

用 FCM 双参数测量膜抗原及核 DNA 的技术关键

李 鲲 付家瑜 薛文韬 陈珊珊

(北京医科大学人民医院血液病研究所, 北京 100034)

摘要 利用流式细胞仪同时定量测定细胞核 DNA 及细胞膜表面抗原, 对测量原理、条件、各种误差的消除方法及可行性进行了阐述, 建立了一种简便易行的测量与分析方法, 此方法已被应用于多项研究工作中。

关键词 流式细胞仪, 荧光补偿, 双参数相关测量

流式细胞仪 (flow cytometer, FCM) 能依据荧光强度间接地定量测定特定的被标记物。细胞膜抗原与带有荧光染料如异硫氰基荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 的抗体结合就能被 FCM 定量测出。用某些能与 DNA 结合的荧光染料如碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 则能测定每个细胞核的 DNA 量。若能同时进行 PI 与 FITC 双染法, 不仅能分别得到以上两种参数, 而且能分析两者的相关性, 从而扩展了细胞生物学的研究。国内目前尚未见此方法的报道, 本文拟介绍几个技术性问题及解决方法, 并对此方法的可靠性进行了分析和验证, 以便推广应用。

1 材料与方法

1.1 标本制备

取肝素抗凝的骨髓或外周血, 用比重为 1.077g/L 的淋巴细胞分层液分离出单个核细胞。

1.2 染色方法

取 5×10^5 个细胞, 首先用常规间接免疫荧光法对活细胞进行膜抗原标记。然后用 75% 冷乙醇 (4℃) 固定细胞 12h 以上, 再洗去乙醇, 经 RNA 酶消化后, 用终浓度为 50mg/L 的 PI 染 DNA, 15min 后上机测定。

1.3 FCM 条件

本文所用的是美国 Becton-Dickinson (B.

D.) 公司生产的 FACStar, 所用的激发光功率为 200mW, 波长 488nm。在第一荧光探测器 (FL1) 前置以 530/35nm 带通滤光片探测 FITC 所发的绿色荧光, 经对数放大器放大后的模拟数据以对数坐标的格式存于计算机的软盘或硬盘中。在第二荧光探测器 (FL2) 前置以 620/22nm 带通滤光片测 PI 所发的红色荧光, 经线性放大器放大后的模拟数据以线性坐标的格式存于计算机的软盘或硬盘中。以上数据均以 LIST 模式存储, 用 B. D. 公司所提供的专用程序 C30 分析数据。

1.4 测量步骤

1.4.1 按常规以鸡红细胞 (CRBC) 或荧光微球 (beads) 作调试样品。FL1 前置 530/30nm DF 滤光片。FL2 前置 585/42nm DF 滤光片。校准好仪器的工作状态。

1.4.2 对 DNA 定标: 把 FL2 光电倍增管前的 585/42nm DF 滤光片换为 630/22nm DF 滤光片, 以正常人的外周血淋巴细胞单染 PI 作为标准二倍体样品, 调整 FL2 上光电倍增管之工作电压, 使其测得的标准二倍体样品的 DNA 直方图的平均通道数在 64 频道 (channel) 上。如图 1 所示。

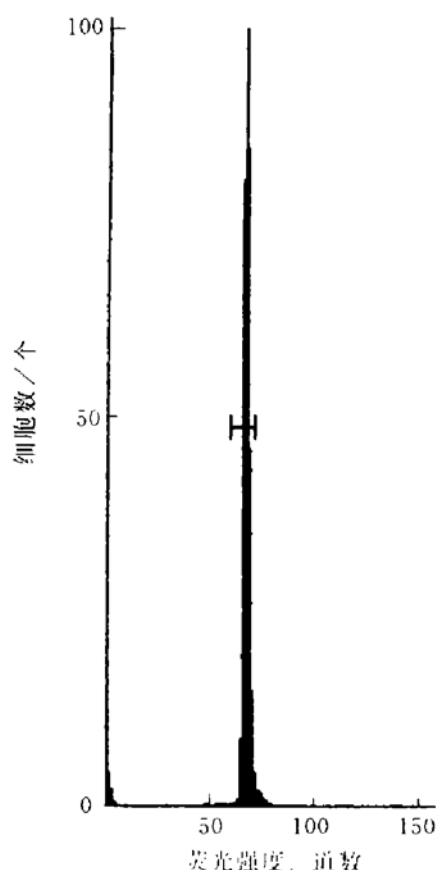


图1 正常人外周血淋巴细胞 DNA 直方图

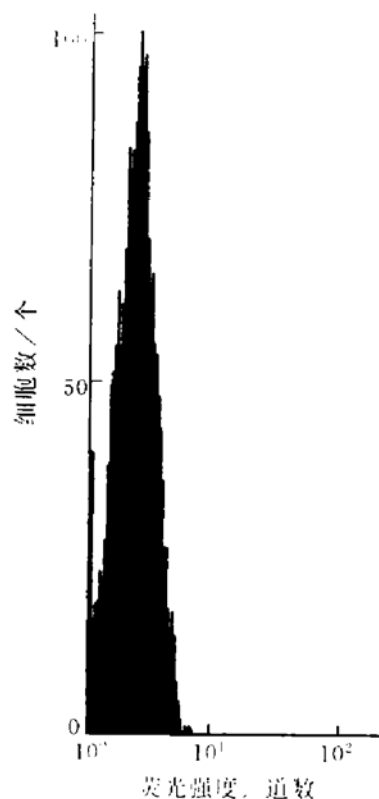


图2 待测样品免疫荧光阴性对照标本的直方图
最高荧光强度在 10^1 以内。

1.4.3 对免疫荧光定标 对每一病人的标本, 首先测量其只加二抗和 PI, 即免疫荧光为阴性的样品, 必须同时反复调整 FL1 上光电倍增管的工作电压和其相关的电子补偿线路之补偿, 使所测得的直方图的平均通道数为 2 左右, 且 CV 值为 40% 左右, 如图 2 所示。

1.4.4 保持仪器状态不变, 测量同一病人已双染过的一系列待测样品。

2 结果与讨论

2.1 结果处理

以 FL2 为横坐标, 以 FL1 为纵坐标, 从计算机的软盘或硬盘中调出数据作一散点图。参照其对应的阴性对照, 利用计算机程序, 可在其上设置四个区域。经计算机统计处理后, 就可知各区域中细胞占总体的百分比及平均荧光强度, 如图 3 所示。

2.2 PI 染色浓度

PI 的浓度在双染法测量时很重要: 染料浓度不够, 有些双链 DNA 中没有嵌入 PI 分子, 显然所测得的荧光强度低于其真实的强度; 若 PI 浓度过大, 就会有大量多余 PI 分子悬浮于溶液中。这不仅使探测 DNA 时分辨率下降, 更增加了进入 FL1 的红色荧光, 增大了对 FITC 测量误差。我们对一些样品做了不同浓度的试验 (每种浓度细胞数均为 1×10^6)。因单染 DNA 时 PI 浓度为 50mg/L 已达饱和, 试验的最高浓度就定在 50mg/L。试验结果如图 4 所示。从图 4 中可看出, 浓度为 50mg/L 时, 其对应的直方图 CV 值最小, 即相应的分辨率最高, 因而双染时最终选定 PI 浓度仍为 50mg/L。

2.3 克服两种荧光相互干扰的方法

2.3.1 消除 FITC 所发荧光对 DNA 测量结果的影响 虽然 FITC 最大发射荧光的波长在 530nm 左右, 但由于它的发射光谱很宽, 在 530nm 左右仍存在相当的光强。幸而 PI 的最大发射荧光波长在 630nm 左右, 这便为克服 FITC 的影响提供了一种简单易行的方法, 即当仪器用鸡红细胞或荧光微球核准后, 把 585/30nm 滤光片换为 630/22nm 滤光片, 就能阻

挡 FITC 荧光波及其进入 FL1 探测器. 由于抗体结合的 FITC 所发射的荧光强度远低于 PI

所发射的, 故采用此方法就能得到很满意的结果.

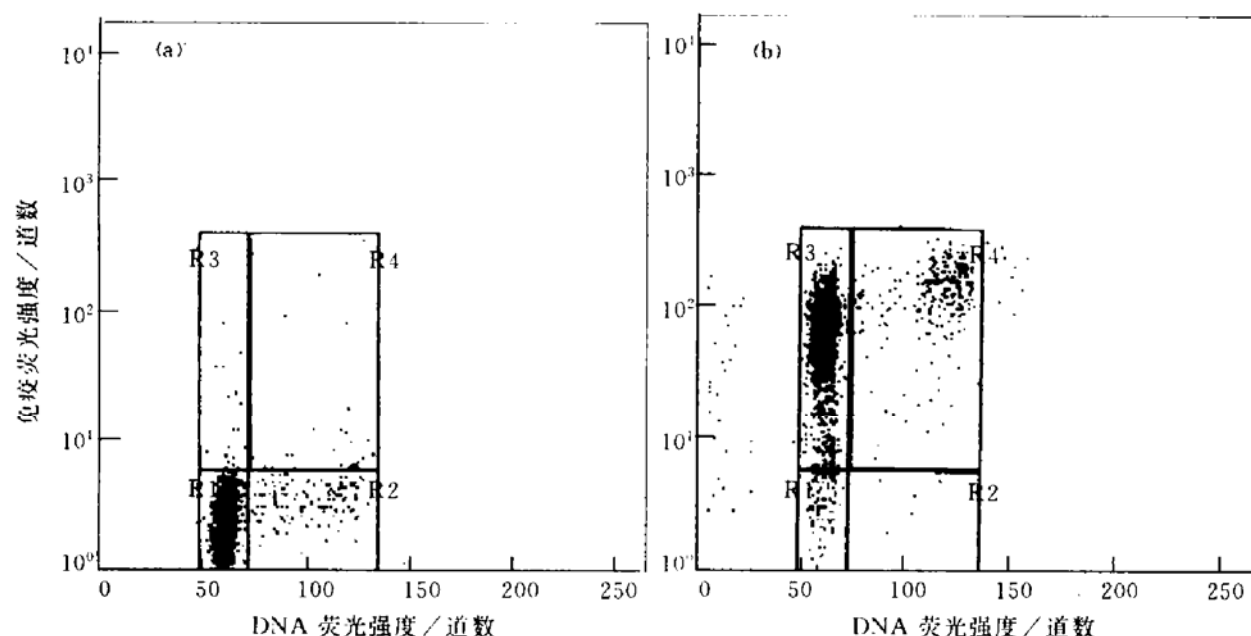


图 3 双染法所得的散点图

横坐标 (FL2) 示 DNA 荧光强度, 纵坐标 (FL1) 示免疫荧光强度, 每个点代表一个细胞. (a) 免疫荧光阴性对照的散点图. (b) 阳性样品的散点图. 其中, R1, R3 分别是免疫荧光阴性和阳性的 G0/G1 期细胞所在区域; R2, R4 分别是免疫荧光阴性和阳性的 S+G2/M 期细胞所在区域.

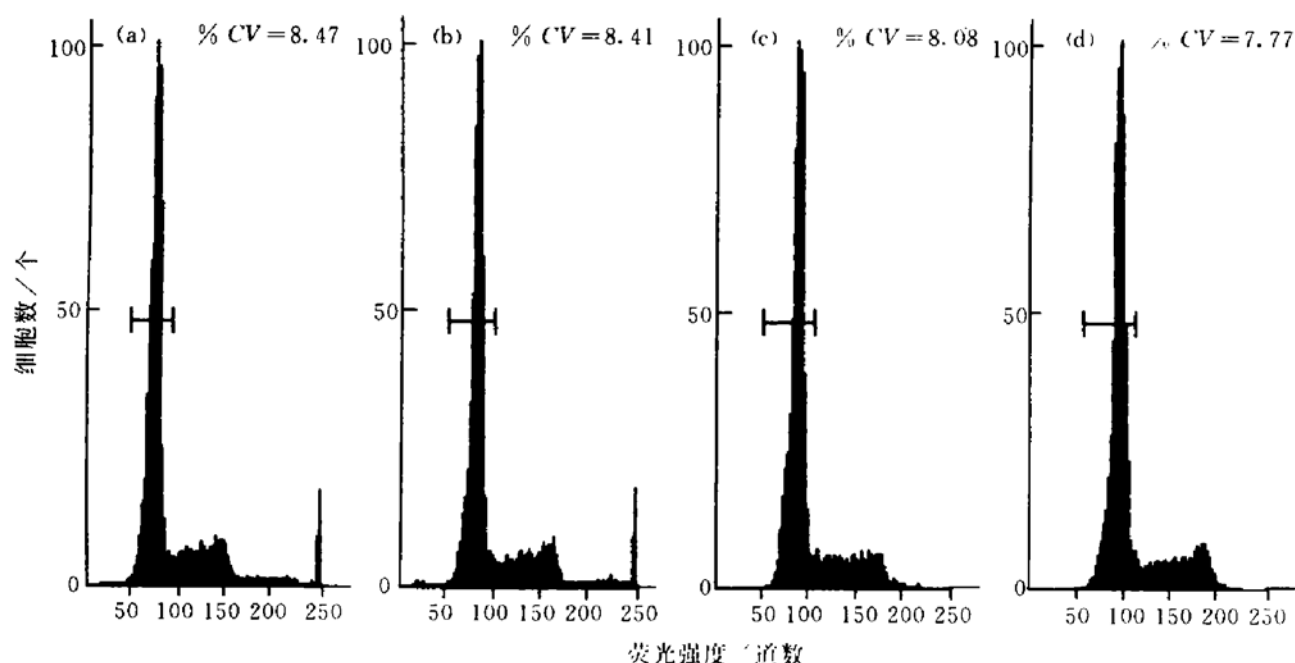


图 4 双染时不同 PI 浓度所染同一种细胞所得直方图

PI 浓度从 (a) — (d) 分别是 6.25mg/L, 12.5mg/L, 25mg/L 和 50mg/L.

2.3.2 消除 PI 所发荧光对测量免疫荧光的影响 我们通过实验发现, PI 染 DNA 后所发射的荧光强度远远大于 FITC 结合抗体后所发射

的荧光, 即使在 530nm 左右仍有较高的光强, 当它也进入 FL1 后, 就会淹没 FITC 所发的绿色荧光, 从而产生免疫荧光假阳性结果. 克服

的办法是采用电子补偿线路来补偿掉这部分光。补偿的程度在此至关重要:若补偿不够,仍有一部分红光细胞样品出现假阳性结果;而补偿过大,会“压缩”FITC之直方图,使阳性和阴性细胞群体因太靠近而不易区别,给计算结果带来很大误差。我们通过大量试验及摸索,认为必须同时调整加到光电倍增管上的电压和补偿才能得到较好的效果:FITC直方图在用对数放大器时的平均强度调到2,并使其CV值在40%左右较为适合,如图2所示。

2.4 可靠性分析

由于用PI单染DNA,用标有FITC的单抗标记某一抗原的方法已得到了公认,故而就以双染的结果分别与相应单染的结果作比较,借以评估此方法的可靠性。

2.4.1 对抗体测量结果进行比较 先把只标记单抗而未染PI的样品上机测量,再染PI后上机测量,用以下公式计算出由于染上PI而对所测FITC产生的误差(D1):

$$D1 = \frac{\text{双染时阳性率} - \text{单染FITC时的阳性率}}{\text{单染FITC时的阳性率}} \times 100\%$$

统计了10例病例,结果为 $D1 \pm s = 1.25\% \pm 0.18\%$ 。若取置信概率为95%,则其置信区间为0.97%—1.60%。

2.4.2 对所测DNA结果的评估 对同一个病人,以未标上FITC的阳性对照所测之DNA作为该病人的实际DNA含量,用其标上FITC的阳性样品所测的DNA含量与之相比,用以下公式计算出由于标上FITC而对所测DNA产生的误差(D2):

$$D2 = \frac{\text{FITC为阳性时的DNA含量} - \text{FITC为阴性时的DNA含量}}{\text{FITC为阴性时的DNA含量}} \times 100\%$$

统计了62例病例,其结果为 $D2 \pm s = 0.17\%$

$\pm 1.21\%$,若取置信概率为95%,则其置信区间为-1.04%—1.38%。

由此我们可以认为以上步骤是可以克服两种荧光的相互干扰的。

本方法虽然是以人的外周血和骨髓为例,但对于其它组织细胞,其测量方法相同,只需制备成单个细胞悬液。本方法已用于膀胱肿瘤细胞DNA及膜ABO(H)同型抗原双标记的测定中,获得较满意结果^[4]。总之,本文为同时测量相互荧光强度差异较大,光谱又有部分重叠的两种荧光素提供了一种切实可行的方法。

参 考 文 献

- 1 Tsurusawa M. Am J Hematol, 1989; 32: 42
- 2 陈珊珊,刘艳荣,李 鲲. 北京医科大学学报, 1989; 21: 4
- 3 张海帆,陈珊珊,薛文韬等. 北京医科大学学报, 1991; 23: 5
- 4 侯树坤,张晓东. 中华泌尿外科杂志, 1992; 13: 3

The Key Problems in Detecting Cell Surface Antigen and Cellular DNA Dual Parameters by FCM. Li Kun, Fu Jiayu, Xue Wentao, Chen Shanshan (*Institute of Hematology, People's Hospital, Beijing Medical University, Beijing 100034, China*).

Abstract The principle, the way to eliminate error and the possibility of detecting cell surface antigen and cellular DNA dual parameter by FCM are introduced. It also gave a simple and practical procedure in measurement and analysis. This method has been used in many research and work.

Key words FCM, fluorescence compensation, dual-parameter measurement