

经验交流

流式细胞仪使用中的一些技术问题

张鲁榕 孔宪涛 张 浩

(上海第二军医大学附属长征医院)

流式细胞仪 (Flow Cytometer, FCM) 集近代激光、光学、流体力学、电子计算机和精密机械等发展成果于一身,是目前细胞研究工具中最精密、最先进的仪器之一,国外科研和医疗单位已广泛使用,国内正在引入、试制,逐步普及。

如何调好、用好精密昂贵的流式细胞仪是使用者们至为关注的问题。我们从美国 Coulter 电子仪器公司引入 EPICS C (Electronics Program Individual Cell Sorter, Clinical type) 已二年,现将使用中的一些体会与国内同行交流。

1. 仪器精确度的调节 仪器精确度的高低决定了分析结果是否可靠。精确度可通过荧光微球 (beads) 的变异系数 (HFCV) 来反映。通常,分析免疫荧光时要求对数绿色荧光 (log Green Fluorescence Light, LGFL) 的 HFCV < 5%、前向散射光 (Forward Light Scatter, FLS) 的 HFCV < 3%; 分析核酸 (DNA 或 RNA) 含量时,要求红色荧光 (Red Fluorescence Light, RFL) 的 HFCV 至少 < 1.5%。因此,每天开机时,应根据分析内容核查 beads 的 HFCV 是否在允许值之下,若高出允许值,应校正仪器的精密度,除了注意激光、供电是否正常外,主要地还靠调节样品流与激光的聚焦点来降低 HFCV,重要的调节处有三个,见图 1。

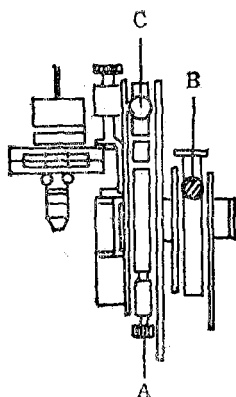


图 1 调节 EPICS 精确度的三个重要旋钮

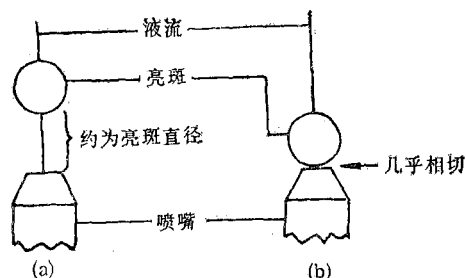


图 2 做不同样品时,喷嘴与亮斑的距离

A 处调整喷嘴与亮斑的距离,作免疫荧光分析时要求喷嘴与亮斑的距离约为亮斑的直径,见图 2 a;作核酸含量分析则要求喷嘴与亮斑几乎相切,见图 2 b。B 处可水平调节激光聚光曲镜的位置,最佳调节方法是打开校正亮斑,让 beads 通过激光束,边从显微镜观察 beads 的亮度,边调节 B 钮,使 beads 达到最大亮度,固定 B 钮的位置。C 处可调节样品流的前后位置,使样品流与激光有最佳交汇状态,调节方法是边观察示波器上 (X/Y 二维图象) 显示 beads 的聚集情况,边轻微转动 C 钮,使 beads 达到最高密集度。一般地,调好这三处,可使各 HFCV 达到满意值,使仪器处于稳定灵敏状态。

2. 保障样品流通畅、正常 样品流异常有三种情况: (1) 样品流速过快: 常见原因有鞘液系统漏气 (多由于管道老化,衔接处漏气) 而致鞘压过低。样品的流速是靠鞘压与样品室压力差来调节的,鞘压越低,样品流速越快,故异常地过快流出样品,往往应先检查鞘液系统管道,处理漏气之处。(2) 样品流速过慢: 与样品流速过快相反,样品流速过慢多系样品管道系统漏气,如带有氮气管的样品室橡胶盖老化失紧、气道漏气等,应更换橡胶盖或气管。(3) 样品流堵塞或半堵塞: 多发生在喷嘴 (直径 76 μm) 堵塞,全堵塞时可见喷嘴悬挂大液滴,蓝色激光折射闪耀;半堵塞时可在示波器 (X/Y 二维图象) 显示细胞畸形分布,如图 3 所示。处理堵塞的方法有: (1) 用中等硬度细毫毛刷

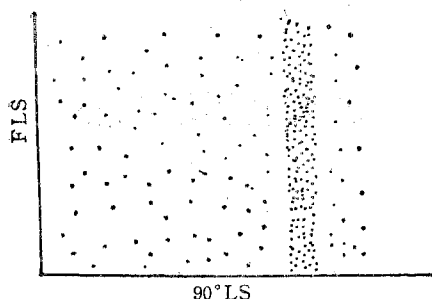


图3 喷嘴半堵塞时的细胞畸形分布

插刷喷嘴,一般细胞团块可被捅开而恢复流通;(2)间歇性按压 Flush 钮,产生一股冲击力,以冲开堵塞物。(3)打开 Sorting 控制屏,使高频振荡器工作,以震散堵塞团块。(4)卸下喷嘴,从出口用吸球反吹气,使堵塞物离开喷嘴口的狭窄处,见图4。(5)若为硅化管道或金属针管堵塞,则接上注射器,用洗洁精(2%)液加压冲洗,至流出液呈直线状、阻力小为止。防止样品流堵塞的方法有:(1)样品液一律经 $40\mu\text{m}$ 尼龙膜滤入样品室。(2)细胞浓度过高的样品必须再稀释。(3)

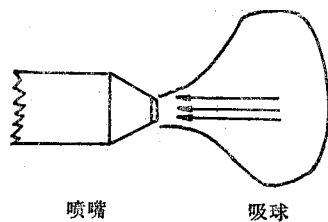


图4 吸球反吹喷嘴,去除堵塞物

每日开机时、关机时各用1小瓶洗洁精(2%)液,象样品一样流过管道,清洗管道残留的细胞和蛋白质,防止长菌成团。(4)鞘压与样品压之间的压力差不宜过大。(5)保证鞘液洁净而无颗粒杂质。

3.保证分析结果具有连续可比性 由于参量(如 Bitmap、PMT、Gain 等)的改变,可使分析结果之间无法比较而得不出结论,因此,在调好适当的分析参量后,必须将这些参量以新的程序(Profile)名称存贮起来,在以后的同实验分析中固定使用之,只有这样,所得的资料才有连续可比性。

[本文于1988年2月22日收到]

Sephadex G200 柱层析提取 BALB/C 小鼠血性腹水 IgG 单克隆抗体 (McAb)

蒋作君

(南京医学院)

在免疫学实验中,饱和硫酸铵法和 DEAE 纤维素离子交换法是提取 IgG 的常规方法。然而,对于溶血样品 IgG 的提取, Sephadex G200 柱层析法 (G200 法)有其独到之处,现将实验报告如下。

将经处理的 Sephadex G200 装柱 ($2.6 \times 50\text{cm}$), 用 pH7.4、0.1mol/L PBS 平衡过夜。次日加 BALB/C 小鼠血性腹水 (含 IgG, McAb) 4ml, 用 PBS 洗脱。洗脱速度为 10~15 滴/min。每管收集 4ml 洗脱液,共收集 13 管。各管洗脱液在 $A_{280\text{nm}}$ 读取光密度值。洗脱液在 $A_{280\text{nm}}$ 处呈现三个蛋白质吸收峰。第一峰为 IgG, 第二峰主要为血红蛋白 (Hb), 第三峰为白蛋白 (图1)。G200 法分离 IgG 依赖其分子筛效应, IgG 分子量为 150~160 千道尔顿 (kD), Hb 分子量为 66kD, 故该法能将 IgG 与 Hb 有效地分离。Hb 在层析中不但指示着进程,而且指示着该重点保护的洗脱组分——Hb 之前的洗脱组分 IgG。一旦 Hb 层析至柱的下端,则提取 IgG 的实验便可结束,这可节省约

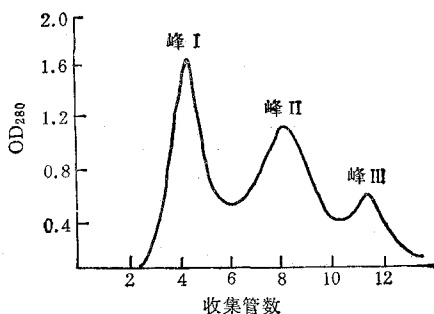


图1 BALB/C 小鼠血性腹水 Sephadex G200 柱层析洗脱峰

三分之二的时问。Hb 不污染葡聚糖,用后葡聚糖可完全再生。笔者认为,在提取非溶血样品 IgG 时,亦可用加适量 Hb 作为指示剂的 G200 法。

[本文于1987年10月28日收到]