

技术与方法

流式细胞计在免疫荧光测量中去除死细胞影响的方法

陶家平 陈捷光

(北京医科大学分析计算中心细胞分析室)

提 要

用流式细胞计测量免疫荧光的活细胞样品时,死细胞的存在会影响实验结果的准确性。因此消除死细胞的影响对于提高实验结果的可靠性是必要的。我们用低浓度的 PI 溶液去染死细胞,并利用专门的计算机软件来消除死细胞的影响。本文通过对三种细胞五个不同细胞活性的样品进行测试分析,证明了此方法对于消除死细胞的影响,提高实验结果的准确性是有效的。

关键词 前向散射光 (FSC), 90° 散射光 (SSC), 荧光 1 (FL1), 荧光 2 (FL 2)

流式细胞计是近 20 年发展起来的一种快速测量细胞特性的先进仪器。由于它有很强的数据采集及分析分选功能,使其在细胞生物学及免疫学中得到了广泛的应用。

我们用 FACS 440 型流式细胞计测量了大量的用传统的抗原抗体法染色的免疫细胞样品。在活细胞样品处理过程中不可避免地会导致部分细胞死亡。由于细胞死后表面标志就会逐渐消失。这样死细胞的存在势必会影响实验结果。尤其细胞活性不高,死细胞占比例较大时,影响更为严重。本文参考一些国内外[1—5]文献,提出了用低浓度的碘化丙啶 (PI) 溶液去染死细胞的方法。因为细胞死后膜的完整性受到影响,这样 PI 的分子很容易进入细胞中结合核的 DNA,使死细胞在一定波长激光照射下发射较强的红光。在数据处理中就可以利用专用计算机软件的“门”功能有效地消除死细胞的影响,提高了实验数据的准确性。

材 料 和 方 法

一、仪器

FACS 440 流式细胞计(美国 BD 公司)。

二、材料

1. 人胚胎胸腺细胞,本校基础医学院免疫学教研室提供。

2. 用 E 花环法从人胚胎脾细胞分离出的 T 细胞,本校免疫学教研室提供。

3. 一种自身免疫性疾病病人外周血的淋巴细胞,我校第一临床医学院眼科提供。

三、染料 碘化丙啶 (PI), 购于美国的 Sigma 公司。

四、方法

1. 将细胞制成单个细胞悬液^[1]。

2. 用间接免疫荧光 (FITC) 法染以上悬液,得到的单染细胞悬液样品在冰浴中放置 30 分钟^[1]。

3. 加适量的 PI 溶液, 最终浓度不超过 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在冰浴中放置 2 min 后, 上机测试。

4. 运用专用的计算机软件在二维点图上选择活细胞圈门, 观察免疫荧光阴阳比例变化。

结 果

一、活性较差的胸腺细胞

图 1—图 3 是胸腺细胞的阴性对照的二维

点图和直方图。图 1 与图 2 是建门情况; 图 3 是去除死细胞后的荧光 1 (FL 1) 的直方图。此样品我们称为样品 1, 活性较差, 死细胞占 23%。从表 1 看出实验结果在去除死细胞后有了明显改进。

图中前向散射光参数用 FSC 表示, 90° 散射光用 SSC 表示。荧光 1 及 2 用 FL 1 及 FL 2 表示。以后文中这四个参数均用英文符号表示。此实验 FL 1 代表绿光, 而 FL 2 代表红光。

表 1 实验结果 (为计算机给出)

样品	目录	细胞种类	死细胞比例	FSC, SSC FL2 建 门	未除死细胞(%)		除去死细胞(%)	
					阴	阳	阴	阳
1		胸腺细胞	23%	✓	98.4	1.6	99.7	0.3
2		胸腺细胞	5%	✓	96.1	3.9	99.6	0.4
3		胸腺细胞	10%	✓	1.8	98.2	0.3	99.7
4		淋巴细胞	2%	✓	93.6	6.4	96.7	3.3
5		脾中 T 细胞	23%	✓	—	—	69.7	30.3

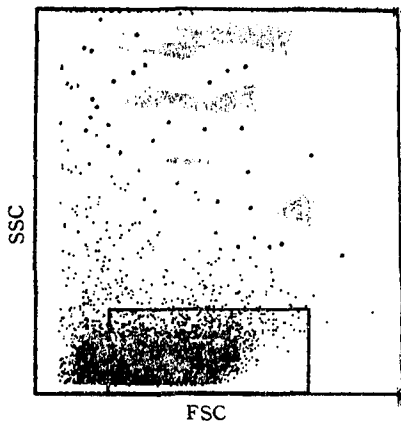


图 1 样品 1 的 FSC 和 SSC 参数的二维点图
每点代表一个细胞, 横坐标与细胞大小形状有关。
纵坐标与细胞核大小及折射率有关

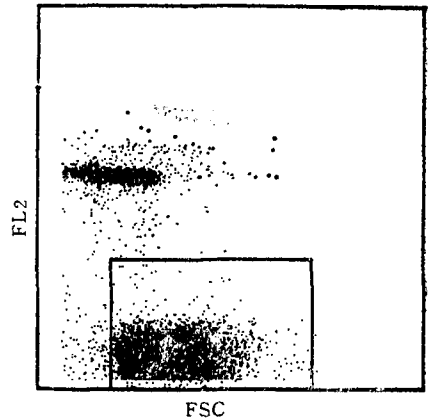


图 2 样品 1 的 FSC 及 FL2 参数的二维点图
左上角为死细胞, 已圈除。纵坐标表示红荧光 (PI 的
发射光) 的强度。横坐标表示的意义同图 1

二、活性较好的胸腺细胞

从表 1 看出, 样品 2 也是人胚胎胸腺细胞的阴性对照。但此样品细胞活性较好, 死细胞仅占 5%。当除去死细胞后也改善了实验结果。

三、表面标志阳性的胸腺细胞

样品 3 是用 OKT 10 抗体以间接免疫荧光法染的人胚胎胸腺细胞。从表 1 看出此样品呈阳性结果, 且看出除去死细胞后, 实验结果也明显改善了。

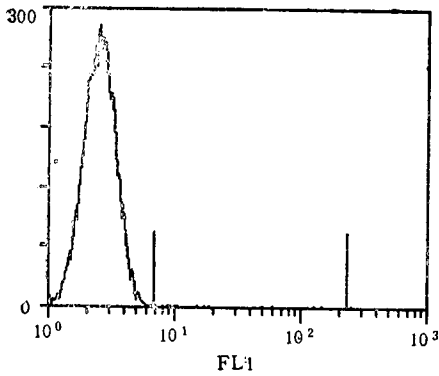


图3 去除死细胞后,样品1的 FL 1 参数的直方图

横坐标表示绿荧光 (FITC 的发射光) 的强度, 纵坐标表示细胞数, FSC 为 48—182, FL1 为 0—255, FL 2 为 0—87, SSC 为 0—56

四、外周血的淋巴细胞和脾中 T 细胞

样品 4 是一个自身免疫病患者外周血的淋巴细胞; 样品 5 是人胚胎脾细胞分离出的 T 细胞。从表 1 及图 4、图 5 可以看出除去死细胞及其他细胞影响后, 实验结果有较大的改善。

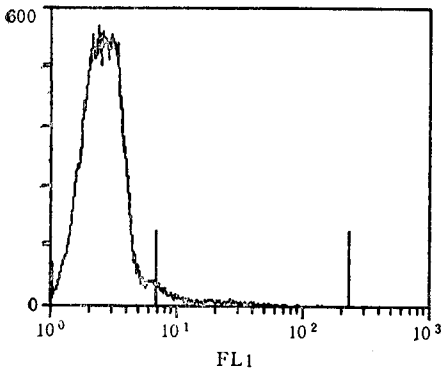


图4 样品4 在没有除去死细胞及其他细胞影响的 FL 1 参数的直方图

横坐标表示荧光强度, 纵坐标代表细胞数, FSC, FL 1, FL2, SSC 均为 0—255

讨 论

一、流式细胞计的样品, 除了死细胞, 必不可少地混有碎片; 常常也混有其他细胞。因此在数据采集和处理中要用专用计算机软件的“门”功能, 除去这些细胞的影响。

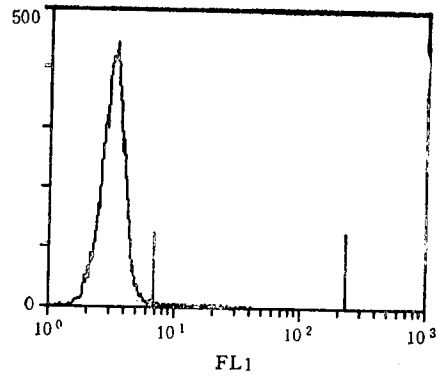


图5 样品4 除去死细胞及其他细胞影响后的 FL 1 参数的直方图

FSC 为 71—212, FL1 为 0—255, FL 2 为 0—87, SSC 为 3—94

二、在免疫荧光测量中活细胞应尽快处理上机, 上机前细胞最好悬浮在 RP 1640 培养液中, 并放在冰浴中, 这样可以减少细胞的死亡。必须要用保存液固定细胞时应选细胞活性好时固定。因为细胞样品一经固定就无法消除死细胞的影响了。

三、有时我们也用 FSC 参数圈门的办法除去死细胞。因为细胞死后一段时间会缩变, 使 FSC 参数变小。但是在大多数情况下这种方法不能完全去除死细胞的影响。

四、我们用 PI 溶液染活细胞样品中的死细胞, 因为细胞死后膜的完整性受到影响, 对 PI 分子的通透性增加, PI 结合细胞核中的 DNA 发出较强的红荧光。但必须注意 PI 的浓度不可过高, 过高浓度的 PI 溶液对活细胞有毒性。若要进行无菌分选, 分选后得到的细胞要洗去 PI 溶液。

五、此方法除去死细胞, 一定要注意仪器光学台部分的光学滤片的配置。如图 6。

1. 当仪器只有一个光电倍增管 (PMT) 用于测量荧光参数。我们只能测一个荧光参数。只要我们在图 6 中 F 1 的位置放上 530 的长通滤片, 也可用此法除去死细胞的影响。这样在这个 PMT 中同时收到不同波长的信号, 从而根据荧光强度差别除去死细胞。

2. 当仪器有两个 PMT 时, 通常可以测量

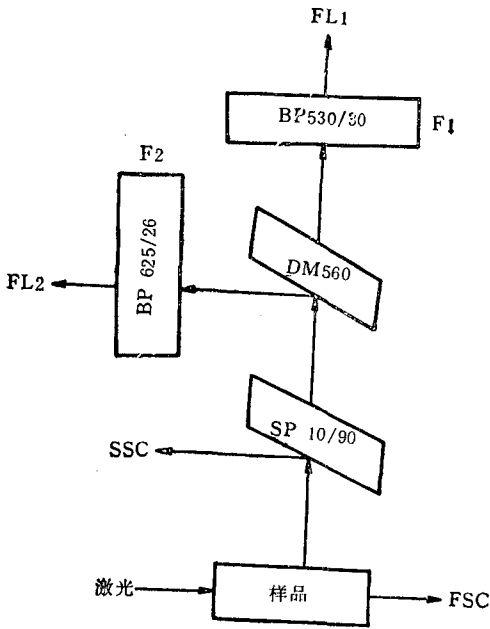


图6 光学滤片设置图

两个荧光信号。若活细胞样品是单染(FITC), 通常我们用第一个 PMT 测活细胞发射的绿光信号。用第二个 PMT 测死细胞发射的红光信

号。滤片设置如图6。

3. 若我们有两个 PMT, 而样品又是双染(FITC/PE)的活细胞悬液时。此时我们用第一个 PMT 测 FITC 发射的绿光信号。用一个580的长通滤片放在图6中的F2位置, 这样第二个 PMT 就可以同时得到 PE 和 PI 的信号。

这样设置滤片, 在数据处理时均可以达到去除死细胞的目的。

参 考 文 献

- 1 William L. Immunological methods. New York: Acad Press, 1985: 290—314
- 2 Howard M S. Practical flow cytometry. New York: Alan. R Liss, 1985:90—123
- 3 余滨, 龙振洲等. 医学微生物学. 第二版, 北京: 人民卫生出版社, 1986: 138—162
- 4 鄂征等. 组织培养技术. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 23—31
- 5 Phillip N D. Flow cytometry: Instrumentation and data analysis. London: Acad. Press. 1985:195—220

[本文于1989年5月19日收到]

米糠油皂脚中提取谷维素

谷维素作为一种较新的药品在生理、药物等方面的临床应用研究, 已证明其高效医疗性。本资料在阐述谷维素各种特性的基础上详细介绍了从米糠油皂脚中提取谷维素的工艺流程, 并附有实例及图示。资料费20元。(5661号) [北京市星火技术研究所, 北京867信箱20816组, 邮政编码: 100024, 李群]

棉酚的提取和利用

棉酚又称棉籽醇, 在医药方面还可作为阻聚剂, 具有吸氧性、治痒性。本资料详细介绍了棉酚的提取的精制技术。资料费20元。(5658号)

[北京市星火技术研究所, 北京867信箱20816组, 邮政编码: 100024, 李群]