

流式细胞术注意事项

技术简介

流式细胞术是对单个细胞或其他生物微粒进行定量分析和分选的一门技术。在分析或分选过程中，包绕在流动液体中处理过的单个细胞或微粒通过聚焦的光源，产生电信号，这些信号代表光散射、荧光等参数，以此测定出细胞或微粒的物理和化学性质，并可根据这些性质分选出高纯度的细胞亚群，以对其进一步的培养或分析。

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。

技术原则

使用各种液体和悬浮细胞样本新鲜，尽快完成样本制备和检测；

针对不同的细胞样本进行适当洗涤、酶消化或 EDTA 处理，以清除杂质，使粘附的细胞彼此分离而形成单细胞状态；

对新鲜实体瘤组织可选用或联用酶消化法，机械打散法和化学分散法来获得足够数量的单细胞悬液；

对石蜡包埋组织应先切成若干 40-50um 厚的蜡片，经二甲苯脱蜡到水后，再用前述方法制备单细胞悬液；

单细胞悬液的细胞数不应少于 10000 个。

注意事项

1 样品处理

在细胞制备、培养阶段，如果该培养细胞是贴壁细胞，需用先用胰酶消化细胞；如果是胸腺、脾脏和淋巴结等外周免疫器官，直接将脏器经钢网研磨即可；如果是实体脏器肺脏、肝脏和肿瘤组织内含有较多的结缔组织，需将脏器剪碎后加入 IV 型胶原酶和 DNA 核酸内切酶消化，消化后的组织再研磨。有严重溶血、凝聚或坏死的样本应弃用。

2 细胞与抗体配比

正常情况下的抗体相对过量或不足，导致假阳性或假阴性结果，根据不同实验样本、厂家推荐方法，调整细胞与抗体用量，得到可用的细胞/抗体比例。

北京百欧泰生物科技有限公司

Tel: 400-669-8850 Email: info@biotyscience.com

Address: 北京市房山区良乡凯旋大街建设路 18 号

3 染色方案

染色方案不合理也可能会导致荧光染色信号太弱；在进行多荧光染色的时候，相同的细胞会因为染色顺序不同而导致荧光强度的差异。

4 抗体选择

根据使用的流式细胞仪性能、激光器、滤光片种类来选择，通用原则是：为表达弱的抗原选择染色指数高的荧光素。一般样品细胞与流式抗体的种属来源是不同的，如标记人的细胞的荧光素偶联抗体一般来源于小鼠，人细胞的 FcR 也不一定能够与小鼠来源的荧光素偶联抗体的 Fc 段结合。

5 细胞系选择

选择合适的细胞系，不同的细胞系由于细胞形态、直径等不同，会对结果的美观程度有一定的影响。

6 对照组设置

阴性对照的设置。如做间接标记法，可设置与一抗无关的实验；假设做直接标记法，可设置理论上的阴性细胞作为阴性对照管。在实验过程中如涉及到表达缺失或减少的实验，应设置阳性对照组，其设置方法与阴性对照设置相同。

解决方法

1 流式细胞术免疫学检测的影响因素和质量控制

确保标本上机检测前的浓度为 1×10^6 细胞/ml，细胞浓度过低直接影响检测结果；

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；

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；

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；

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准确，应用计算机软件，用拟合曲线方法从实验组的曲线中减去对的曲线峰值，得到正确的免疫荧光定量结果。染色后避光，确保免疫荧光定量结果准确性。

2 流式细胞术 DNA 分析技术质控与注意事项说明

新鲜标本避免出血坏死组织；

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：

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，并注意不要损伤细胞；

细胞样品的采集要保证足够的细胞浓度，即 1×10^6 细胞/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，需 20% 以上的肿瘤细胞存在。

石蜡组织片的厚度要适宜，40~50um。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；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。

参考文献

[1] 崔巍. 问:流式细胞术用于细胞周期和倍体分析时的注意事项有哪些?[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(5):1.

[2] Teresa S. Hawley, Robert G. Hawley. 流式细胞术操作规程[M]. 人民军医出版社, 2012.

参考链接

<https://baike.baidu.com/item/%E6%B5%81%E5%BC%8F%E7%BB%86%E8%83%9E%E6%8A%80%E6%9C%AF/7999824?fr=aladdin>

<https://www.biomart.cn/specials/stemcelltech/article/608709>

<https://zhidao.baidu.com/question/2272412556908474588.html>