



## 有关流式细胞术对照物选择和样品制备的提示

在现代生物医学研究中，流式细胞术是一项非常有价值的技术。这项技术广泛用于细胞群的特征和蛋白质标记物的表达分析。但是，欠考虑的实验设计可能会导致实验结果作废。本文旨在为您提供有价值的提示，帮助您设计实验和制备样品。

### 生物实验中的封闭剂

流式细胞实验总结：内容包括流式细胞仪 流程、原理、各种类型的样本操作、样本准备，以同型对照的理解，及不同情况下如何使用封闭剂等。是本人相当一段时间来的收集以及修正的内容。

流式细胞仪 (FCM) 是八十年代集单克隆抗体、荧光化学、激光、计算机等高技术发展起来的一种先进仪器，已广泛应用于免疫学、生物化学、生物学、肿瘤学以及血液学等方面的研究和临床常规工作。其中检测人白细胞表面标志可对白血病、淋巴瘤作用迅速正确的诊断，对淋巴细胞群和亚群进行精确分类，还能分离纯化某一群或亚群细胞。活细胞免疫荧光技术是用于 FCM 检测的标本准备，染色后也能在荧光显微镜下进行观察，在某些实验条件下，活细胞免疫荧光染色后的特异性和敏感性要优于滴片固定的常规间接免疫荧光的结果。

#### (一) 原理

活细胞表面保留有较完整的抗原 或受体，先用特异性鼠源性单克隆抗体与细胞表面相应抗原结合，再用荧光标记的第二抗体结合，根据所测定的荧光强度和阳性百分率即可知相应抗原的密度和分布。

#### (二) 操作步骤

制备活性高的细胞悬液(培养细胞系、外周血单个核细胞、胸腺细胞、脾细胞等均可用于本法)

↓

用 10%FCS RPMI1640 调整细胞浓度为  
 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7 / \text{ml}$

↓

取  $40 \mu\text{l}$  细胞悬液加入预先有特异性 McAb ( $5 \sim 50 \mu\text{l}$ )  
的小玻璃管或塑料离心管，再加  $50 \mu\text{l}$  1:20(用 DPBS  
稀释)灭活正常兔血清

↓  $4^\circ\text{C}$  30min

用洗涤液洗涤 2 次，每次加洗涤液 2ml 左右  
1000rpm×5min

↓

弃上清，加入  $50 \mu\text{l}$  工作浓度的羊抗鼠  
(或兔抗鼠) 荧光标记物，充分振摇

↓  $4^\circ\text{C}$  30min

用洗涤液洗涤 2 次，每次加液 2ml 左右  
1000rpm×5min

↓

加适量固定液(如为 FCM 制备标本，一般加入  
1ml 固定液，如制片后在荧光显微镜 下观察，  
视细胞浓度加入  $100 \sim 500 \mu\text{l}$  固定液)

↓



FCM 检测或制片后荧光显微镜下观察

(标本在试管中可保存 5~7 天)

### (三) 试剂和器材

1. 各种特异性单克隆抗体。
2. 荧光标记的羊抗鼠或兔抗鼠第二抗体，灭活正常兔血清。
3. 10% FCS RPMI1640, DPBS、洗涤液、固定液。
4. 玻璃管、塑料管、离心机、荧光显微镜等。

### (四) 注意事项

1. 整个操作在 4℃ 下进行，洗涤液中加入比常规防腐剂量高 10 倍的 NaN<sub>3</sub>，上述实验条件是防止一抗结合细胞膜抗原后发生交联、脱落。
2. 洗涤要充分，以避免游离抗体封闭二抗与细胞膜上一抗相结合，出现假阴性。
3. 加适量正常兔血清可封闭某些细胞表面免疫球蛋白 Fc 受体，降低和防止非特异性染色。
4. 细胞活性要好，否则易发生非特异性荧光染色。

附：

1. DPBS (×10, 贮存液)

NaCl 80g

KCl 2g 蒸馏水加至 1000ml

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11.5g 临用时用蒸馏水 1 : 10 稀释

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g

2. 洗涤液

DPBS 900ml

FCS 50ml (终浓度 5%)

4%NaN<sub>3</sub> 50ml (终浓度 0.2%)

3. 固定液

DPBS 1000ml

葡萄糖 20g (终浓度 2%)

甲 醛 10ml

NaN<sub>3</sub> 0.2g (终浓度 0.02%)

### (一) 不同来源样品的处理

1. 培养细胞

(1) 培养细胞用 0.25% 的胰酶消化。

(2) PBS 或生理盐水洗涤细胞 2 次，再用 PBS 或生理盐水悬浮细胞，加入预冷的无水乙醇，终浓度为 60%~70%，快速混匀，并用封口膜封口，置 4℃ 下可保存 15 天左右。

2. 新鲜标本

(1) 将标本切成 1~2mm<sup>3</sup> 的小块。

(2) PBS 或生理盐水清洗后去除上清，加入 0.2% 胶原酶 (或 0.15% 胰蛋白酶) 37℃ 消化 10~30min (根据实验及不同组织确定)，并不断振动。

(3) 300 目尼龙筛过滤，除去组织团块，PBS 洗涤 2 次，300g 离心 5min，获得已消化的细胞。

3. 石蜡包埋标本

(1) 标本在切片机上切取 3~5 片 50 μm 厚的组织片。

(2) 将切片彻底脱蜡，梯度乙醇 (100%、95%、70%) 及蒸馏水水化。

(3) 0.5% 胃蛋白酶 (或胰蛋白酶) 37℃ 消化 30min，每隔 10min 振动 1 次。

(4) 300 目尼龙筛过滤，获得的细胞悬液 PBS 洗涤 2 次，300g 离心 5min。



注意：脱蜡一定要完全（若加入 100%乙醇无絮状物飘起即可）；切片厚薄适宜，太薄碎片多，影响 FCM 分析结果，太厚易造成脱蜡不净；注意掌握消化时间，避免已释放的细胞被消化。

### (二) 直接免疫荧光标记的样品制备

用标有荧光素的特异抗体对细胞进行直接染色，然后用流式细胞仪检测，阳性者即表示有相应抗原存在。实验步骤如下：

1. 每份取 100  $\mu$ l 单细胞悬液（细胞密度约  $1 \times 10^6$  个细胞）。
2. 一份加入相应量的 FITC 或 PE 标记的特异性荧光直标单抗，另一份加入荧光标记的无关单抗，作为同型对照样品。
3. 室温下避光反应一定时间（时间长短根据试剂说明书要求进行），一般在室温下反应 15~30min 即可。
4. 加入 500  $\mu$ l PBS 重悬成单细胞悬液即可上机检测。

### (三) 间接免疫荧光标记的样品制备

1. 取  $1 \times 10^6$  个细胞/100  $\mu$ l，先加入一抗混匀，置室温下避光反应 30min。
2. 用 PBS 洗涤细胞 2 次，离心沉淀弃掉上清液（离心转数一般为 800~1000rpm，5min）。
3. 用 100  $\mu$ l PBS 重悬细胞，再加入 FITC 或 PE 标记荧光二抗（用量均按说明书要求加入）混匀，室温下反应 30min。
4. 用 PBS 再洗涤细胞 2 次，加入 500  $\mu$ l PBS 重悬成单细胞悬液，上机检测。

注意：以上两种染色方法的抗体加入量和反应时间，一般根据试剂使用说明书的要求进行。若说明书上未说明，应先进行预实验，掌握好剂量与最佳反应时间后，再进行流式样品的制备。制备好的样品，若不能及时上机检测，用 1%~4%的多聚甲醛固定，4℃下可保存 5 天。

### (四) DNA 荧光染色的样品制备

DNA 是细胞内含量比较恒定的参量，随着细胞增殖周期的各时相而发生变化。荧光染料（如 PI）可选择性地定量嵌入核酸（DNA/RNA）的双螺旋碱基之间，与细胞特异性结合，DNA 含量与荧光染料的结合量成正比，因此通过测定荧光强度可获知细胞的增殖情况。

1. 将固定过的细胞离心（500~1000rpm，5min）弃上清液，再用 PBS 洗涤 2 次。
2. 用 PBS 调整细胞浓度，每份为  $1 \times 10^6$  个细胞/100  $\mu$ l。
3. 加入 1000  $\mu$ l DNA 荧光染料（通常用 Coulter 公司提供的 DNA 染色试剂盒），室温下避光染色 15 min。
4. 上流式细胞仪检测。

以上样品的制备可分析细胞周期各时相的百分比，同时可粗略观察有无凋亡细胞现象，如果用对照液（鸡红细胞）作参照标准，可进行细胞 DNA 倍体分析，通过 DNA 指数（DNA index, DI）衡量 DNA 的相对含量，DI 可用下式计算：

DI = 样品 G0/G1 期的均值 / 正常二倍体细胞 G0/G1 期均值

### (五) 细胞凋亡检测样品的制备

根据实验方案诱导细胞凋亡，制备单细胞悬液，使用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒，通过 Annexin V 抗体与磷脂丝氨酸（PS）的特异性结合来检测细胞凋亡的情况。

1. 将 10 $\times$  的结合缓冲液用蒸馏水稀释成为 1 $\times$ ，冰育。
2. 悬浮细胞在低温环境中，用 PBS 洗涤细胞 2 次（800~1000rpm 离心，5min）。
3. 弃上清，加入 490  $\mu$ l 预冷的结合缓冲液重悬细胞（细胞浓度为 105~106/ml）。
4. 加入 5  $\mu$ l Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ l PI 于细胞悬浮液中，轻轻混匀。
5. 将试管置于冰上，避光孵育 10 分钟。
6. 上 FCM 检测。

### (六) 微量全血法免疫荧光标记的样品制备



目前制备全血细胞样品的方法很多，且很成熟，常用的方法是用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞，然后进行特异性荧光染色，其染色方法与前面介绍的方法相同。下面主要介绍与流式细胞仪配套的 Q-PREP (免疫学样品处理器) 进行快速制备微量全血样品的方法。

### 1. 微量全血直接荧光染色法

- (1) 取肝素或 EDTA 抗凝全血 (100  $\mu$  l/份)，置 12 $\times$ 75mm 专用塑料试管中。
- (2) 每份加入 20  $\mu$  l 特异性荧光单抗，另一份加入荧光标记的无关单抗作同型对照，室温下避光染色 15min。
- (3) 置 Q-PREP 仪上溶解红细胞、稳定和固定白细胞，静置 5min。
- (4) 上流式细胞仪检测。

### 2. 微量全血间接荧光染色法

- (1) 取肝素或 EDTA 抗凝全血 (100  $\mu$  l/份)，置 12 $\times$ 75mm 专用塑料试管中。
- (2) 加入 50  $\mu$  l 特异的单克隆抗体 (一抗)，室温下孵育 30min。
- (3) 置 Q-PREP 仪上溶解红细胞，稳定和固定白细胞。
- (4) 离心 (800~1000rpm, 5min) 弃上清液，用 PBS 洗涤细胞 2 次。
- (5) 加入 50  $\mu$  l 荧光 (FITC 或 PE) 标记的第二抗体，室温下避光染色 30min。
- (6) 上流式细胞仪检测。

### 3. 注意事项

- (1) 新鲜全血一般室温下放置 8 小时以内可以使用，时间过长会使活性降低，影响测定结果。
- (2) 抗凝血应保证无血块凝集。
- (3) 全血加入试管中时，应尽量避免加到试管壁上，如沾到了管壁上必须用棉签擦净，否则会影响细胞二维点图的细胞群的分离效果。

## (七) 样品制备应注意的问题和影响因素

### 1. 样品制备应注意的问题

- (1) 单细胞悬液的制备是流式细胞术分析的关键。如遇有细胞团块应先用 300~500 目的细胞筛网过滤后，再上机检测。
- (2) 标本采集后要及时固定或深低温保存，手术切除的新鲜标本或活检针吸标本取材时，要避免出血与坏死组织。
- (3) 免疫荧光标本应注意死细胞和碎片的去除，要求每份样品中杂质、碎片、团块重叠细胞应 <2%，尤其是稀少细胞或细胞亚群的测定时，否则这些细胞的非特异性荧光增加，会干扰免疫荧光测定。
- (4) 细胞样品的采集要保证足够的细胞浓度，一般每份样品要求的细胞数为  $5 \times 10^5/\text{ml} \sim 1 \times 10^6/\text{ml}$ ，对肿瘤细胞 DNA 异倍体的样品分析，至少应有 20% 的肿瘤细胞存在 (占主峰 1/5 以上的异倍体才可确认为异倍体峰)。
- (5) 石蜡包埋组织单细胞制备时要注意：选取含待测细胞丰富的区域；石蜡组织片的厚度要适宜，最好为 40~50  $\mu\text{m}$ ；彻底脱蜡，以免残留的石蜡影响酶的消化活性；充分水化，使组织还原到与新鲜组织相似的状态。

### 2. 影响样品制备的因素

- (1) 温度对荧光强度的影响：一般认为，温度升高时荧光减弱，所以在荧光测量时要保持染色后的样品在适当低温环境下进行，并尽可能减少样品的光照射时间。有条件时，应使样品观察室做到恒温装备，使温度对荧光染色的影响减少到最小，会得到更好的荧光定量测定的结果。
- (2) pH 值对荧光强度的影响：每一种荧光染料分子发光的最高量子产额，都有自己最适合的 pH 值，以保持荧光染料分子与溶剂间的电离平衡，如果 pH 值发生改变，可能造成荧光光谱



的改变，如 FITC 在酸性溶剂中呈蓝色荧光，为阳离子发光；在碱性溶剂中呈黄绿色荧光，为阴离子发光。

#### 同型对照

1、同型对照不是万能的。同型对照虽然与试验抗体是同种型，而且具有相同的荧光标记，但不一定是同一厂家生产的，肯定不是同一批次的，也很难保证每个抗体上标记的荧光分子的数目是相同的，所以很多情况下发现用同型对照调的参数并不合适。

2、是否需要同型对照取决于要检测的指标。

(1) 对于一些细胞特异性的亚群标志，比如 CD3/4/8 这些，对于某一细胞来说它或者表达，或者不表达，这时只要抗体和标记技术没问题都会清晰分群，无需同型对照，甚至不需要阴性对照。

(2) 某些分子在细胞上原本不表达，或表达极低，加入处理因素后表达明显上调，这种通常也能明显分群，也不需要同型对照，但要有未加处理因素的阴性对照。检测细胞表面活化分子的表达，细胞内因子检测等通常是这种情况。

(3) 如果细胞群中大部分细胞都表达要检测的目标分子，只是有的表达高些，有的表达低些，通常细胞不能明显分群。此时通常需要同型对照做参考，虽然它也不一定百分之百正确。

IgG-FITC 同型 (IgG1 or IgG2a or IgG2b, etc.)

#### 封闭情况

对于表面分子，可以不设同型对照，对于细胞内细胞因子，应设同型对照，有利于对照阳性染色是否成功，以及分析时设定 gate。如果是 mice cell，实在不设也可以，目前为止，我看 Isotype 似乎都没反应。

如果严谨的做流式，都是应该做同型对照的，据我们自己做的经验，特别是以下几种情况最好是做同型对照：

1 自己标记的抗体：许多做单抗实验室自己标记抗体的（国内许多数一数二的抗体实验室在内），但这种自己标记的抗体，我们做同型对照经常会与不做同型有很大的区别

2 一些表达比较低的分子：有些表达比较低的分子，特别是表面分子，做同型后的结果甚至会出现阳性与阴性之间的明显差异，这种事我们也经历过多次了。

荧光标记一抗的同型对照抗体只是缺了决定特异结合的 Fc 段。非荧光标记一抗的同型对照更简单，就是荧光二抗。

封闭 (blocking) 是继包被之后用高浓度的无关蛋白质溶液再包被的过程。抗原或抗体包被时所用的浓度较低，吸收后固相载体表面尚有未被占据的空隙，封闭就是让大量不相关的蛋白质充填这些空隙，从而排斥在 ELISA 其后的步骤中干扰物质的再吸附。

封闭的手续与包被相类似。最常用的封闭剂是 0.05%–0.5% 的牛血清白蛋白，也有用 10% 的小牛血清或 1% 明胶作为封闭剂的。脱脂奶粉也是一种良好的封闭剂，其最大的特点是价廉，可以高浓度使用 (5%)。高质量的速溶食用低脂奶粉即可直接当作封闭剂使用，但由于奶粉的成份复杂，而且封闭后的载体不易长期保存，因此在试剂盒的制备中较少应用。

脱脂牛奶，BSA，或者 FCS，在 ELISA 及 WB 中用它们主要有两个原因：

一是它们做为惰性蛋白，用来封闭酶标板或膜上的蛋白结合位点，使其后的蛋白不会因为非特异结合而影响本底（即所谓封闭）；

二是在抗体等蛋白稀释到很低浓度时会不稳定，它们可以起到保护，或稳定的作用，基本上可以理解为竞争关系。

封闭是没有特异性的，所有的抗原表位都被结合了。

但非特异性结合容易被竞争替换，而特异性结合很难被竞争替换。

所以封闭主要是针对一抗的，没有对二抗封闭的。



技术电话：010-58435458

