

流式细胞计无菌分选功能的开发

陶家平 陈捷光

(北京医科大学分析计算中心细胞分析室, 北京 100083)

关键词 分选, 无菌分选, 流式细胞计

分选技术是流式细胞计一项重要功能。其分离细胞的速度及纯度是目前世界上任何其他医学仪器无法比拟的。其分选速度可高达 3000—5000 个细胞/秒; 纯度可高达 99% 以上。

分选可分为两种, 一种为一般分选, 另一种为无菌分选。无菌分选需要在分选过程中严格保证无菌条件, 使分选过程中细胞不受污染。以利于细胞的继续增殖。一般分选, 国内其他实验室正在开展^[1]; 而无菌分选国内尚未见报道。国外也只是部分实验室在应用。我们参考了一些国内外文献并借鉴了一些国外经验^[2-4], 在 FACS440 型流式细胞计上开发了无菌分选功能。本文介绍这种方法及应用。希望此文对今后推广这项技术起到促进作用。

材 料 和 方 法

一、仪器及其改进

FACS440 流式细胞计购于美国 Becton-Dickinson 公司。为了进行无菌分选, 对此仪器的液流系统做了如图 1 的改进。

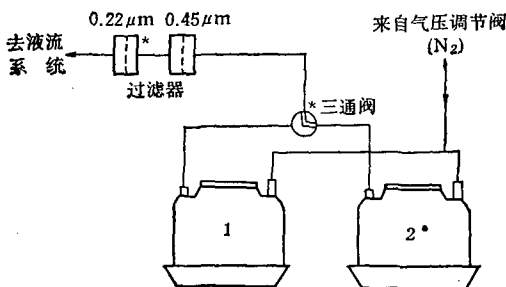


图1 FACS440 流式细胞计液流系统改进图

1. 鞘液罐, 装分选液; 2. 消毒清洗罐, 装 Hibitone 溶液。图中有“*”号设备均为改进后增加的设备

1. 增加一个鞘液罐, 其中一个放鞘液, 另一个放置消毒清洗液。

2. 在 0.45 μm 滤膜过滤器后增加一个 0.22 μm 的滤膜过滤器。

3. 增加一个三通阀, 以便清洗液及鞘液之间的切

换。

4. 增加一套样品冷却系统。

二、样品和试剂

1. 用间接免疫荧光法染色的 FITC 人胸腺细胞样品。由我校基础医学院免疫学教研室制做^[5]。

2. 消毒清洗液, 0.05% 的 Hibitone 溶液。由澳大利亚沃尔特及伊丽沙豪医学研究所赠送。

3. KDS 分选鞘液^[6], 由本校基础医学院免疫教研室制做。

三、方法

实现无菌操作应遵循下列步骤:

1. 首先要对实验室空气进行消毒及净化处理。

2. 更换新的 0.22 μm 及 0.45 μm 的滤膜。

3. 用 0.05—0.1% 的 Hibitone 溶液对鞘液管路及样品管路进行充分地清洗消毒。

4. 用分选液冲洗经 Hibitone 溶液消毒过的各管路系统。

5. 用 70% 的酒精溶液清洗各个工作面。

结 果 和 讨 论

一、图 2 是用 OKT3 为一抗染色的人胚胎的胸腺细胞样品在分选前的直方图, 是一个连续曲线。这说明阴、阳性细胞没有明显的分界。我们要分选出左边及右边的两部分。(通常我们称染色较强的为阳性细胞, 染色较弱或没有染上色的细胞为阴性细胞)。

二、图 3 是我们分选后得到的阳性细胞的直方图。根据分选窗口建门, 可知纯度为 96%。图 4 是分选所得到的阴性细胞的直方图。同样根据分选窗口建门重新分析可知纯度为 99%。

三、分选后得到的细胞拿回实验室做无菌培养, 48 小时后观察无长菌现象并成活良好。

以上三点可以说明无菌分选是成功的, 我们的措施对于防止污染是有效的。

四、在无菌分选时, 在两侧的细胞收集管中要放置含有 5% 的小牛血清的细胞培养液。这样分选后的细胞很快落入培养液中, 可提高成活率。

五、无菌分选时, 有时我们要得到大量的细胞, 分

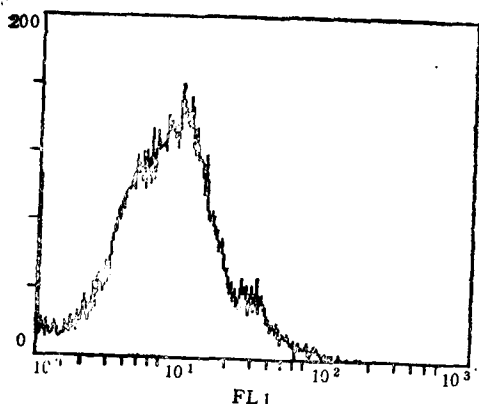


图2 分选前胸腺细胞的荧光 1(FL1) 参数的直方图
横坐标表示荧光强度,单位为通道数。而纵坐标表示细胞数,单位为个

选时间较长。为了防止细胞过快死亡,除了上述措施外,必须对样品管及收集管要进行降温冷却。

六、收集管一定要用玻璃管。不要用塑料管,以

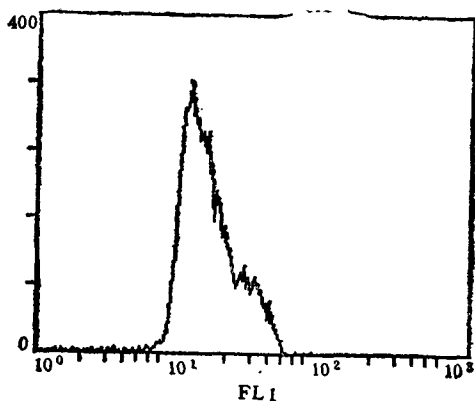


图3 分选后得到的阳性细胞的荧光 1(FL1) 参数的直方图

横、纵坐标表示的意义同图2

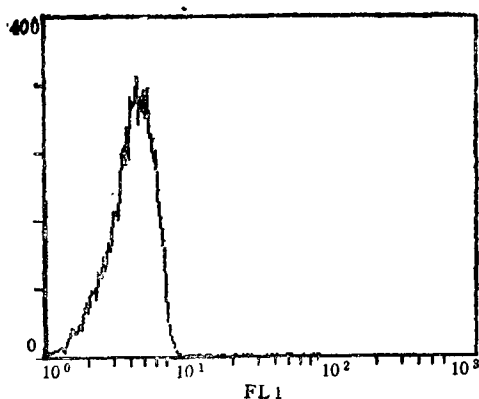


图4 分选后得到的阴性细胞的荧光 1(FL1) 参数的直方图

横、纵坐标表示的意义同图2

防止塑料管带静电影响分选纯度。

七、在分选后,我们发现阴性细胞的分选纯度高于阳性细胞。这是因为细胞样品中必不可少的会有染上色和没有染上色的细胞双连体。在分选时这些双连体往往要做为阳性细胞分出,当落入收集管前会因振动下落又分成两个细胞。这样就影响了阳性细胞的分选纯度。

参 考 文 献

- 1 朱立平等. 中国医学科学院学报, 1988; 10(5): 368
- 2 William Leiserson. *Immunological Method*. New York: Acad Press, 1985: 290—314
- 3 James P Freyer *et al.* *Cytometry*, 1987; 8 (4): 427
- 4 J Conia *et al.* *Cytometry*, 1987; 8 (5): 500
- 5 鄂征等. 组织培养技术. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 46—57

[本文于1989年10月4日收到]

实 用 技 术 函 授 班

H-56 创外汇养“蝴蝶”新技术 我国蝴蝶资源十分丰富,但未能很好的开发利用,仅靠自然捕捉来发展蝴蝶工艺品,还远远不能满足市场的需求。饲养一只珍贵的金丝凤蝶售价高达3600美元,人工饲养蝴蝶是一项投资少、效益高的致富项目。提供产品收购厂商的详细地址和养殖技术资料。函授费36元。

H-58 蛋清蛋壳提取溶菌酶技术 函授费32元。

H-59 利用废杂骨生产磷酸氢钙技术 函授费26元。

H-60 氢氧化羧纤维素生产技术 函授费27元。

以上函授班常年招生,报二项者优惠10%,函授期三个月,考试合格发给结业证书(钢印)。

[北京市星火技术研究所,北京867信箱20816组李涵,邮编: 100024,电话: 5762194]