

技术与方法

流式细胞术免疫荧光测量中的直标及间标

温厚津 陶家平

(北京医科大学分析计算中心细胞分析室, 北京 100083)

摘要 直接标记和间接标记是免疫荧光测量中两种不同的标记方法。在流式细胞计测量中, 一般说来, 直接标记不易引入样品的非特异性结合, 因此引入干扰少, 样品的数据好处理, 而间接标记由于有放大作用, 容易引入非特异结合的干扰, 严重时所得数据无法区分特异及非特异信号, 造成数据分析的混乱, 通过样品实测比较, 认为在流式细胞计测量中应用直接样品更为合适。

关键词 直接标记, 间接标记, 流式细胞计, 荧光标记

在一定条件下, 用化学方法使荧光素与抗体结合, 再利用抗原抗体的特异性反应, 把这种带有荧光素的抗体结合在细胞表面的抗原上, 这就是免疫荧光标记法。这种结合方法又分两种, 一种是用标有荧光素的抗体直接结合在细胞表面的抗原上, 另一种是用带有荧光素的抗体做为第二抗体, 选用细胞特异结合的抗体为一抗。二抗是对一抗特异性结合的, 我们称前者为直接标记, 而后者为间接标记, (图 1) 以下简称直标及间标。

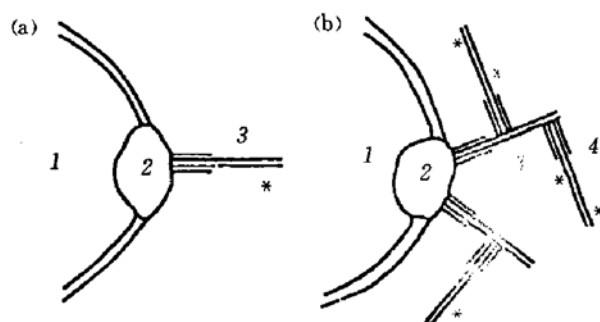


图 1 直接标记及间接标记示意图

(a) 直接标记 (b) 间接标记

1: 细胞, 2: 抗原, 3: 一抗, 4: 二抗, *: 荧光素。

我们应用流式细胞计^[1,2]对上述两种方法

处理过的大量成人外周血活细胞样品, 进行了测量及分析比较, 发现两种方法处理过的样品有许多不同之处, 本文就此两种方法的优缺点及实用性进行探讨。

1 材料和方法

1.1 仪器

FACS440 流式细胞计, 美国 BECTON-DICKINSON 公司产品。

1.2 材料

1.2.1 成人外周血细胞样品, 人胚胎胸腺细胞样品, 均由本校免疫教研室提供。

1.2.2 CD2, CD3, CD4, CD8, 以及 HLA-I 及 HLA-Ⅱ类抗原的单抗, 由本校免疫教研室提供。

1.2.3 双染试剂: FITC 异硫氰酸^[3]标记 CD4, PE 藻红蛋白^[4]标记 CD8, 由本校免疫教研室单克隆室提供。

1.3 方法

1.3.1 单染直标 将 50% (NH₄)₂SO₄ 溶液粗提单克隆抗体与 pH9.5, 0.5mol/L 碳酸盐缓冲液溶解的 FITC 混合(二者重量比为 15:1—

20:1) 用 pH7.6, 0.15mol/L PBS 补充溶液, 使蛋白总浓度为 5g/L, 4℃ 搅拌 16h, 混合液过 Sephadex-G50 柱, 去除游离的荧光素, 收集黄绿色带, 测 F/P 值。

取外周血单个核细胞悬液置 5ml 塑料管中, 使 1ml 含有细胞 $1 \times 10^6 - 2 \times 10^6$ 个, 离心后弃上清, 加 50 μ l, FITC 或 PE 标记的单克隆抗体 20 μ l, 阴性对照加 FITC 或 PE 标记的小鼠 IgG; 4℃ 反应 30min, 2000r/min, 离心 2min, 洗二次, 流式细胞计分析结果。

1.3.2 双染直标 取外周血单个核细胞悬液置 5ml 塑料管中, 每管含细胞数 $1 \times 10^6 - 2 \times 10^6$ 个, 2000r/min, 离心 2min, 弃上清, 加 FITC 及 PE 标记的单克隆抗体 20 μ l, 4℃ 放置 30min, 洗二次, 然后进行流式细胞计分析。

1.3.3 单染间标 取外周血单个核细胞悬液置 5ml 塑料管中, 使 1ml 含有细胞 $1 \times 10^6 - 2 \times 10^6$ 个, 离心后弃上清, 加 1:20 稀释的单抗腹水 100 μ l. 阴性对照管加抗体稀释液作为一抗, 4℃ 放置 30min, 洗二次后加入 FITC 标记的兔抗鼠 IgG50 μ l, 4℃ 反应 30min, 洗二遍后用流式细胞计进行分析。

1.3.4 间标+直标 使用 δ -TCS1 (TCRY δ ⁺) 单抗时, 在完成了间接免疫荧光后, 再加入小鼠血清与细胞反应, 4℃ 30min, 洗二次, 最后加入 PE 标记的 CD3 单抗混匀, 4℃ 反应 30min, 洗二次, 细胞最后重悬于洗液中待测。

2 结 果

2.1 应用免疫荧光法标记细胞. 在流式细胞计测量中, 通常称标记上颜色的细胞为阳性细胞, 未标记上颜色的为阴性细胞. 如图 2 中, 坐标左侧的峰是阴性细胞, 右侧的峰是阳性细胞. 而在多重染色时, 往往在二维等高图和二维点图上出现多群细胞, 若两重染色, 则染上两个荧光的为双阳性细胞, 染上一个荧光的为单阳性细胞. 如图 3b 左上角或右下角的两群细胞均为单阳性细胞, 分别表示为 $CD4^-CD8^+$ 和 $CD4^+CD8^-$ 细胞, 没有染上荧光的细胞为阴性细胞, 如图 3b 左下角一群细胞, 表示为

$CD4^-CD8^-$.

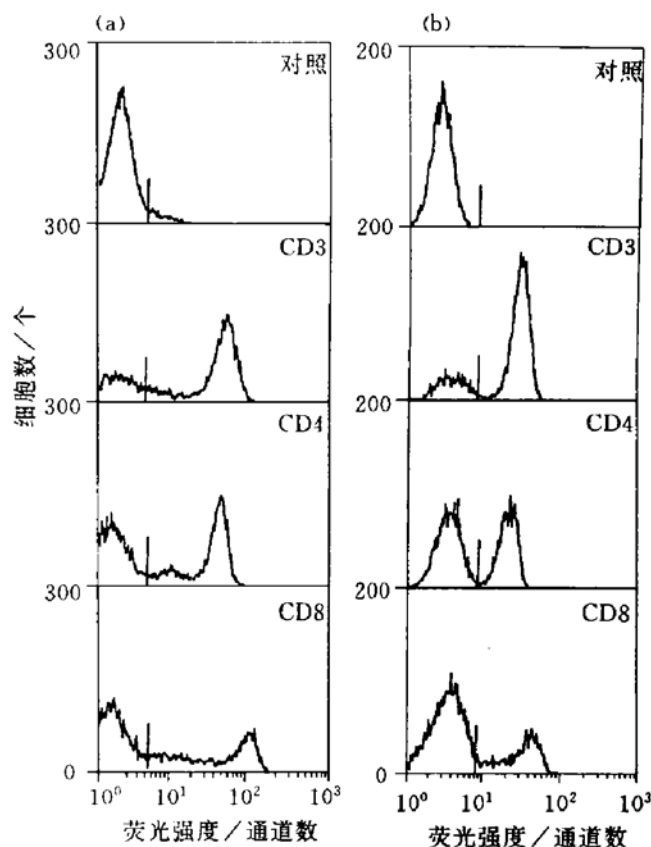


图 2 用不同的 T 细胞抗体标记的外周血淋巴细胞的直方图

(a) 间接标记; (b) 直接标记。

2.2 用单色荧光直接及间接标记正常人外周血 T 细胞及其亚群进行检测, 结果表明用这两种方法标记的亚群在数量上无明显区别, 但是发现用间接法标记的细胞样品非特异荧光阳性细胞明显增加, 这不利于数据分析 (图 2)。

2.3 用 FITC 和 PE 标记的 CD3, CD4, CD8, 分别与外周血单个核细胞作直接荧光染色, 实验结果表明两种标记物检测 T 细胞及其亚群在数量上无明显差别 (表 1)。

2.4 直接标记或间接标记中影响最大的是阴性对照. 直标阴性对照, 阴性率接近 100%, 而阳性率不到 5%, 而间标阴性对照的阳性率有时高达 30% (见图 3), 同理在间标的双染阴性对照样品中, 单阳和双阳的细胞也占有一定比例, 而直标样品双染的阴性对照双阳性比例接近 0, 样品非常“干净”。

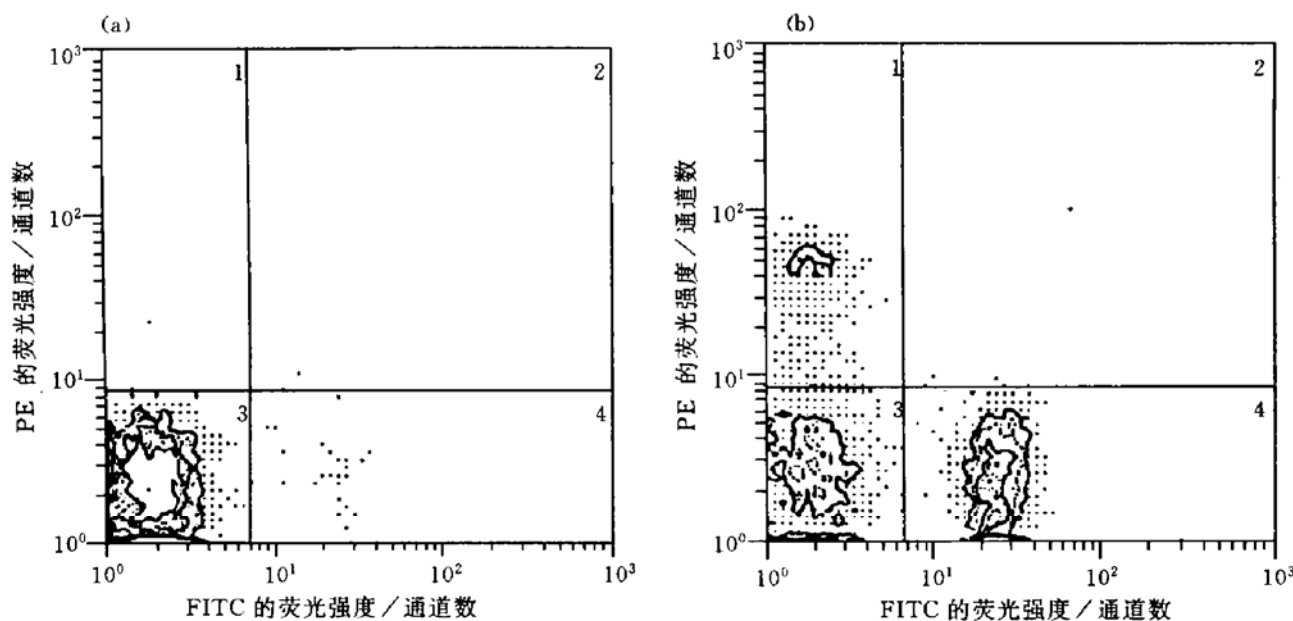


图3 双染直标的外周血淋巴细胞二维等高图

(a) 为对照; (b) 为正常人外周血染色.

表1 直标和间标检测外周血 T 细胞阳性亚群比较

方 法	样品数	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
直标	28	70.30±6.84	42.45±7.49	26.89±6.94	1.69±0.61
间标	17	71.11±7.48	44.92±7.37	28.21±7.01	1.65±0.42

%

3 讨 论

3.1 应用流式细胞计测量间标免疫荧光样品, 在样品中非特异性结合多的原因, 我们分析认为: 间接标记中二抗结合一抗时, 可以结合更多的荧光分子, 因此有放大作用. 容易与外周血样品中有 Fc 受体的细胞非特异结合, 与部分白细胞的表面抗原结合, 这样就会使样品中阳性成分增加, 尤其是阴性对照样品中, 这样的结合, 很容易引起误解, 并影响数据处理, 而直接标记没有二抗, 没有放大作用, 因此就减少样品非特异性结合的影响. 在流式细胞测量中, 由于流式细胞计采用功率适中, 单色性好的激光为光源, 采用高灵敏度的光电倍增管和电子放大器, 因此仪器灵敏度很高, 这样克服细胞荧光干扰就十分重要, 但是对于有些仪器, 如荧光显微镜灵敏度较低, 直标样品有时

无法看到, 因此采用间接标记方法效果较好.

3.2 从图 2 中可明显看出直标样品阴阳细胞界线十分分明. 而间标样品界线就不十分清楚, 这样就不利于数据分析中区分阳性细胞比例.

3.3 直标操作过程大大简化, 这样减少了细胞的丢失, 但是在进行多抗体检测时, 必须制备多个荧光标记的单克隆抗体, 而间标只用一种标有荧光的二抗, 使用比较方便.

3.4 在流式多荧光染色测量中, 此时需要多重染色, 这时必须使用直标方法, 若用间标则增加了染色之间的干扰, 双阳性细胞及单阳性细胞会大大增加, 致使测量无法进行. 目前世界上流式细胞计发展到了使用多激光光源, 这样就增加了荧光参数的测量, 因此在流式细胞计多参数测量中直标方法是尤为重要的.

3.5 在测量阳性率百分比低的样品时, 我们

必须采用直标样品, 否则间标样品引起的非特异性结合的阳性细胞遮掩了真正的阳性细胞, 以致于无法区分出阳性细胞的信号。

3.6 染色时要选择好合适的抗体稀释度, 必要时做不同稀释度的染色比较。稀释度过高过低均得不到阴、阳细胞界线分明的图形。

3.7 我们除了分析人外周血样品外, 也分析了人胎儿胸腺、脾脏^[5,6]、儿童扁桃体等的活细胞样品, 得出的结论和测试外周血一样。

鉴于以上考虑我们认为在流式细胞计免疫荧光样品测量中采用直接标记样品更为合适。

参 考 文 献

- 1 Vernon T O, Alexander N G, Lubert S. J Cell Biol, 1982; **93**: 981
- 2 宋平根, 李素文主编, 流式细胞术的原理及应用, 北京: 北京师范大学出版社, 1992: 7
- 3 陈英玉, 马树梭, 刘 白等. 上海免疫学杂志, 1992; **12** (1): 47
- 4 陈英玉, 刘 白, 马树梭等. 中华微生物免疫学杂志, 1993; **13** (2): 127
- 5 刘 白, 马树梭, 陶家平等. 北京医科大学学报, 1991; **23** (2): 86
- 6 刘 白, 马树梭, 宗淑贞等. 中国免疫学杂志, 1992; **8** (3): 2 (4)

The Direct and the Indirect Immunofluorescent Labeling on Immune Measurement of Flow Cytometry. Wen Houjin, Tao Jiaping (Analysis and Computer Center, Beijing Medical University, Beijing 100083, China).

Abstract The direct and the indirect fluorescent labeling are two different staining methods in immunofluorescent measurement. In flow cytometer measurement, in general, the direct labeling has little nonspecific binding and disturbance, and the experiment data is easy to process. However, because of the magnifying function, the indirect labeling has much nonspecific binding and serious disturbance. It is difficult to distinguish the specific signals from non-specific ones, it is easy to cause confusion in data processing. By comparing samples, the direct labeling is suggested better than the indirect labeling in flow cytometer measurement.

Key words direct labeling, indirect labeling, flow cytometry, fluorescent labeling

固定化过氧化物酶丝素膜的制备及其性质

张雨青 周玉珍

(苏州蚕桑专科学校, 苏州 215151)

摘要 家蚕丝素经高浓度的中性盐氯化钙溶解后, 制成了固定化过氧化物酶丝素膜。对这种酶膜的活性和理化特性作了分析。结果表明这种酶膜的活性高, 酶促反应温度范围宽, 最适 pH5.0—7.0, 热稳定性也较游离酶好。这与用溴化锂溶解丝素后制成的固定化过氧化物酶膜相仿。因此, 用这种方法制成的丝素膜同样是一种良好的固定化酶的生物材料。

关键词 丝素, 固定化酶, 过氧化物酶, 固定化过氧化物酶丝素膜, 家蚕

家蚕蚕丝具有独特的分子结构、优异的机械性能, 良好的吸湿和保温性能, 长期以来一直在轻纺工业中占重要的地位。近些年来, 家蚕丝蛋白在医用材料如手术缝合线等、医疗诊

断如由固定化酶和固定化抗体丝素膜组成的生物传感器、高级化妆品如丝素膏、日常用品如