

流式细胞术的应用及结果处理

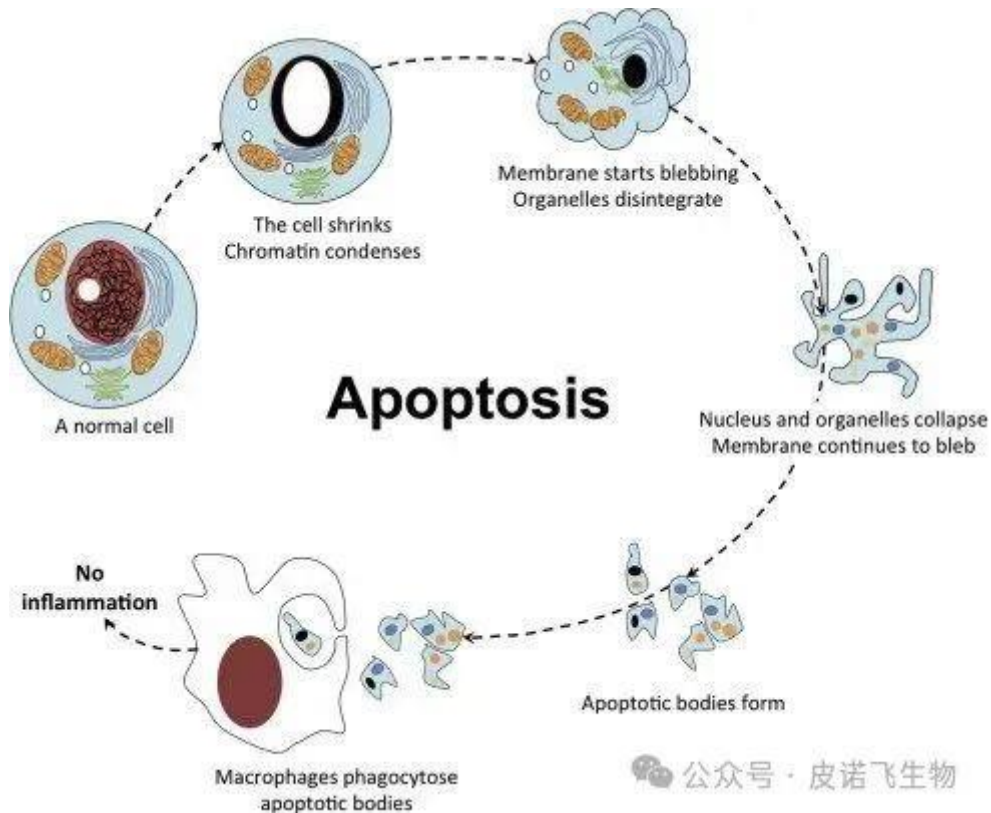
原创：湖北皮诺飞生物 2025 年 02 月 27 日

背景介绍

流式细胞术（Flow Cytometry, FCM）是一种高效的生物技术，用于对单个细胞进行分析和分选。这项技术融合了细胞生物化学、单克隆抗体、激光、流体力学、电子技术、计算机技术、分子生物学以及临床医学等多种理论。FCM 能够对大量细胞或非细胞颗粒的物理、生理、生化、免疫、遗传和分子生物学特征及其功能状况进行定性和定量的检测。自从现代流式细胞仪问世以来，经过了 40 多年的发展，已在基础研究和临床实践等多个领域得到广泛应用，包括分子生物学、细胞生物学、遗传学、免疫学、肿瘤学、血液学、药理学和植物学等，在生物学研究中发挥着重要作用。FCM 具有高通量、多参数、快速和灵活操作等特点，可以收集大量数据。

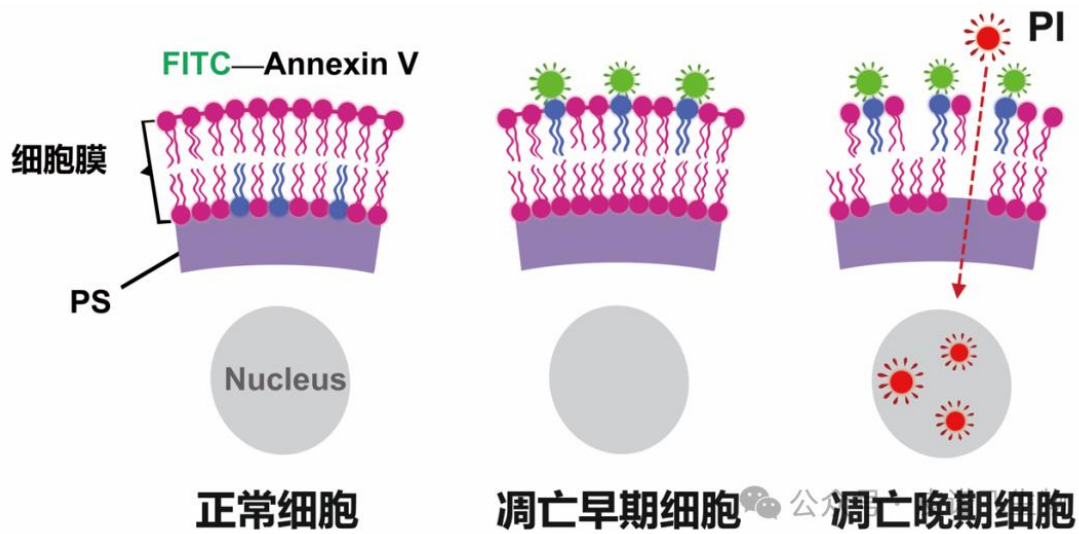
细胞凋亡检测

细胞凋亡是一种程序性细胞死亡的现象，广泛存在于生物体内。在细胞凋亡的过程中，细胞核的染色质会经历一系列形态学的变化，具体可分为三个阶段：在凋亡的第一阶段，细胞核中的染色质高度盘绕，并出现多种称为气穴的空泡结构；第二阶段时，染色质高度凝聚并向核边缘聚集；在第三阶段，细胞核裂解成碎片，形成凋亡小体。同时，凋亡细胞的体积减小，细胞质变得更加浓缩。

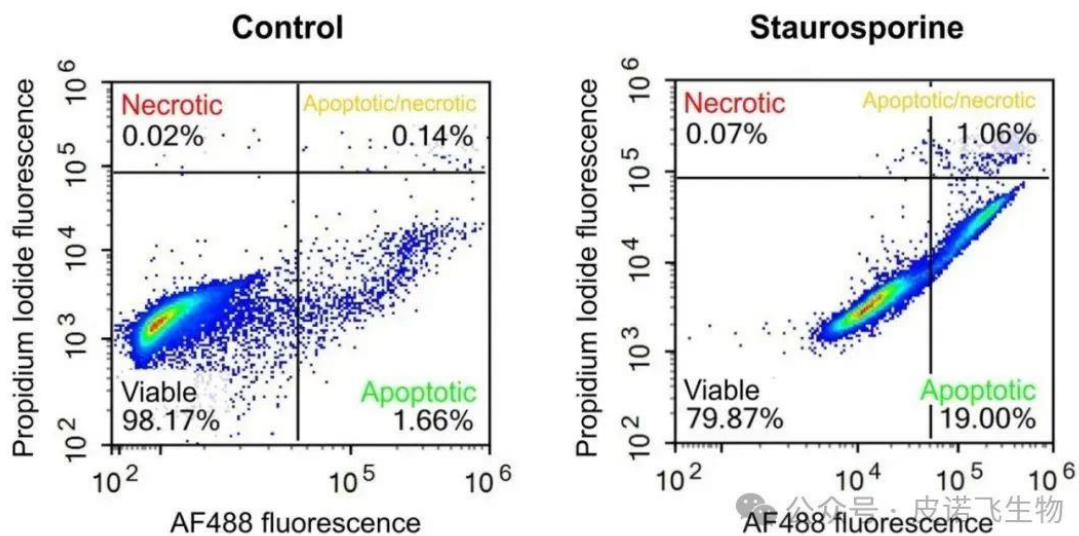


在正常细胞中，磷脂酰丝氨酸（PS）主要位于细胞膜的内层。然而，在细胞凋亡的早期阶段，膜上的 PS 会发生翻转，从内侧转移到外侧，暴露于细胞外。Annexin V 是一种分子量为 35~36KDa 的钙离子依赖性磷脂结合蛋白，能够与 PS 高度特异性结合，因此常被用作检测早期细胞凋亡的灵敏指标。不过，Annexin V 无法区分已经经历坏死的细胞（中晚期凋亡细胞）与早期凋亡细胞。碘化丙啶（PI）

是一种不能穿透完整细胞膜的核酸染料，但在细胞经历中晚期凋亡或死亡时，细胞膜的通透性增加，从而允许 PI 进入并使细胞核染上红色。而早期凋亡细胞和活细胞的细胞膜仍然完好，因此 PI 无法进入这些细胞。

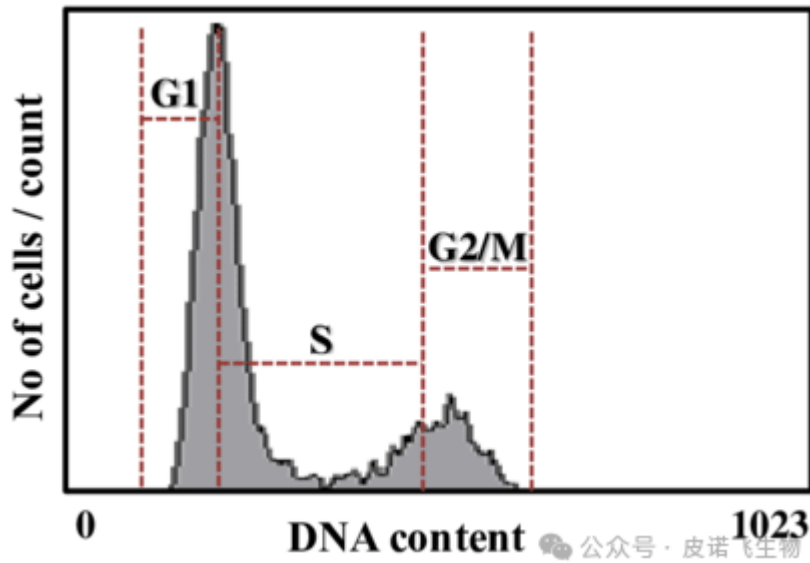


通过联合使用 Annexin V 和 PI,可以对处于不同凋亡阶段的细胞进行区分：活细胞为 Annexin V⁻/PI⁻，早期凋亡细胞为 Annexin V⁺/PI⁻，晚期凋亡细胞和坏死细胞则表现为双阳性（Annexin V⁺/PI⁺），而坏死细胞或因机械性损伤导致的细胞则是 Annexin V⁻/PI⁺。



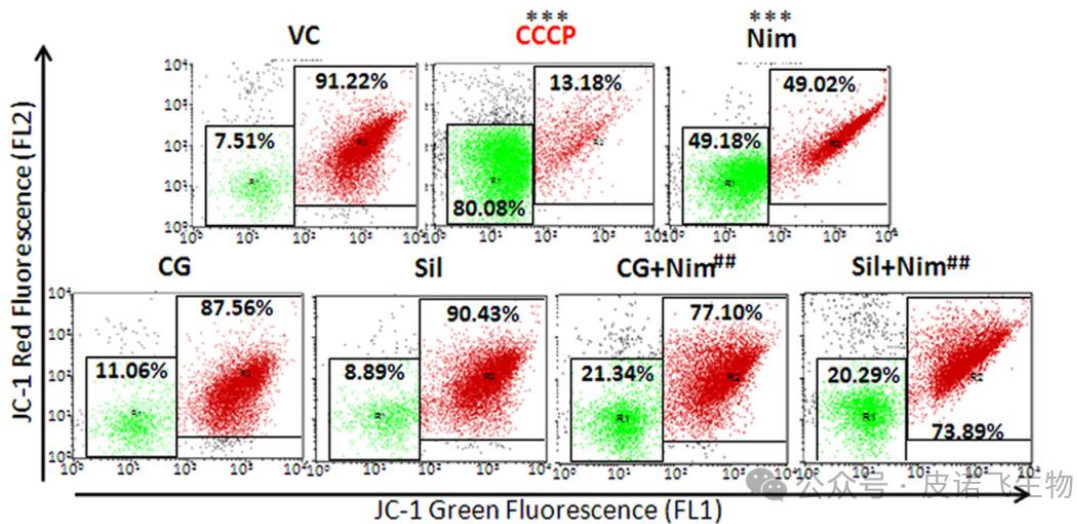
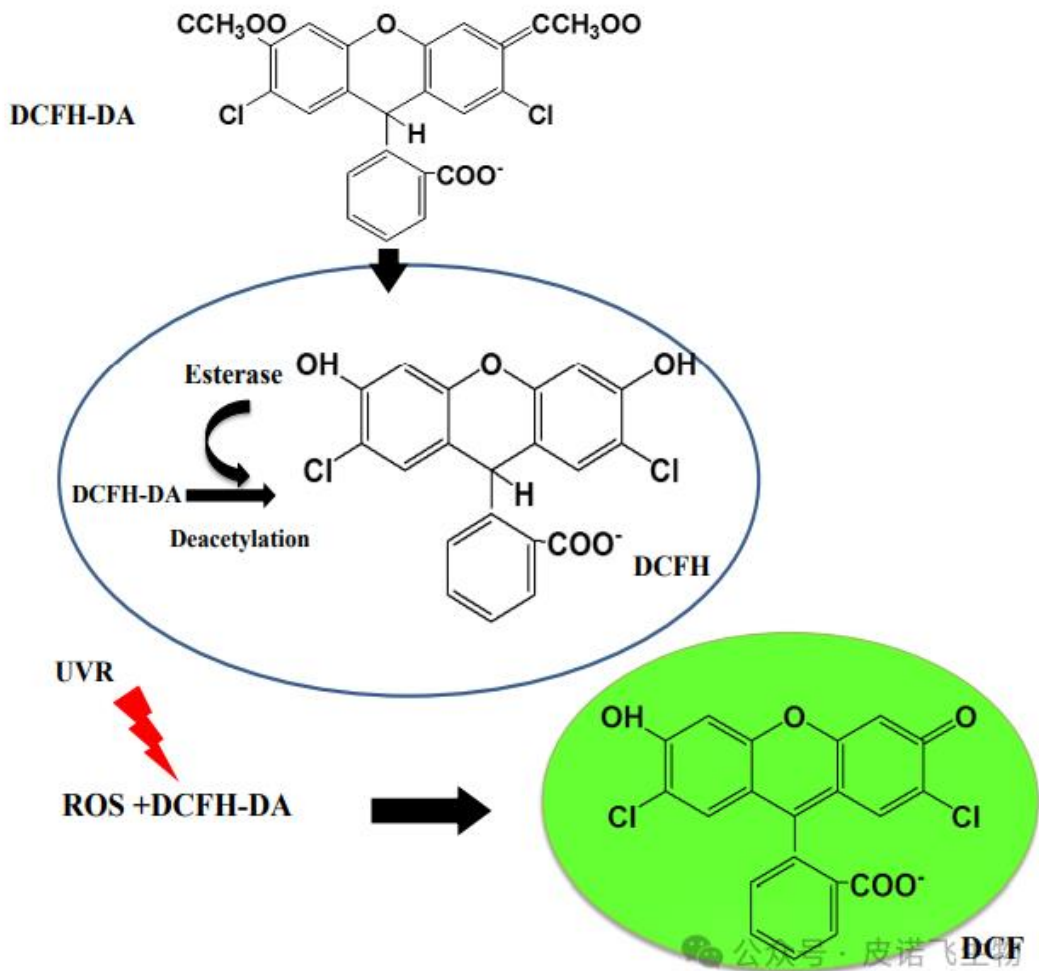
细胞周期检测

细胞周期是指细胞从一次分裂完成开始到下一次分裂结束所经历的全过程，在真核生物中，细胞周期分为处于阻留状态的 G₀ 期、分裂间期、分裂期（M 期），其中，分裂间期又分为 DNA 合成前期（G₁ 期）、DNA 合成期（S 期）与 DNA 合成后期（G₂ 期）。PI 染色法是较常见的一种周期检测方法，PI 可嵌合到双链 DNA 和 RNA 碱基对中并与之结合，当其与双链 DNA 结合后可产生荧光，其荧光强度与 DNA 含量成正比。由于细胞周期各时期 DNA 含量不同，因此，通过流式细胞仪结合 PI 染色法对细胞内 DNA 含量进行检测，可将细胞周期各时期区分为 G₁/G₀ 期、S 期和 G₂/M 期，同时获得流式直方图对应各细胞周期。



ROS 与线粒体膜电位检测

关于细胞活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 检测的详细信息, 请参见“活性氧 ROS 检测攻略大全”一文。利用流式细胞仪检测 ROS 的方法是通过荧光染料或荧光探针对细胞进行标记, 直接观察细胞荧光信号的变化。其中, 最常用的荧光探针是 2,7-二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA), 我们也采用这种方法。其检测原理是: DCFH-DA 本身没有荧光, 能够自由穿过细胞膜。进入细胞后, DCFH-DA 会被细胞内的酯酶水解生成 DCFH, 而 DCFH 无法穿过细胞膜, 因此会在细胞内积聚。细胞内的 ROS 可以氧化无荧光的 DCFH, 生成具有荧光的 DCF, 其荧光强度与 ROS 水平成正比。这种荧光可以在流式细胞仪的相应通道中被检测到。

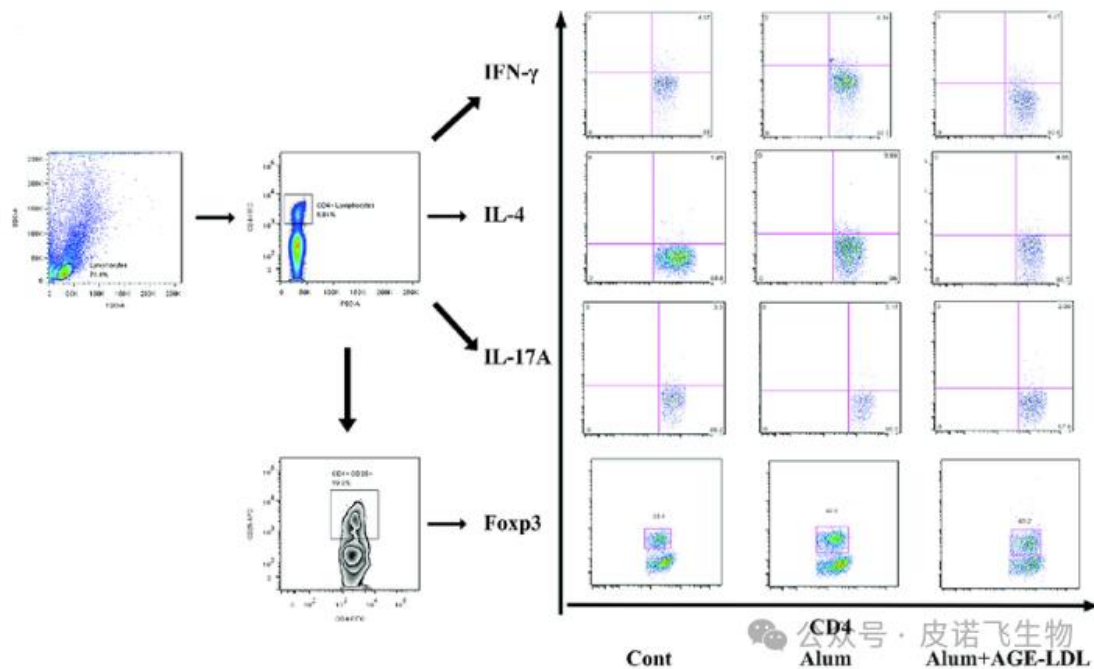


线粒体是动植物细胞中主要的 ATP 生成场所，对于细胞能量转换和细胞凋亡具有重要作用。在线粒体的呼吸氧化过程中，能量以电化学势能的形式储存在线粒体内膜之间，导致内膜两侧质子及其他离子的浓度分布不均，形成线粒体膜电位（Mitochondrial membrane potential, MMP, $\Delta\Psi_m$ ）。关于 MMP 的详细信息可以参考“线粒体膜电位检测”相关文献。目前，评估线粒体功能时，常使用线粒体膜电位荧光探针，其中 JC-1 是广泛应用于线粒体膜电位检测的理想荧光探针，也是我们公司常用的方法。在健康细胞中，JC-1 通常表现为

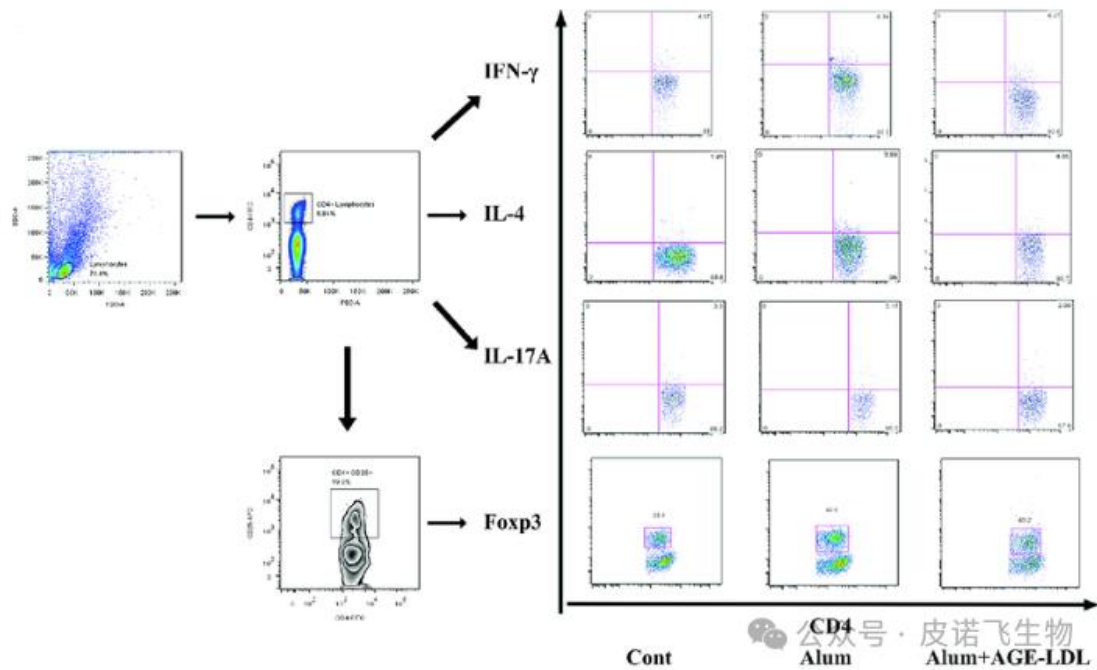
红色荧光，而线粒体去极化的细胞主要显示绿色荧光。流式细胞仪能通过收集荧光信号，将荧光强度可视化展示。

细胞表型鉴定与分选

众所周知，免疫细胞是由造血干细胞分化而来的，种类繁多且复杂。科学家根据其特性将免疫细胞分为两大类：固有免疫细胞和适应性免疫细胞。适应性免疫细胞包括 T 细胞和 B 细胞，其中 T 细胞又分为多种亚型，如辅助性 T 细胞（包括 Th1、Th2、Th17 和 Treg 等亚型）和杀伤性 T 细胞等。而固有免疫细胞同样种类繁多，包括固有淋巴样细胞、单核细胞、巨噬细胞、粒细胞、树突状细胞（DC 细胞）和自然杀伤细胞（NK 细胞）等。



如何准确鉴定和分选特定亚型的免疫细胞，一直以来都是科研人员亟需解决的重要问题。随着抗体技术和流式细胞术的发展，研究者发现流式细胞术可以通过使用特定的抗体探针对细胞表面蛋白进行标记，从而实现细胞表型的定量和定性分析。这项技术主要用于研究免疫细胞的分布、表达及功能，涉及的细胞类型包括 T 细胞、B 细胞、树突状细胞、粒细胞、单核细胞、自然杀伤细胞和巨噬细胞等。



随着流式细胞仪的不断升级，现代流式细胞仪不仅能够完成免疫细胞的谱系标记（大部分免疫细胞都具有特定的 CD 标记，如 T 细胞的 CD3、CD4、CD8，B 细胞的 CD19 和 CD20 等），还能够表征每个细胞群体的功能（例如 CD69、CD25、CCR5、CCR6、CXCR4 等标志物）。流式细胞术不仅适用于上述表面标志物，也同样适用于胞内标志物的检测（如 FoxP3 用于鉴定调节性 T 细胞，IFN- γ 、TNF- α 和 IL-2 用于定义 TH1 细胞等）。此外，部分流式细胞仪还具备将标记后的细胞进行分选的功能，以便后续培养不同亚型的免疫细胞。

其他与生物学相关的检测

流式细胞术不仅可以用于细胞增殖和活性鉴定（例如：CFDA、CFSE、FDA 等荧光标记），还可用于离子通道检测（如常见的钙通道检测）、氢乙啶或二乙酸二氯荧光素标记后的细胞因子鉴定、蛋白质工程、细菌分选和生物制剂等多个领域。由于篇幅有限，本文仅介绍流式细胞术的一些常见应用，感兴趣的读者可自行查找流式细胞术在其他生物学领域的应用及相关案例。**对照设定**关于对照的设置，通常流式细胞术的对照分为五大类：仪器对照、补偿对照、实验对照、门控对照和特异性染色体对照。其中，仪器对照用于检测仪器的正常运行，其他对照则需要实验者根据具体实验进行设定，设置原则如下：1、补偿对照：当不同的荧光染料发射光谱发生重叠时，校正溢漏现象的过程称为补偿。在调整补偿时，需要制备每种荧光染料的单一染色样品，并遵循一些基本原则：①补偿对照的亮度应与实验样品相同或更高；②补偿用的荧光染料要与实验中使用的荧光染料完全一致；③所有对照群体的自发荧光（包括阳性和阴性）应相同；④细胞收集的数量应超过 5000。2、实验对照：和其他生物学实验一样，流式细胞术实验的对照包含阴性对照（显示所有待测标志物的背景表达）、阳性对照（确认抗体或染色剂在相关细胞中的阳性染色）。此外，还需要设置纵向对照或参考对照，以确保实验过程中染色的一致性。3、设定门控：在分析流式细胞术数据时，最重要的一步是正确设定门控。当细胞群体不易界定或数量较少时，需要使用荧光减一对照

（Fluorescence Minus One, FMO）来帮助阐释流式数据并准确设门。在设门时，检测细胞的 DNA、RNA 及总蛋白等内容时应采用线性放大；而在检测细胞表面抗原时，则应使用对数放大。流式细胞术中设门的方法多种多样，如十字门（常用于凋亡检测）、圆形门、矩形门以及不规则门等，因此在画门时可以根据实际形状灵活调整。关于更多的设门技巧，小医将在后续文章中详细讲解！4、特异性染色体的对照方法中，抗体与细胞的结合方式主要有三

种：**a. Fab 区与抗原结合（理想情况）；b. Fc 区与 Fc 受体结合（通常不希望出现的情况）；c. 非特异性结合（例如脱靶抗原或“粘”附在细胞膜上）。**在进行各类流式细胞术分析时，避免非特异性结合的最佳策略包括：**a. 对所有试剂进行正确的滴定；b. 封闭细胞的 Fc 受体；c. 添加细胞活性染料，以排除死细胞的干扰。**