

流式细胞术

谢小梅^{1*} 许 杨²

(1 江西中医学院 南昌 330006 2 江西 OAI 联合研究院 南昌 330047)

摘要 流式细胞术是一种综合应用光学、机械学、流体力学、电子计算机、细胞生物学、分子免疫学等学科技术,对高速流动的细胞或亚细胞进行快速定量测定和分析的方法。它一秒钟能分析几千个细胞,并同时测定细胞的多个参数,广泛应用于生物医学的许多领域,如测定细胞的特征(形态、膜电位等)和细胞内 pH, 细胞 DNA、蛋白质含量、表面受体、 Ca^{2+} 等。对生物工程学来说,了解细胞的这些参数尤为重要,因为它们能比用传统技术测得的数据更好地描述细胞群体。从流式细胞仪对细胞多种参数的测定及原理,到它在生物工程学中的应用等方面进行了介绍,并讨论了流式细胞术的局限性和面临的挑战。

关键词 流式细胞术

已有许多分析工具用来获取生物工艺过程的详细信息,这些信息不仅可以加深对生物工艺过程的认识,而且也作为优化生物工艺或决定工艺策略的基础。一般来说,用这些工具得来的数据是整体的,即整个细胞群体的某个参数的平均值。相反,代表不同细胞群的数据能提供更多的信息,因为在一般情况下,并不是所有的细胞都处于相同的代谢和生理状态。如果人们能够检测到多种细胞群,尤其是处于不同代谢活性的细胞亚群,那么生物工艺的优化将是更有效的。

流式细胞术可为这些细胞群体提供特殊和详细的分析,进行流式细胞术时,激光束照射在流过的单个细胞或颗粒上,每个细胞或颗粒与激光束相互作用,产生的吸收作用和荧光散射信号等能被检测到。这些数据反映不同的细胞特征和细胞的不同成分含量。因此,通过流式细胞术将容易获得单个细胞的多个参数。流式细胞术首先应用在医学领域的肿瘤学和血液学(肿瘤的诊断、染色体缺陷诊断)。

最近几年,流式细胞术也已成为生物学、药理学、毒理学、细菌学、病毒学、环境科学和生物工艺监控的有用工具。本文主要介绍流式细胞术对细胞多种参数的测定及原理、在生物工程学方面的应

用,并讨论流式细胞术的局限性和面临的挑战。

1 流式细胞仪可测定的参数及原理

流式细胞仪通过对染色细胞和未染色细胞的光散射、荧光和吸收量的测定,可得到细胞的多个参数,如细胞的大小、胞质颗粒、细胞形态、膜电势、胞内 pH, 细胞活性、细胞内氧化还原状态、DNA、RNA 含量、酶活性、蛋白质、抗原、PHB (polyhydroxybutyrate, PHB) 含量、细胞内钙离子浓度、固醇含量;结合使用不同的染料,上述的参数可以同时测定。根据不同散射光的信息,甚至同时检测 6 种荧光染料。下面介绍流式细胞仪如何测定上述参数。

1.1 激光吸收和散射测定

前向散射光用于测定细胞大小,若要确定细胞的绝对大小,必须用适宜大小的聚苯乙烯珠子作参照进行校正。测定细胞大小时,也可以同时测定细胞其他任何参数。

1.2 荧光强度测定

流式细胞仪的许多应用是基于其对荧光含量的检测,根据他们对试剂的需要,可测量的细胞参数分为内源性和外源性。不需要对细胞前处理即可进行内源性荧光量的测定,而研究某些特殊的细胞成分时,需要使用外源性的荧光染料,这时,就必须有染色、细胞固定、染色和冲洗等步骤。荧光的强度与细胞内各种组分的含量成正比,根据荧光信

收稿日期: 2003-02-20 修回日期: 2003-07-11

* 电子信箱: 1990xxm@sohu.com

号的强度可知细胞内各组分的含量。

1.3 细胞活性和生理状态测定

在评估生物工艺流程时, 培养物中的活细胞浓度是主要参数。根据细胞膜是否完整, 有多种方法可以测定细胞活性。缺陷的细胞可使细胞内成份如蛋白质和其他荧光物质失去。膜的完整性可通过用染料排斥或染料保留法来测定。排斥性染料可使细胞膜缺损细胞的核酸染色(一般认为是死细胞)。经常使用的染料是碘化丙啶(PI)和溴化乙啶, 它们可使DNA和RNA染色。已有一些高效染料, 它能测定低含量DNA的微生物, 如Sytox Green染料, 被用来检测细菌活性^[1]。相反, 染料保留法则利用非荧光的酯酶底物作为活性探针, 这种染料被胞内酶(存在于活细胞内)分解产生荧光产物, 如荧光素二乙酯盐。

胞内pH是调节细胞活性的主要因素, 也被用来指示细胞的生理状态和代谢活性。许多荧光酯酶底物如BCECF-AM(2', 7'-bis carboxyethyl 5, 6-carboxy fluorescein)、Calcein AM和各种荧光素二乙酯盐衍生物等可用来检测胞内pH^[2]。

膜电势的变化是指示膜早期受损的指标, 存在于细胞膜内外的不同电势能是由于 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 离子的浓度梯度造成的。这些电势能在10mv~200mv之间(根据不同的微生物、培养条件)。检测DIOC₆(3)(3, 3'-dihexyloxacarbocyanine iodide)的荧光强度的变化, 可反映膜电势的大小, 并发现它与细胞受损程度有关^[3]。染料JC-1(5, 5', 6, 6'-tetrachloro 1, 1', 3, 3'-tetraethyl benzimidazolyl carbocyanine iodide)和罗丹明123已用于研究线粒体膜电势的大小^[4]。

1.4 细胞凋亡检测

细胞程序死亡(即凋亡)是一种受基因控制的细胞死亡, 通过生化和形态变化可区分细胞的凋亡和细胞的死亡。细胞凋亡时, 形态上出现胞质减少、染色质皱缩、凋亡小体; 生物化学上将出现基因断裂、蛋白质的裂解和降解, 用流式细胞仪已建立区别活细胞、早期或晚期凋亡细胞、坏死细胞的方法。荧光素与膜联蛋白的偶联物用于检测凋亡时最早的信号即磷脂酰丝氨酸。人类抗凝膜联蛋白V是一种与磷脂酰丝氨酸有高度亲和性的磷脂结合蛋白, 在正常活细胞中, 磷脂酰丝氨酸位于细胞膜的胞质面, 凋亡细胞则从细胞膜的胞质面转移至

细胞膜的胞壁面, 凋亡细胞和非凋亡细胞含量相差约100倍。膜联蛋白V-磷脂酰丝氨酸的复合物与荧光素的结合程度可被流式细胞仪检测到。Plasier等^[5]已用膜联蛋白V亲和试验通过流式细胞仪和自动影像分析技术检测哺乳动物细胞的凋亡, 认为该法能快速检测哺乳动物细胞培养物中的活细胞、凋亡细胞和坏死细胞, 而且还发现细胞形态的变化先于细胞表面磷脂酰丝氨酸的出现。

1.5 细胞周期分析和核酸含量测定

用于测试细胞活性试验的核酸特异性染料也用于细胞周期和核酸含量分析。由于这些染料可同时结合RNA和DNA, 因此, 当测定其中一种核酸时, 就必须用RNA酶或DNA酶消化另一核酸。而且待检细胞应首先用表面活性剂(如吐温20)处理, 使其具有通透性。本实验室正在用流式细胞仪结合EB一步插入法染色测定中药活性成分对黄曲霉、烟曲霉DNA含量及细胞周期的影响。

在生物工程学应用方面, 细胞周期和核酸含量分析一直用于监控微生物的生理状态和生长行为, 如Hewitt等用流式细胞仪同时结合多种染料可快速监测微生物发酵期间细胞的生理状态, 认为该法至少可同时区分细胞群体中4种不同生理状态的细胞亚群^[6]。

1.6 胞内钙离子浓度测定

胞内钙离子浓度对细胞许多功能如酶的活性起着主要作用。在生物工程领域, 生物反应受到钙和镁离子浓度的影响。二十多年来, 已发展了许多用来测定钙离子浓度的染料, 并大多用于临床。Fura 2/AM用于测定中国仓鼠卵巢细胞培养物中过氧化氢的作用。认为升高的钙离子浓度可以保护细胞免受过氧化氢诱导的线粒体损伤和细胞受损^[7]。

1.7 流式细胞术的局限性

流式细胞仪用于生物工程领域有它的局限性。主要由于其设备昂贵, 需专业操作人员, 标本需前处理等。另一局限性是需要制备单细胞悬液。若悬液中细胞聚集成团, 则将影响结果, 因此, 必须用机械的或酶的方法将细胞分散, 制备成单细胞悬液。使用荧光染料时, 需将细胞打孔以使荧光染料或抗体进入细胞内。测定细胞内成份时, 要有反复冲洗步骤。探针的前处理也是费时的, 而且细胞大小也受校正颗粒的折光指数的影响, 这可能是误差产生的来源。不断发现的新染料可望解决流式细

胞仪测量敏感性的问题。

2 流式细胞仪在生物工程领域的应用

2.1 用于监测细菌培养

在过去的几年中,流式细胞术已成为研究细菌生长行为的一个重要工具。制定生物工艺过程的策略,有效改进工艺必须依赖于对细胞生长、细胞周期和细胞活性的研究。流式细胞术也用于检测细菌产生胞内产物的能力。如 Nile 红染色用于检测 PHB, PHB 是含碳的能源,并可被生物降解利用的一种热塑性聚合物,已有利用乙酸钙不动杆菌来生产 PHB 的报道^[8]。

流式细胞术十分有趣的应用是利用荧光标记的靶 rRNA 寡聚核苷酸探针进行原位杂交来鉴别不同微生物。Hermann 等用这种方法鉴别了在混合培养物中的乙酸钙不动杆菌 69-V 和真养产碱杆菌 JMP-134^[9]。通过测定细菌活性的变化,流式细胞术可用来检测细菌对抗生素的敏感性。用 FUN-1 染料可测定分生孢子的代谢活性,将孢子接种在含不同浓度 amphotericin B (AMB) 的培养基中 3h,用 FUN-1 染色,根据前向散射角和侧向散射角的平均荧光强度的变化,可确定 MIC 值(最低抑菌浓度)^[10]。

流式细胞术测定质膜极化状态和膜通透性的方法也用于研究大肠杆菌在糖限制、补料分批培养时的细胞活性。在食品工业上,流式细胞术用于质量监测,如快速检测牛奶中污染的细菌数量^[11]。

2.2 用于监测酵母培养

在生物工程领域酿酒酵母一直是用流式细胞术研究最为广泛的一种微生物。主要是由于酿酒酵母在工业上的重要性。因其易培养和已知的基因背景,已发表了许多有关酵母的生物化学和细胞周期等方面的文章。流式细胞术在研究酵母的细胞周期方面极具价值。在某些特殊条件下,连续培养时,酿酒酵母的生长可趋向同步化。因此,该系统是用流式细胞术研究细胞周期和细胞生长行为的理想材料。流式细胞术能够监测细胞周期过程中的变化以及发酵有关的其他参数的变化。因此便于优化生物工艺过程。在酵母细胞的同步培养液中,对 CO₂ 的产量与细胞周期进行分析,发现 CO₂ 的产量最高时细胞周期中同步期的细胞数量也最大,即表示此时细胞代谢活动的增加。同样,

培养物流量的变化、乙醇产量的变化以及呼吸商均与细胞周期相对应。可通过测定同步培养物中细胞周期来研究细胞生长动力学^[12]。也可用非同步生长培养物来进行细胞周期分析,如一种双重流式细胞术标记可以用来追踪稳定生长期新生的酿酒酵母的细胞动力学变化^[13]。流式细胞术还用于测定酵母细胞的胞内总蛋白含量。

在酿酒工业,流式细胞术可用于监测整个工艺过程,并对其优化以及质量监控。Müller 等报道,通过测定在发酵和储存期间 β -hydroxysterol (β -羟基固醇)、中性脂的变化可了解酿酒工艺过程和质量^[14]。

2.3 用于检测哺乳动物细胞培养

流式细胞术也可用于测定哺乳动物细胞的许多参数,尤其是细胞周期中的变化,如细胞大小、细胞内某些成分的含量等。用一种可以可逆性通透细胞膜的单克隆抗体,可直接测定相应的可溶性细胞内蛋白。一个最典型的例子是研究淋巴细胞的细胞内因子的分泌(r INF、 α TNF)^[15]。 r INF、 α TNF 一直是近几年研究的热点。

由于绿色荧光蛋白(GFP)可作为基因表达的报道分子,流式细胞术可利用它来检测菌株细胞内产物的表达情况。细胞株可以设计成能使 GFP 同步表达,并与目标蛋白的表达量相一致。其荧光含量的测定结果可用于指导产量的控制、细胞株选择、质量控制^[16,17]。已生产不同突变形式的 GFP,并已对中国仓鼠卵巢细胞、酿酒酵母的野生型和突变型的 GFP 进行了比较^[18],根据这个设想可望用改进的蓝、绿和黄色荧光蛋白进行多颜色分析,这种技术提供了可同时测定细胞内不同胞内产物的可能性。

2.4 生物工艺过程的在线控制

对生物工艺过程的控制和优化要求有能够监测生物反应器的代谢过程和细胞生长的快速现代化分析方法。在线分析方法正好满足这种需求,人们通过它便于调节生物工艺过程。流式细胞术可以快速测量细胞各个重要参数,因此,对生物工程的在线控制非常有用。流式细胞仪与流式注射系统(FIA)相结合可以对生产过程进行在线控制^[9]。将来自生物反应器的标本泵入循环式反应器与荧光染料反应,然后再流入流式细胞仪进行测定。FIA 系统完全自动化,使快速测定细胞数量、活性和细胞大小成为可能。这个系统可以不需要操作

者而自动工作数天。

已经建立一种带有微室的(用于处理标本)流式注射系统用于直接测定细胞的生理状态, 该微室可进行样本在线稀释, 同时也进行样本固定、染色、冲洗。该系统的流式注射部分可通过分光光度计在线检测大肠杆菌的光密度, 可获取大肠杆菌的生长曲线(从迟缓期至稳定期)。该系统已用于检测大肠杆菌、酿酒酵母的 GFP 产量和酿酒酵母的 DNA 含量^[19, 20]。

3 展 望

流式细胞术已用于现代生物工程的许多领域, 因其可同时测定细胞的生理状态、生长行为和某些有用产物, 因此这项技术广泛用于优化和了解生物工艺过程的进程、快速测定及监控整个工艺过程。尤其是最近用流式细胞术结合其他现代化分析方法进行生物工艺过程的在线控制, 为人们优化生物工艺过程提供了新的可能性。

参考文献

- [1] Roth B L, Poot M, Ylle S T. Baterial viability and antibiotic susceptibility test with SYTOX Green nucleic acid stain. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 3: 2421~ 2431
- [2] Dri P, Presani G, Perticarani S, et al. Measurement of phagosomal pH of normal and CGD-like human neutrophils by dual fluorescence flow cytometry. *Cytometry*, 2002, 48(3): 159~ 166
- [3] Müller S, Loffhagen N, Bley T. Membrane potential related fluorescence intensity indicates bacterial injury. *Microbiol Res*, 1996, 151: 127~ 131
- [4] Ludovico P, Sansonetti F, Corte Real M. Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry. *Microbiology*, 2001, 147(Pt 12): 3335~ 3343
- [5] Plasier B, Lloyd D R, Paul G C. Automatic image analysis for quantification of apoptosis in animal cell culture by annexin-V affinity assay. *J Immunol Methods*, 1999, 229: 81~ 95
- [6] Hewitt C J, Nebe Vorr Caron. An industrial application of multiparameter flow cytometry: assessment of cell physiological state and its application to the study of microbial fermentations. *Cytometry*, 2001, 44(3): 179~ 187
- [7] Kaneko M, Inoue F, Oda T. Calcium associated resistance to H₂O₂ in Chinese Hamster V79 cells. *Toxicol Lett*, 2000, 115: 137~ 147
- [8] Grobe Uhlmann R, Bley T. A modular approach to situation indentification of the dynamics of bacterial populations synthesizing PHB. *Bioproc Eng*, 1999, 21: 191~ 200
- [9] Hemann C, Lösche A, Müller S, et al. Flow cytometric discrimination between *Acinetobacter calcoaceticus* 69 -V and *Alcaligenes eutrophus* JMP 134 by fluorescently labeled rRNA targeted oligonucleotides probes and DNA staining. *Acta Biotechnol*, 1997, 17: 19~ 38
- [10] Balajee S A, Marr K A. Conidial viability assay for rapid susceptibility testing of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(8): 2741~ 2745
- [11] Malacrino P, Zapparoli G, Torriani S, et al. Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. *J Microbiol Methods*, 2001, 45(2): 127~ 134
- [12] Srien F. Cytometric data as the basis for rigorous models of cell population dynamics. *J Biotechnol*, 1999, 78: 233~ 238
- [13] Porro D, Ranzi B M, Smeraldi C. A double flow cytometric tag allows tracking of dynamics of cell cycle progression of newborn *Saccharomyces cerevisiae* cells during balanced exponential growth. *Yeast*, 1995, 30: 1157~ 1169
- [14] Müller S, Hutter K J. Prozessoptimierung von Reinzucht und Anstellverfahren mittels Flusscytometrie in sächsischen Brauereien. *Monatsschr Brauwiss*, 1999, 3: 40~ 48
- [15] Kranpera M, Tavecchia L, Benedetti F. Intracellular Cytokine profile of cord blood T, and NK cells and monocytes. *Haematologica*, 2000, 85: 675~ 679
- [16] Patkar A, Vijayasankaran N, Urry D W, et al. Flow cytometry as a useful tool for process development: rapid evaluation of expression systems. *J Biotechnol*, 2002, 93(3): 217~ 229
- [17] De Wulf P, Brambilla L, Vanoni M, et al. Real time flow cytometric quantification of GFP expression and Gfp fluorescence generation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol Methods*, 2000, 42(1): 57~ 64
- [18] Natarajan A, Subramanian S, Srien F. Comparison of mutant forms of the green fluorescent protein as expression markers on Chinese hamster ovary (CHO) and *Saccharomyces cerevisiae* cells. *J Biotechnol*, 1998, 62: 29~ 45
- [19] Zhao R, Natarajan A, Srien F. A flow injection flow cytometry system for online monitoring of bioreactors. *Biotechnol Bioeng*, 1999, 62(5): 609~ 617
- [20] Abur Absi N R, Zamamiri A, Kacmar J, et al. Automated flow cytometry for acquisition of time dependent population data. *Cytometry*, 2003, 51A(2): 87~ 96

Flow Cytometry in Biotechnology

Xie Xiaomei¹ Xu Yang²

(1 Jiang Xi College of Traditional Chinese Medicine Nanchang 330006 2 Jiang Xi OAI Joint Research Institute Nanchang 330047)

Abstract Flow cytometry is a general method for rapidly analyzing large numbers of cells individually using light scattering, fluorescence and absorbance measurements. Flow cytometric assays have been developed to determine both cellular characteristics such as size, membrane potential, and intracellular pH, and the levels of cellular components such as DNA, protein, surface receptors, and calcium. Measurements that reveal the distribution of these parameters in cell populations are important for biotechnology, because they describe the population better than the average values obtained from traditional techniques. An overview of the principles of flow cytometry, with descriptions of methods used to measure various cellular parameters and examples of the application of flow cytometry in biotechnology is provided. Finally, a discussion of the challenges and limitations of the method is presented along with a future outlook.

Key words Flow cytometry

动 态

新型结核病疫苗研制成功 德国马普学会传染病生物化学研究所研制出一种新型结核病疫苗,能够有效增强机体免疫力并能有的放矢地消灭结核病菌。疫苗具有一种特殊的蛋白质分子,能够刺激产生 T 淋巴细胞,增强机体免疫系统功能,对吞噬细胞内的病菌进行有效攻击。疫苗的有效免疫期为 150 天,预计将在一年后进入临床试验。

日本开发出老年性痴呆治疗性疫苗 据《日本经济新闻》报道,老年性痴呆症(阿尔茨海默氏症)是贝塔淀粉样蛋白在脑细胞中沉淀,大脑发生萎缩引起的痴呆症。日本国立疗养所中部医院长寿医疗研究中心的原英夫等研究员利用基因工程技术开发出一种治疗老年性痴呆症的疫苗。研究人员给实验鼠服用了通过转基因技术产生的能合成贝塔淀粉样蛋白的病毒疫苗,结果发现实验鼠的肠粘膜生成了抗体,抗体转移到实验鼠的大脑后,能除去脑细胞中沉积的淀粉样蛋白,并防止淀粉样蛋白的堆积。动物实验显示,这种疫苗半年服一次,能持续预防和治疗老年性痴呆症。研究人员计划在年内用猴子进一步确认疫苗的效果,计划在 2004 年进行临床试验。

我国转基因植物研究发展迅速 由科技部和财政部联合启动的“转基因植物”专项课题设定目标为“加快我国转基因植物研究与产业化进程,提高我国在此领域的自主创新能力,形成具有国际竞争能力的转基因植物产业。”“专项”资助相关课题 116 个,这些课题共获得自主知识产权基因 26 个,其中目的基因 7 个,获得转基因作物品种 18 个,新品系 36 个,累计推广转基因作物 2800 多万亩,为农民带来直接经济效益 20 多亿元。申请国内发明专利 201 件,国外专利 9 件,发表论文 1024 篇,其中 SCI 论文 264 篇。目前我国已成为世界第四大转基因植物种植国家。

江北 供稿