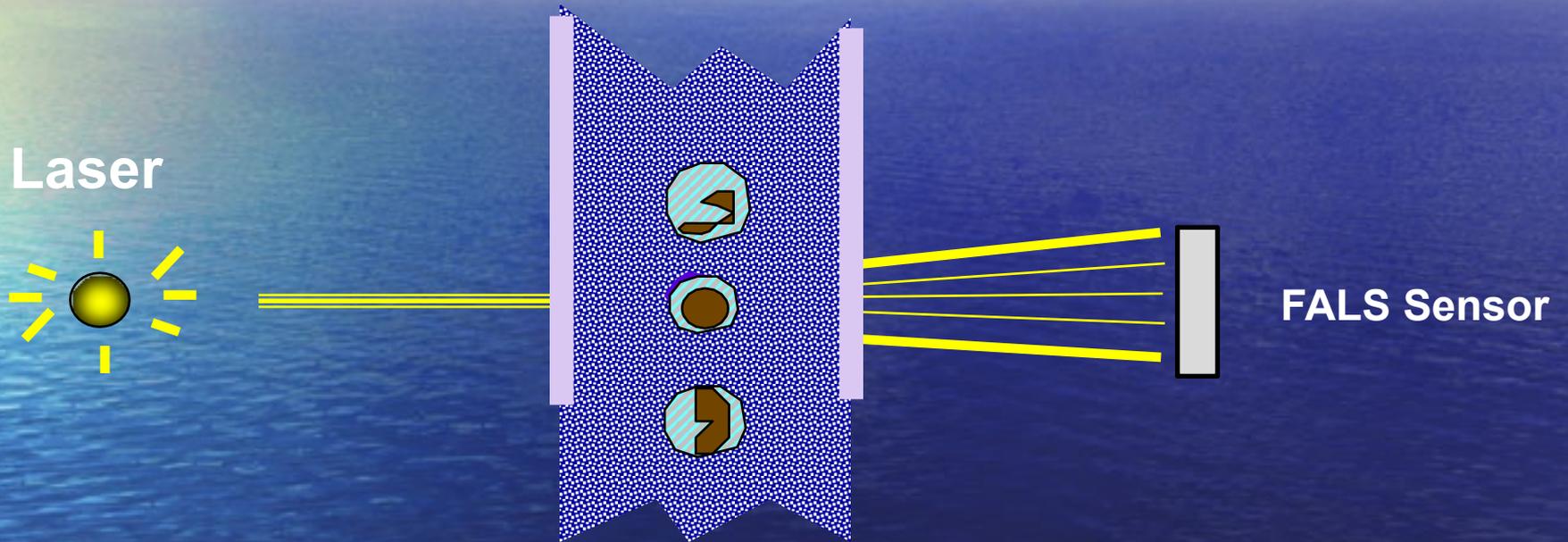
高流速适用于定性测量，如免疫表型。样本流变宽，细胞间距离缩短，这样在单位时间内流经激光照射区的细胞数量增加，可以快速获取数据。

低流速促使样本流变窄，单个细胞得以依次通过，这样大多数细胞可流经激光束的中心，细胞受激光照射的能量比较均一，因而低流速适用于检测分辨率要求高的实验，如DNA分析。

# 散射光信号和荧光信号的检测

- 前向角散射：前向角散射（**FSC**）光与被测细胞的大小和面积有关，检测的是激光束照射方向与收集散射光信号的光电倍增管轴向方向的散射光信号。**FSC**不受细胞荧光染色的影响，常用于免疫表型分析的信号处理。

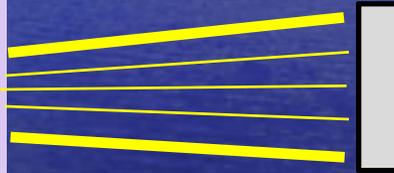
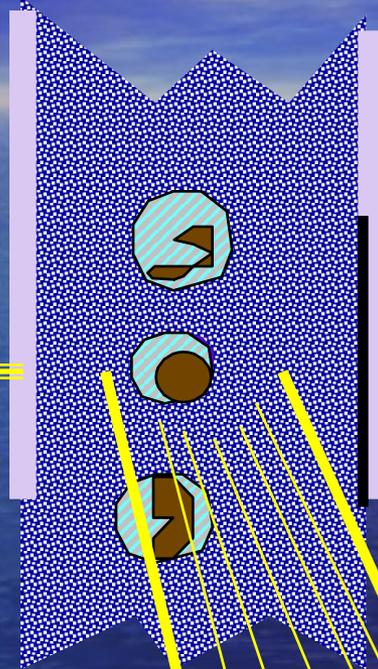
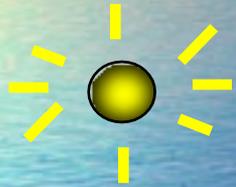
# Forward Angle Light Scatter 前向角



- 侧向角散射：侧向角散射（**SSC**）光与被测细胞的颗粒密度和内部结构有关，对细胞膜、胞质、核膜的折射率更为敏感。**SSC**收集与激光束正交**90**度方向的散射光信号。

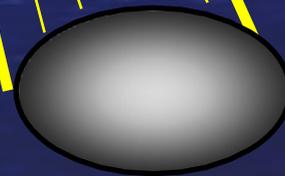
# 90 Degree Light Scatter 90度側向角

Laser



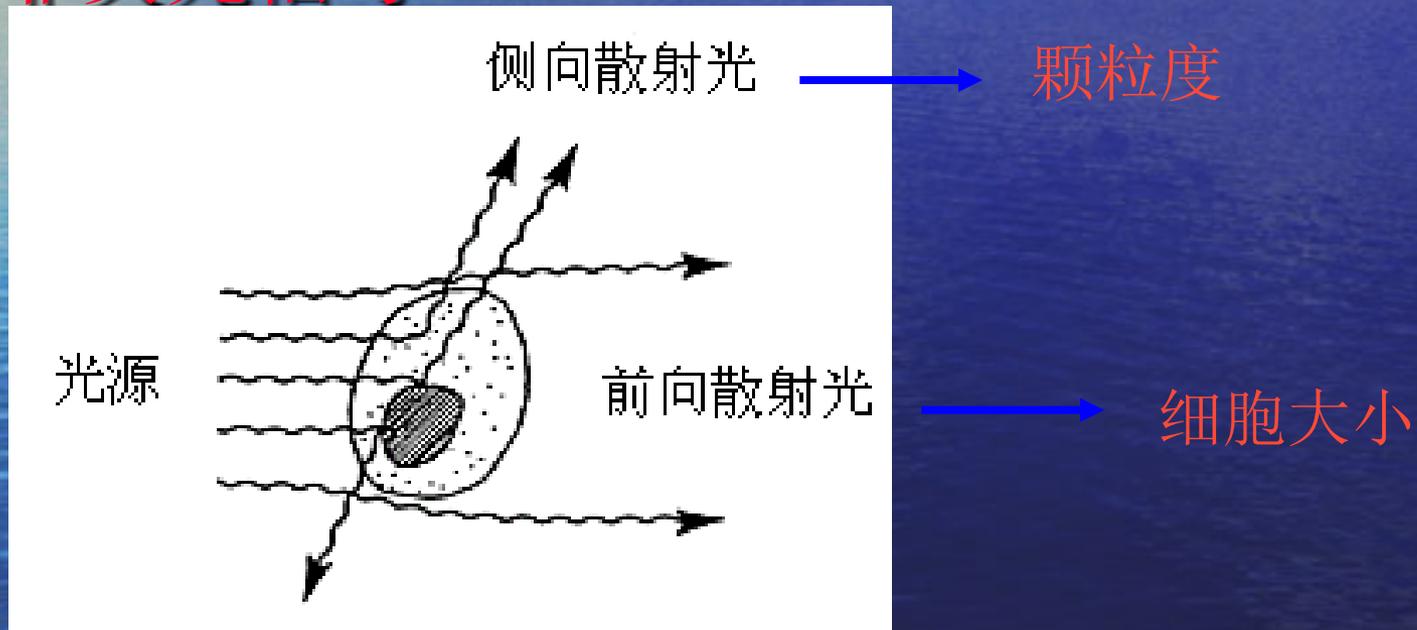
FALS Sensor

90LS Sensor

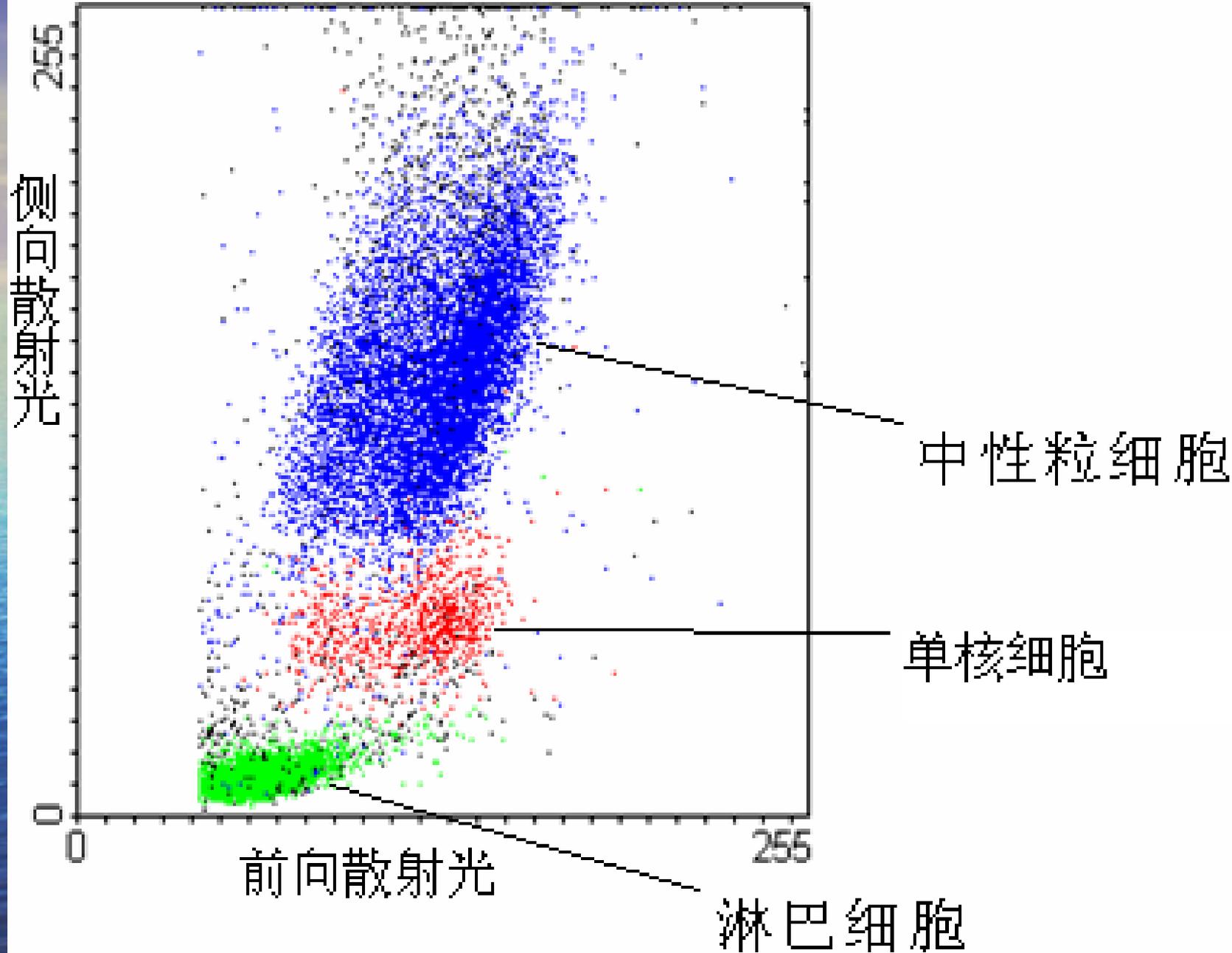


# 流式细胞仪产生的信号

- 非荧光信号



- 上述两种信号都是来自于激光原光束，目前采用这两个参数组合，可区分不同种类的细胞亚群，同时可获得细胞相关的重要信息，下图（图3-2）为FSC和SSC组成的二维散点图，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。



# 荧光信号

- 荧光物质吸收符合其波长范围的光能量，内部电子受激上升到高能级。然后受激电子迅速衰落回基态，释放过剩能量成为光子。这种能量的转换称为荧光。
- 能够激发荧光物质的波长范围称为激发光谱。因为更多的能量消耗在吸收转换而不是荧光转换中，所以发射光波长要高于激发光波长。荧光物质的发射波长范围叫做发射光谱。

- 目前的流式细胞仪大多采用氩离子激光器，因为**488nm**的激光器能够激发一种以上的荧光。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。**FITC**的激发光谱如图**3-3**所示，**488nm**非常接近**FITC**的激发光谱的峰值，所以**FITC**被激发时会表现出最强荧光信号，而当**FITC**被其波谱范围内的其它波长激发时，也会检测到荧光，但信号强度不会这么高。

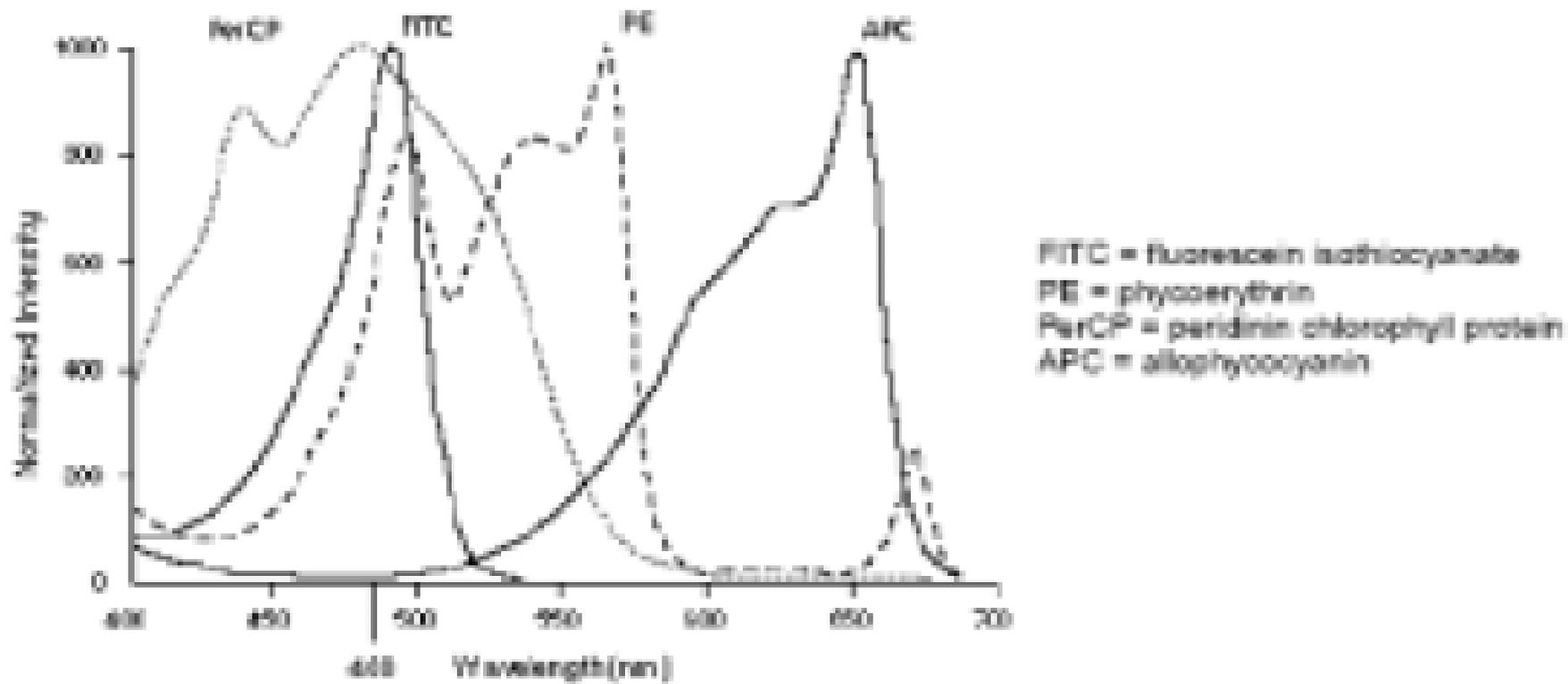


图 3-3 FITC、PE、PerCP、APC 染料的激发光谱

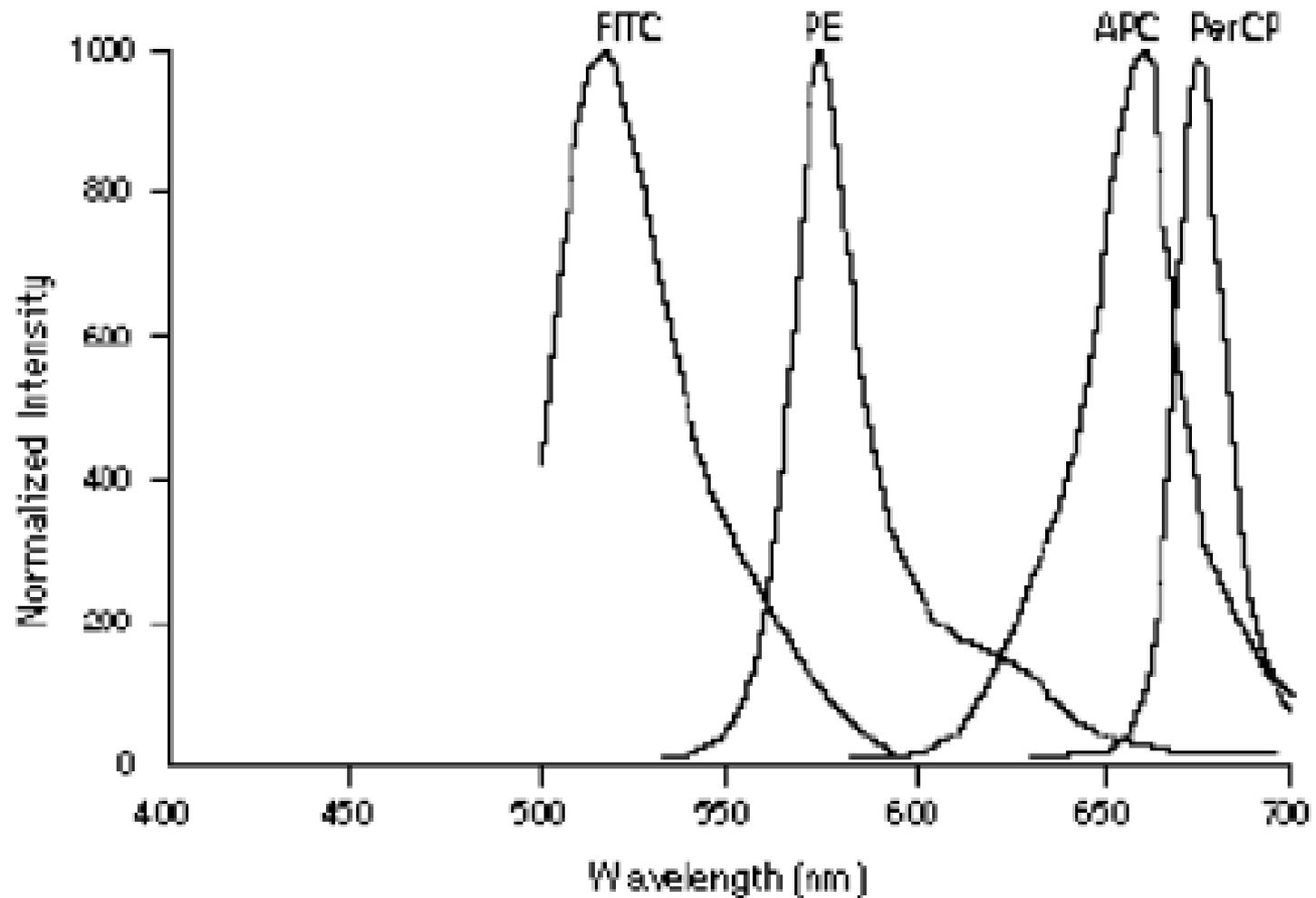
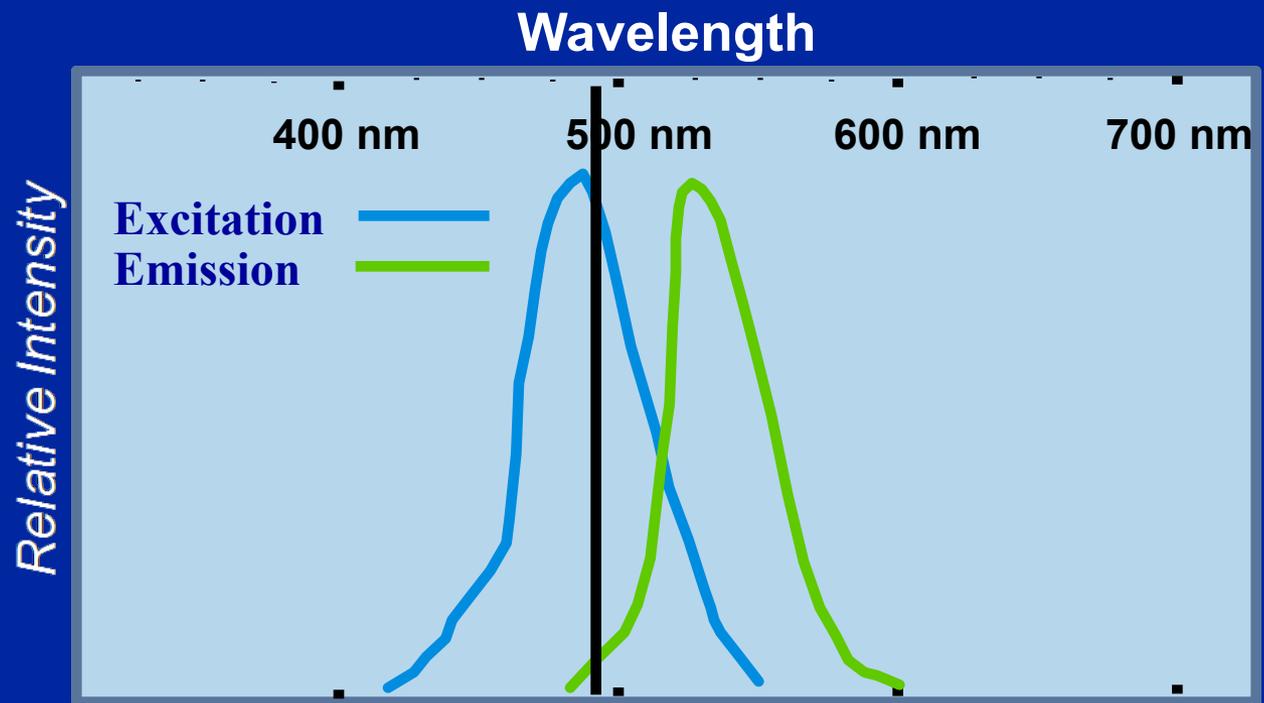
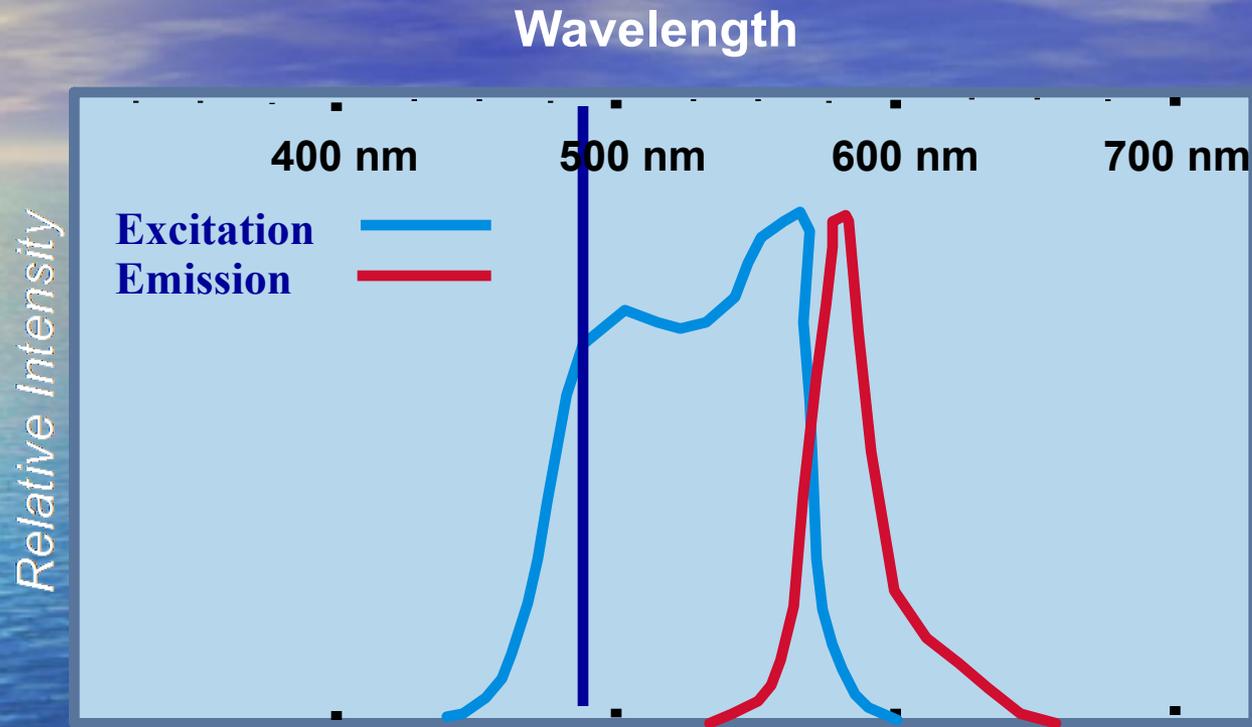


图 3-4 FITC、PE、PerCP、APC 染料的发射光谱



## Fluorescein (FITC)

# Fluorescent Dyes



**Phycoerythrin (PE)**

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/075234321221012012>