

· 专论与综述 ·

流式细胞仪的原理、应用及最新进展*

赵书涛^{1,2} 武晓东^{3△} 王 策³ 陈永勤³ 唐玉国^{1,3△}

(1 中国科学院 长春光学精密机械与物理研究所 吉林 长春 130033 ; 2 中国科学院 研究生院 北京 100049 ;

3 中国科学院 苏州生物医学工程技术研究所 江苏 苏州 215163)

摘要 流式细胞术是一种采用激光束激发单行流动的细胞,对它的散射光和携带的荧光进行探测,从而完成细胞分析和分选的技术。以流式细胞术为核心技术,流式细胞仪集光学、电子学、生物学、免疫学等多门学科和技术于一体,能够高效分析微小颗粒(如细胞、细菌)的先进科技设备。它对社会产生了深远的影响,成为了科学研究的必要工具。最近几年,流式细胞仪取得了长足进步。为了深入的了解它,本文从流式细胞仪的工作原理和技术指标,在临床医学、生物学、生殖学和制药学中的应用,以及它的世界格局、仪器功能的最新进展三方面,进行了简明、扼要的论述。展望未来,功能专业化、自动化,体积小型化,多色多参数分析能力提高和分析分选速度更快成为流式细胞仪发展的趋势。

关键词 流式细胞仪 格局 多色多参数 自动化 专业化

中图分类号 :Q2-33 **文献标识码** :A **文章编号** :1673-6273(2011)22-4378-04

Principles, applications and latest developments of flow cytometer*

ZHAO Shu-tao^{1,2}, WU Xiao-dong^{3△}, WANG Ce³, CHEN Yong-qin³, TANG Yu-guo^{1,3△}

(1 Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun, 130033, China;

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3 Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Suzhou 215163, China)

ABSTRACT: Flow cytometry is a technology which can be used to do cell analysis and sorting from light scatter and fluorescent light generated from the cells when they pass through the laser light in line. Based on flow cytometry as the core technology, flow cytometer, integrating optics, electronics, biology, immunology, etc. is an advanced instrument for analyzing microparticles such as cells, bacteria with high efficiency. It has been a necessary tool for our scientific research and a great progress has been made on it in recent years. In order to get a better insight into it, we simply explain its principles and technical criteria; applications in clinical medicine, biology, reproductive medicine and pharmacology; its world situation and new advances. In the future, specialization, automation, miniaturization, multi-color multi-parameter analysis and faster analysis and sorting will be trends for the flow cytometer.

Key words: Flow cytometer; Situation; Multi-color multi-parameter; Automation; Specialization

Chinese Library Classification: Q2-33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)22-4378-04

前言

流式细胞术是一种对快速直线流动状态中的单列细胞或生物颗粒进行逐个、多参数、快速的定性、定量分析或分选的技术,具有检测速度快、测量参数多、采集数据量大、分析全面、分选纯度高、方法灵活等特点,已经成为近代科学研究中的热门专题,研究它的论文数量也在逐年上升(见图1)。流式细胞仪(flow cytometer, FCM)是以流式细胞术为核心技术,集光学、电子学、流体力学、细胞化学、生物学、免疫学以及激光和计算机等多门学科和技术于一体的先进科学技术设备。它被广泛应用于临床医学、细胞学、生物学、微生物学、制药学、生殖学等领

域,是现代科学研究中的先进仪器之一,被誉为实验室的“CT”^[1-4]。

1953年, Parker和Hutcheon描述一种全血细胞计数器装置,成为流式细胞仪的雏型;1969年, Van Dilla Fulwyler发明第一台荧光检测细胞计;1975年, Kochler和Milstein提出单克隆抗体技术,为细胞研究中大量的特异性免疫试剂的应用奠定基础;鉴于商业仪器的发展,1983年, Shapiro认为多参数分析流式细胞仪可以实现。从那时起,流式细胞仪进入一个快速发展的时期。到目前为止,一些高端的流式细胞仪能够同时测量10-15个荧光信号和多种散射光信号。

* 基金项目:中国科学院知识创新重要方向项目(No. KG CX2-YW-912) 科技部 863 项目(No. 2011AA02A106)

作者简介:赵书涛(1982-),男,博士生,主要研究方向:光谱学、流式细胞仪, E-mail: zhaoshutao2002@163.com

△通讯作者:武晓东,电话:0512-69588016, E-mail: wuxiaodong2000@hotmail.com

唐玉国,电话:0512-69588016, E-mail: tangyg@yiliaoyiqi.com

(收稿日期:2011-04-05 接受日期:2011-05-12)

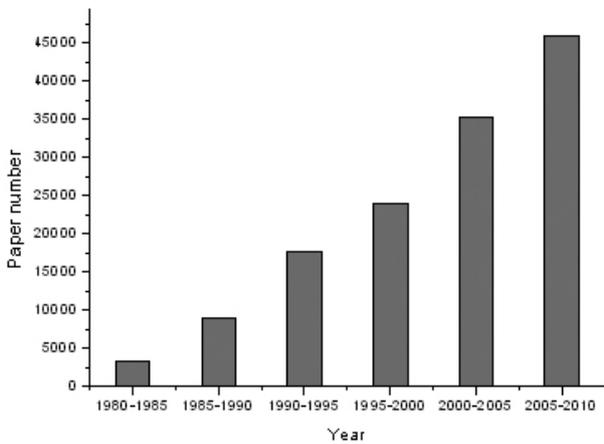


图 1 在 PubMed 中用关键词 "流式细胞术" 搜索的文献数

Fig. 1 Publications using the keyword "flow cytometry" from PubMed.

1 流式细胞仪的工作原理和技术指标

1.1 流式细胞仪工作原理

图 2 为流式细胞仪基本结构。它主要有四部分组成：流动室和液流系统、光源与光学系统、信号收集与信号转换系统、计算机与分析系统。具有分选功能的流式细胞仪还包括分选系统。将待测细胞荧光染色后制成单细胞悬液，在鞘液的包裹下单行排列，依次通过流动室检测区域。以激光作为激发光源，垂直照射检测区域的样品流，被荧光染色的细胞在其照射下产生散射光和激发荧光，它们同时被前向光电二极管和侧向 90° 方向的光电倍增管接收。前向小角度的光散射信号 (forward scatter, FSC) 反映了细胞体积的大小，侧向 90° 方向的光散射信号 (side scatter, SSC) 反映了细胞内颗粒的复杂情况。激发荧光信号代表了所标记的被测细胞内部颗粒的信息。这些光信号转化成电信号，被传送到计算机，经 A/D 转换器传输到微机处理器形成数据文件，保存到计算机上，以备脱机后的数据处理和分析。细胞的分选是将待测液滴充以正负不同的电荷，让其在高压电场的作用下偏转，落入不同的收集容器中，从而实现细胞的分离。

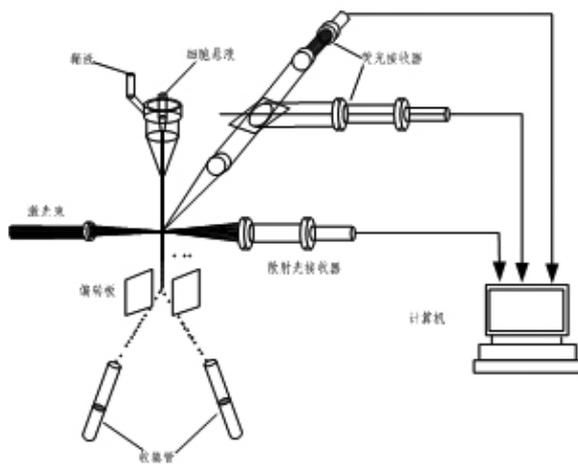


图 2 流式细胞仪结构示意图

Fig. 2 Schematic diagram of flow cytometer

1.2 流式细胞仪性能的技术指标

流式细胞仪性能的技术指标主要有荧光分辨率、荧光灵敏度、分析参数多少及分析、分选速度及纯度等。荧光分辨率是指分辨两个相邻峰的最小距离，通常用变异系数 (CV 值) 来表示。现在市场上主流型号的荧光分辨率小于 2.0%，有的甚至在 1% 之内。荧光灵敏度反映了仪器探测最小荧光光强的能力，一般用荧光微球上可测出的荧光 (FITC) 的最小分子数来表示。目前仪器可以达到 100 以内。一般分析速度为 500-10000 个细胞 /s，分选速度控制在 1000 个细胞 /s 以下，分选纯度 >98%，有的仪器 (如 MoFlo High-Performance Cell Sorter) 分析速度可达 100000 个细胞 /s，分选速度可达 70000 个细胞 /s，分选纯度 >98%。应用方向不同，分析参数的多少差异较大，少的 (如 Guava PCA-96) 可以分析 3 个荧光参数和 1 个散射信号，多的 (如 CyFlow SL) 可以分析 13 个荧光参数和 3 个散射信号。

2 流式细胞仪的应用

2.1 在临床上的应用

细胞癌变过程中伴随细胞 DNA 含量的改变，DNA 非整倍体细胞是恶性肿瘤的特异性标志。流式细胞仪的 FSC 能够给出这些信息，在肿瘤的早期诊断和鉴别诊断中有着很重要的作用；早在 80 年代人们发现特定 T 细胞亚群可以反映 AIDS 患者的临床状态，而流式细胞仪可以对这些 T 细胞亚群进行检测，为 AIDS 的诊断、治疗提供有用信息^[1]。流式细胞仪借助于各种荧光染料测定一个细胞的多种参数完成白血病及淋巴瘤的诊断，准确率达 90% 左右，较传统形态学检查准确性提高 10%-20%。流式细胞仪对淋巴细胞及其亚群数量的检测，可以探索疾病的发病机理、病程、预后，指导临床治疗方案。

2.2 在生物学及微生物学上的应用

从早期到现在，在细胞及细胞器方面很多已被人们所接受的科技，都经流式细胞仪研究过。在细胞功能的早期研究中，研究者仅能通过观测微生物的吞噬来研究噬中性粒子，而流式细胞仪可以通过它们的大小、形状、抗体及吞噬过程中微生物种类、数量的变化更深入的辨别、研究这些噬中性粒子、氧自由基的实时、单细胞繁殖评价、DNA 倍体分析、细胞循环中细胞增殖和凋亡分析等都会用到流式细胞仪^[2]。流式细胞仪对细胞周期可以轻松分析，促进了以此为基础的细胞学的发展，辅以成像仪器，流式细胞仪可以对微生物的成长、繁殖进行 3-D 研究^[3]。

2.3 在生殖学及制药学上的应用

利用对精子 DNA 进行无害标定的 DNA 染料 (如 Hoechst 33342) 或 H-Y 抗体都可以对精子进行检测和分类，完成生殖学上的要求^[4]。FCM 检测肿瘤细胞的耐药相关蛋白的表达水平，对检测临床肿瘤化疗效果及药物的选择有一定的意义。此外，流式细胞仪在细胞毒、可溶性蛋白质分子、钙离子浓度检测等都有很广泛的用途。

此外，流式细胞仪在细胞毒、可溶性蛋白质分子、钙离子浓度检测等都有很广泛的用途。

3 流式细胞仪的世界格局及最新发展

3.1 流式细胞仪的世界格局

目前流式细胞仪生产厂家主要有 BD、Beckman Coulter、

Partec、Guava、Union Biometrica、ABI、Amnis 等等。在目前的流式细胞仪市场中,资源出现新的整合和优化,如 2007 年 Beckman Coulter 收购丹麦 Dako 公司的流式细胞仪产品业务,2009 年 Millipore 收购 Guava 公司。与此同时,一些新兴的公司,比如 Accuri Cytometers 和 Amnis 开始成立。美国 BD、Beckman Coulter 和德国的 Partec 无疑占领着流式细胞仪市场的统治地位,其它的公司依靠自己的特色产品在夹缝中生存。BD、Beckman Coulter 产品型号种类比较齐全,在市场中占有较大份额,既有 FACSCount、Cytomics FC500 经济普及型流式细胞仪,也有 BD FACSAria、EPICS 大型科研型流式细胞仪,它们的产品价格昂贵,我国使用的单位基本上是科研机构。Partec 产品结构紧凑,造价低,便于携带,适合边远地区和发展中国家,在植物学的研究中占有较大份额。Partec 公司的 CyFlow 于 2004 年 1 月进入太空站用于研究工作,成为世界上首台升上太空的流式细胞仪,证明其结构紧凑、性能优越的特点。Guava 公司研发了世界上第一台商业用途的微毛细管式流式细胞仪,适用于更小体积样本,需要更低操作成本。Union Biometrica 公司的 COPAS 是市面上唯一能够分选 20-1500 生物颗粒的流式细胞仪,能够分选果蝇、蚊子、斑马鱼等的卵和幼虫,采用的是气流分选,避免了传统电磁场分选对生物活体的致命影响。Attune 是 ABI 公司推出的史上第一台用声波来精确控制细胞移动的流式细胞仪,具有高样品通量、灵敏度和准确性,它的样品量为 1ml/分钟远大于市场最快的 160/分钟。Amnis 公司 ImageStream 100 将流式多色检测技术和荧光显微镜图像显示技术集中到一个平台上提供了全新的细胞分析方法。

国内流式细胞仪的研发起步晚,处于追赶阶段。中科院生物物理研究所、浙江大学、上海理工大学、厦门大学等都在做这方面的研究工作,只是处于研发阶段,尚未有成型商品推向市场。自 1981 年,北京师范大学生物系引进中国第一台流式细胞仪(FACS III, BDIS)至今,流式细胞仪的需求量与日俱增,除用于纯科研领域,更多将被用于临床实验上,这对中国流式产业的发展是一次机遇和挑战。

3.2 流式细胞仪的最新发展

3.2.1 仪器功能专业化 Partec CyFlow、BD FACSCount 可以实现 CD4、CD8、CD3 绝对计数,用于 HIV 检测的经济普及型流式细胞仪。CytoBuoy 公司生产多种用于水体微型生物分析的流式细胞仪,如 CytoBuoy 可安放在浮标上;CytoSub 可在水下 200 米使用,具有特殊的耐压装置,以及内部鞘液循环处理装置,不需外部加入鞘液,CytoSense GV 装有特殊的压力模块,可除去蓝细菌的空胞。Bentley Instruments 公司、Delta Instruments 公司和 FOSS Electric 公司专门设计提供奶牛场使用的专项检测仪,BioDETECT 公司的 Yeastocyte 则是专用于酵母计数与活性分析。Union Biometrica 公司的 COPAS 能够分选果蝇、蚊子、斑马鱼等的卵和幼虫(20-1500)。

3.2.2 仪器全面自动化 免疫标本制备仪、组织样本制备仪和样品前处理仪在实验中得到广泛应用。不同规格的多孔板或多试管自动进样器加速了自动化进程。Epics XL、FACSCalibur 等主流厂家仪器都实现了自动化。

3.2.3 多色多参数分析迅速发展,分析、分类速度加快 新兴荧

光探针的不断开发和仪器软、硬件的逐步更新,流式细胞仪的多色荧光分析得到了迅速发展,对细胞亚群的识别更准确、更精细。一种激光(如 488nm 激光)同时激发多种荧光材料,目前已出现 488nm 单激光激发 5 色到 7 色的仪器,如 BD FACSAria 和 LSRII, Beckman Coulter FC500 和 CyAn ADP 等,多种激光激发多种荧光染料,如 Partec CyFlow ML 采用 5 种激光激发 13 色荧光实现 16 个参数的分析。随着细胞分选系统的发展,流式细胞仪的分析、分选速度明显加快,如 BD FACSAria 获取速度达 70000 个细胞/s,分选速度 50000 个细胞/s,四路分选,Beckman Coulter MoFlo XDP 分析速度 100000 个细胞/s,分选速度 70000 个细胞/s,四通道分选。

3.2.4 仪器小型化 适应实际需要的小型化、便携式流式细胞仪也是一个发展的趋势。最近几年,微流体流式细胞仪成为研究的热门方向,在这方面的研究也越来越多,取得了一定的科研成果。耿鑫等对微流体数字化喷点技术进行了研究,使之能够用于小型实验室^[5]。廖锡昌等研制了荧光微芯片分析检测器,基本实现了它的微型化^[6]。Shao Guocheng 等研发了带有非共面显微透镜和 3-D 流体聚焦单元的微流控芯片,实现了流体聚焦单元的真正三维化^[7]。David Barat 等研究集成光学系统代替传统的自由空间光学系统,提出四种不同的方法,找出最佳设计方案^[8]。Segyeong Joo 等发明规格 15cm×10cm×10cm、重量为 800g 的微流体流式细胞仪,它能同时给出荧光信息和阻抗信息,使细胞分类更快、更容易^[9]。Md. Z. Islam 等发明用来分离干细胞的光纤耦合微流体流式细胞仪^[10]。Joel P. Golden 等发明多波长微型流式细胞仪,它可以具有 532nm、635nm 波长激发,665nm、700nm 荧光探测和散射光探测的功能^[11]。

3.2.5 仪器功能增强化 鉴于拉曼光谱易于识别的特点,Dakota A. Watson 等对能够探测拉曼光谱的流式细胞仪进行了研究,这将使细胞的多参数测量提升一个档次^[12]。Scott D. Tanner 等将金属标记和质谱探测应用到流式细胞仪中,实现单细胞的更多生物标记的复合测量^[13]。衍射成像光谱仪可以为科研者提供细胞的 3D 特征,Kenneth M. Jacobs 等的科学实验表明高通量衍射成像光谱仪具有很高的可行性^[14]。Thaddeus C. George 等对多光谱成像流式细胞仪和传统流式细胞仪做了比较,结果表明,在区分凋亡细胞的早、中、晚期方面,多光谱成像流式细胞仪更胜一筹^[15]。J. Novak 等设计了双色、双逢 in vivo 流式细胞仪。它将共聚焦和流式细胞术融合在一起,用于体内荧光细胞循环的实时、定量测量,实现无创检测^[16]。Ho Lee 等用 in vivo 成像流式细胞仪来捕获活体动物体内荧光标记的细胞图像^[17]。Amnis 公司 ImageStream 100 将流式多色检测技术和荧光显微镜图像显示技术集中到一个平台上提供了全新的细胞分析方法。

3.2.6 理论的新发展 An-Shik Yang 等采用 SIMPLEC 迭代算法对流式细胞仪液体流动的理论模拟结果与文献公布的实验数据吻合很好,为微流体流式细胞仪的流体室设计提供了理论参考^[18]。Cliburn Chang 等提出统计混合模型,它为流式细胞仪的细胞亚群数据的自动识别、处理奠定了基础^[19]。Gleb V Dyatlov 等理论上提出了测量细胞的二维光散射方法(two-dimensional light-scattering patterns 2D LSP)来弥补传统扫描流式细胞仪只

测量方位角强度一维光散射的不足^[20]。

另外,试剂盒荧光试剂、液相芯片技术、定量流式细胞分析、仪器模块化等也是流式细胞仪的发展趋势。

4 未来展望

本文对流式细胞仪的原理、应用、发展现状和趋势作了简明扼要的论述,使科研者和使用者有一个更深刻的了解和认识。随着科学技术的进步,流式细胞仪专业化区分更加明显,科研型大型仪器和普及性应用仪器成为两个主流,随着光电技术的发展,相信流式细胞仪能够在测量多色荧光参数的时候,给出多参数分析结果,同时完成分类,实现实时同步分析的功能,这对临床医疗快速诊断意义重大。

参考文献(References)

- [1] Jani V, Janossy G, Lqbal A, et al. Affordable CD4+ T cell counts by flow cytometry.II. The use of fixed whole blood in re-source-poor settings [J]. *J Immunol Methods*, 2001,257(1-2): 145-154
- [2] Ormerod MG. Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry [J]. *J. Immunol. Methods*, 2002, 265: 73-80
- [3] Sincock SA, Robinson JP. Flow cytometric analysis of microorganisms [J]. *Methods Cell Biol.*, 2001, 64: 511-537
- [4] Peter AT, Jones PP, Robinson JP. Fractionation of bovine spermatozoa for sex selection: A rapid immunomagnetic technique to remove spermatozoa that contain the H-Y antigen. [J]. *Theriogenology*, 1993,40: 1177-1185
- [5] 耿鑫,侯丽雅,章维一. 微流体数字化喷点技术的实现[J]. *光学精密工程*,2009,17(8):1902-1907
Geng Xin, Hou Li-ya Zhang Wei-yi. Implement of digital dispensing technology for microfluids [J]. *Optics and Precision Engineering*, 2009, 17(8):1902-1907 (In Chinese)
- [6] 廖锡昌,郑慧斐,袁敏,等. 发光二极管诱导荧光微芯片分析检测器的研制[J]. *光学精密工程*,2009,17(12):2906-2911
Liao Xi-chang, Zheng Hui-fei, Yuan Min, et al. High-power light-emitting-diode induced fluorescence detector for microfluidic chip analysis [J]. *Optics and Precision Engineering*, 2009, 17(12): 2906-2911 (In Chinese)
- [7] Shao Guo-cheng, Wang Wan-jun. A MEMS flow cytometer with integrated out-of-plane microlens and 3-D hydro-focus unit [J]. *Proc. of SPIE*, 2009, 7207: 72070P1-7
- [8] David B, Giuseppe B, Matthew CM, et al. Design, simulation and characterisation of integrated optics for a microfabricated flow cytometer [J]. *Optics Communications*, 2010, 283:1987-1992
- [9] Joo S, Kim KH, Kim HC, et al. A portable microfluidic flow cytometer based on simultaneous detection of impedance and fluorescence [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010,25(6):1509-1515
- [10] Islam MZ, Su X, Kirkwood SE, et al. Development of an opto-microfluidic flow cytometer for the sorting of stem cells from blood samples [J]. *Proc. of SPIE*, 2009,7386:73860C1-8
- [11] Golden JP, Kim JS, Erickson JS, et al. Multi-wavelength micro?ow cytometer using groove-generated sheath flow [J]. *The Royal Society of Chemistry 2009 Lab Chip*, 2009, 9(13):1942-1950
- [12] Watson DA, Brown LO, Gaskill DF, et al. A flow cytometer for the measurement of raman spectra [J]. *Cytometry Part A*, 2008,73A: 119-128
- [13] Tanner SD, Bandura DR, Ornatsky O, et al. Flow cytometer with mass spectrometer detection for massively multiplexed single-cell biomarker assay[J]. *Pure Appl. Chem.*,2008, 80(12):2627-2641
- [14] Jacobs KM, Lu JQ, Hu XH. Development of a diffraction imaging ?ow cytometer[J]. *Optics Letters*, 2009, 34(19):2985-2987
- [15] Geoge TC, Basiji DA, Hall BE, et al. Distinguishing modes of cell death using the imagestream multispectral imaging flow cytometer [J]. *Cytometry Part A*,2004, 59A:237-245
- [16] Novak J, Puorishaag M. Two-color, double-slit in vivo flow cytometer [J]. *Optics Letters*,2007, 32(20): 2993-2995
- [17] Lee H, Alt C, Pitsillides CM, et al. In vivo imaging flow cytometer [J]. *Opt Express* 2006, 14(17): 7789-7800
- [18] Yang AS, Hsieh WH. Hydrodynamic focusing investigation in a micro-flow cytometer[J]. *Biomedical Microdevices*,2007, 9(2):113-122
- [19] Chan C, Feng F, Ottinger J, et al. Statistical mixture modeling for cell subtype identification in flow cytometry [J]. *Cytometry Part A*,2008, 73(8):693-701
- [20] Dyatlov GV, Gilev KV, Semyanov KA, et al. The scanning flow cytometer modified for measurement of two-dimensional light-scattering pattern of individual particles [J]. *Meas. Sci. Technol*,2008, 19: 015408