

# 流式细胞术的参考标准及其误差来源\*

魏文

(军事医学科学院基础医学研究所)

用于流式细胞仪(FCM)的参考标准可分为两类:一类为调整仪器的参考标准,用以检查仪器的工作状态及稳定性,称为外参考标准,包括荧光微球和戊二醛固定的鸡红细胞。另一类在测定样品细胞的某种成分含量时作定标,称为内参考标准。通常应用一种已知该成分含量的细胞作定标细胞,又称为标准细胞。标准细胞还可作为酶、染料或仪器稳定性的纵向对照,来排除系统误差。

## 一、外参考标准

理想的外参考标准应为球形颗粒,呈单个分散状态,具有相同的荧光强度,散射光信号稳定,而且变异系数(CV)小,无凝集和碎片。最好选用和样品细胞大小相近的标准颗粒,以产生与样品相仿的振幅和大致相同的参数。利用这样的外标准调整仪器,可使其达到最大的分辨率和灵敏度,以及 CV 值降至最低。

目前应用的塑料微球有 3 种:(1)无荧光微球,有各种不同直径的型号,校正散射信号时,能形成很好的线性比例,由此而推断样品细胞的大小。(2)各类荧光微球,偶联着不同的荧光染料,以校正仪器的荧光信号。(3)含已知量荧光素的微球,其偶联的荧光素分子数目是已知的,它除了可以测定细胞大小外,还能通过计算已知量荧光素微球和待测样品两者荧光强度之比,求得样品中每个细胞含有的荧光分子数目,以及每个细胞中所检测的抗原位点数目。

戊二醛固定的鸡红细胞(CRBC),带有自发荧光,是校正仪器的荧光和散射光信号的一种很好的外标准。椭圆饼形的 CRBC,在液流

中通过激光束时是随机取向的。当细胞以其侧周边朝向激光束时,在图上产生一个低振幅波型。而当细胞以其最大平面取向时则波型振幅加大。通常可以见到两种波型共存于图中,是校正仪器的正常模式图。CRBC 荧光受醛化过程的影响较大,醛化好的细胞在 4℃冰箱中可保存 1 年以上。因其来源丰富,价格低廉,是日常校准仪器的一种较好的外参考标准。

标准的颗粒性悬液应始终保持单颗粒良好的离散度,这样才能使测量中各种参数保持稳定,并使液流喷射速度均恒,喷嘴不致堵塞。荧光微球和 CRBC 在使用时也一定要制备成离散良好的单颗粒或单细胞悬液。

一般在实验前先用外参考标准校正仪器,再做样品分析。样品测完后,为了证实仪器有无飘移现象,再用外参考标准校正 1 次。

## 二、DNA 参考标准

内参考标准中重要的一项是 DNA 参考标准。由于 FCM 是对每个细胞进行相对测量,在测定细胞 DNA 含量时,就要用一种 DNA 含量稳定,测定重复性好, CV 值小又便于储存的二倍体细胞作为内参考标准。

应用好的内参考标准,可以进行高分辨率的细胞 DNA 测定,即使 DNA 含量变化甚微的早期癌变细胞,也可以用 FCM 鉴别出来。Iversen<sup>[1]</sup>利用虹鳟鱼红细胞及外周血白细胞作标准细胞,在人的正常子宫内膜与良性卵巢瘤的二倍体细胞中,以及其他肿瘤样品所包含的二倍体细胞中,精确地测出 DNA 含量的微小

\* 本文承北京师范大学生物系薛绍白教授及军事医学科学院吴加金教授审阅,特此致谢。

变化, 仅比人正常白细胞 DNA 高 5—7%。

国内外文献报道中常见的内参考标准有如下几种:

**1. 人白细胞** 人外周血  $G_0/G_1$  期淋巴细胞 DNA 含量稳定, 是理想的二倍体标准细胞。用乙醇固定光神霉素(Mithramycin)染色, 或用甲醇固定吡啶黄-福尔根(Acriflavin-Feulgen)染色, 其 DNA 含量测定的结果是一致的。这两种测定方法均可使其稳定性保持数月。目前人外周血淋巴细胞和粒细胞是最广泛使用的 DNA 内参考标准, 其中以用 Ficoll-Hypaque 分离人外周血的淋巴细胞, 被公认为是可靠的。也有人将抗凝血离心后, 取白细胞层的细胞作为内标准, 效果也很好。虽然在这种白细胞层中包含了所有的白细胞亚群, 但在直方图中的 CV 值却很低<sup>[1]</sup>。

**2. 虹鳟鱼红细胞(rainbow trout red blood cell, TRBC)** 为国外实验室常用的 DNA 参考标准。经用溴化乙锭或光神霉素染色, 所测得的 DNA 含量是一致的。Jacobson<sup>[2]</sup>报道 TRBC 的 DNA 含量为人二倍体的 77.4%, 而 Vindelöv 报告为 80%<sup>[3]</sup>, Iversen 的结果则为 78.9%<sup>[1]</sup>。Jacobson 注意到仪器线性随荧光增强而提高, 且标准与样品细胞在直方图中峰比值也因荧光强度的差别而波动大。他提出最好选用 DNA 含量接近或略低于人二倍体的细胞作为内参考标准。TRBC 比 CRBC 更接近于人二倍体, 而且 DNA 含量稳定, 测定重复性好, 但有时也可能与样品中的少量亚二倍体相混淆<sup>[2]</sup>。我国各地较少鳟鱼, 故无法推广应用。

**3. 鳖红细胞(turtle red blood cell, Tu-RBC)** 宋平根等<sup>[4]</sup>报道的 TuRBC 方法, 取材方便。每只鳖可制备约 100 ml 的 TuRBC 悬液, 保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  1 年以上无明显变化。TuRBC 的 DNA 含量为人二倍体的 70%, CV 值小, 分辨率高。

Vindelöv<sup>[3]</sup>同时使用两个内参考标准, 在直方图上有两个参考峰值, 用这两个峰值之比做为内参考, 可以不受模数转换器零位调节变

化的影响。Jacobson<sup>[2]</sup>利用 TRBC 与人淋巴细胞的混合内标准, 测得同性别的样品细胞的 CV 值为 0.5%, 性别之间的 CV 值为 1.82%。利用双标准法, 可以分辨出 DNA 含量发生轻微变化的细胞。

### 三、FCM 测定细胞 DNA 的误差来源

**1. 仪器** 电压稍不稳定, 会引起光电倍增管的效益波动, 造成较大误差。细胞 DNA 测定取决于荧光屏上两个峰比值的精确度, 也包含了样品与标准之间的随机误差。当荧光强度受到干扰时, 峰比值就直接受到影响。

激光束、荧光束、散射光束(直角与前向角)等与液柱在空间是绝对正交的, 稍有偏离, 或液流速度改变, 都会造成荧光脉冲图像的漂移和失真。

**2. 染料** 70 年代使用 FCM 常采用 Feulgen 染色法。近年来, 一致认为 70% 乙醇固定细胞, 以碘化丙锭和溴化乙锭作染料, 结果很好。光神霉素和 Hoechst-33258 也是与 DNA 特异性结合的染料。吡啶橙(AO)可同时染 DNA 和 RNA, 异硫氰酸荧光素(FITC)用于染细胞蛋白质, 均可取得满意的结果。染料的浓度大对激光的吸收也大; 激光束照射液流时, 由于折射现象, 使激光效应减弱; 被激发的荧光也会被液流吸收。因此, 选用激发与发射光谱可以在最大程度分开的荧光染料, 有助于减少发射荧光的自我吸收。此外, 染料本身在分子水平上相互作用而引起能量的非辐射性消耗, 可减弱发射荧光, 致使 DNA 含量相等的细胞产生不相同的荧光强度。

以下几种情况也可能导致 FCM 在 DNA 测定中出现误差: (1) DNA 与染料结合达到平衡所需的时间发生改变; (2) 染料的结合常数发生改变; (3) DNA 碱基对与染料分子数的比值改变; (4) 细胞染色质结构与浓聚程度的改变; (5) 细胞内部结构中 DNA 以外的其他大分子与染料发生结合。

**3. 样品制备** 近年来, 样品制备的重要性引起人们足够的重视。Wolley<sup>[5]</sup>报道淋巴

细胞和培养的 C-4 I 细胞经酸处理后, 除去了染色体的组蛋白, 使 DNA 结合的染料更多, 从而增高荧光强度, 证实了 pH 值对测定结果的影响。Iversen<sup>[1]</sup>也指出, 用胃蛋白酶处理过的细胞, 其荧光强度可增高。

测定 DNA 时常见的误差是由于 RNA 的同时着色。克服的办法是加入 RNA 酶。但要注意由于 RNA 酶不纯而导致对 DNA 的部分破坏, 或者酶活性不高而使 RNA 不能全部被消化。

在样品制备过程中, 标准细胞与样品细胞及时混合的重要性也引起人们的重视。Iversen<sup>[1]</sup>特别强调, 如果标准与样品细胞不及早混合, 即不同时在 1 个试管内进行固定及染色, 则由于标准与样品细胞在不同时间对荧光素的着色力(stainability)的差异, 使 DNA 的测定发生错误, 或对其倍性的过量估计<sup>[1,6]</sup>。即使标准细胞和样品细胞在混合以前平行地分别进行固定、染色等过程, 也会产生约 20% 的人为误差<sup>[6]</sup>。因此, 内参考标准与样品细胞混合一起固定、染色、测量, 可以直接读出直方图上两个峰比值, 又可以纠正瞬时光强的波动和液流速度的变化所产生的误差。

标准及样品细胞都应制备成离散良好的单细胞悬液, 使用胰酶消化和橡皮铲(rubber-policeman)的效果是一样的<sup>[6]</sup>。

Wolley<sup>[6]</sup>报告人培养的胚胎组织 WI-38 细胞更适宜作 DNA 内参考标准。

总之, 在 FCN 测定细胞 DNA 时, 如能正确使用参考标准, 选好染料, 并且重视样品细胞的制备, 测定误差将大为减小。

### 摘 要

本文介绍了流式细胞术的两类参考标准。外参考标准是作为仪器调整的标准, 包括各种微球和戊二醛固定的鸡红细胞。内参考标准中着重介绍了 DNA 标准细胞包括国内常用的人淋巴细胞及国外常用的虹鳟鱼红细胞等。本文较详细地阐述了 FCM 测定细胞 DNA 或倍性的各种误差来源, 包括仪器、染料及样品制备等。强调了标准与样品细胞在制备过程中应早期混合的必要性。

### 参 考 文 献

- [1] Iversen, O. E. et al., 1987, *Cytometry* 8 : 190.
- [2] Jacobson, A. et al., 1983, *Cytometry* 4 : 161.
- [3] Vindelov, L. L. et al., 1983, *Cytometry* 3 : 332.
- [4] 宋平根等, 1987, 科学通报, 21 : 1656.
- [5] Wolley, R. C. et al., 1982, *Cytometry* 2 : 370.
- [6] Vindelov, L. L. et al., 1983, *Cytometry* 3 : 328.

## 家鸡联合会复合体的制备

刘冬梅 张传善

(东北师范大学生物系)

联合会复合体(Synaptonemal Complex, SC)是减数分裂时, 同源染色体配对过程中形成的一种非永久性的复合结构, 与染色体配对、遗传交换以及染色体的分离有密切关系。大量的研究表明, SC 分析是进行核型分析和鉴别染

色体畸变的一种新的有效手段。目前, 已被广泛应用于细胞遗传学的研究<sup>[1]</sup>。

早期观察 SC 的方法是通过电子显微镜对超薄连续切片的观察, 以构成 SC 的三维空间结构<sup>[2,6]</sup>。然而, 超薄连续切片的制作费事耗