

• 论 著 •

流式细胞仪性能评价方法的建立

王小林, 李 昂, 杨 硕

(北京大学第三医院检验科, 北京 100191)

摘 要:目的 建立流式细胞仪性能评价方法。方法 基于《YY/T0588-2005 流式细胞仪》行业标准, 利用 BriCyte E6 流式细胞仪, 建立适用于流式细胞仪性能评价的测试方案, 包括荧光灵敏度、荧光线性、前向角散射光检测灵敏度、仪器分辨率、前向角散射光和侧向角散射光分辨率、倍体分析线性、携带污染率、表面标志物检测准确性、表面标志物检测重复性、仪器稳定性等。结果 该流式细胞仪各项性能指标均满足行业标准规定的技术要求。结论 上述性能指标测试方法可靠, 能够对流式细胞仪性能进行全面评价。该方法对于流式细胞仪性能验证有一定的指导意义。

关键词:流式细胞仪; 性能评价; BriCyte E6

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.10.020

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)10-1366-03

Establishment of evaluation methods for the performance of flow cytometer

Wang Xiaolin, Li Ang, Yang Shuo

(Department of Laboratory Medicine, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China)

Abstract: Objective To Establish evaluation methods for the performance of flow cytometer. Methods Referring to the industry standard YY/T0588-2005 Flow Cytometry, evaluating methods for the performance of BriCyte E6 flow cytometry was established, such as fluorescence sensitivity, fluorescence linearity, forward scatter sensitivity, instrument resolution, forward scatter/side scattering resolution, DNA content linearity, carry-over rate, accuracy of the cell surface marker, reproducibility of the cell surface marker and instrument stability. Results The performance of BriCyte E6 met the requirements of industry standard. Conclusion The evaluation methods for the performance parameters could be reliable and could be used for the performance evaluation of flow cytometer.

Key words: flow cytometry; performance evaluation; BriCyte E6

流式细胞仪主要用于细胞生物学、免疫学等科学研究领域, 以及临床医学领域, 特别是在获得性免疫缺陷综合征(AIDS)和肿瘤患者淋巴细胞免疫功能评价、白血病免疫分型及微量残留病诊断方面, 具有不可替代的作用^[1-2]。本研究以《YY/T0588-2005 流式细胞仪》为依据, 建立了流式细胞仪性能评价方案, 旨在为流式细胞仪整体性能评价提供详细、完整的测试方案。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 迈瑞公司 BriCyte E6 流式细胞仪及配套 CD3-FITC/CD8-PE/CD45-PerCP/CD4-APC 四色试剂和溶血剂; Duke 公司 Duke Standards(3K1000)、Duke Standards(4K-03)标准微球; Spherotech 公司 Rainbow calibration particles(RCP-30-2)、Rainbow calibration particles(RCP-30-5A)标准微球; BD 公司 DNA QC Particles 标准微球; R&D 公司 Status-Flow® Flow Cytometry Control 质控品。

1.2 方法

1.2.1 荧光灵敏度 取适量 RCP-30-5A 标准微球, 用 1 mL 鞘液稀释混匀后上机检测, 获取各个峰的平均荧光强度。根据标准微球说明书提供的各个峰的等量可溶性荧光分子数(MESF), 按照随试剂附带的标准软件进行统计计算。技术要求: FITC 不大于 200 MESF, PE 不大于 100 MESF。

1.2.2 荧光线性 取适量 RCP-30-5A 标准微球, 用 1 mL 鞘液稀释混匀后上机检测, 得到各个峰的平均荧光强度。根据标准微球说明书提供的各个峰的 MESF, 以 MESF(Y) 和平均荧光强度(X)的线性回归方程, 计算线性相关系数(r)。技术要

求: $r \geq 0.98$ 。

1.2.3 前向角散射光(FSC)检测灵敏度 取 1 μm 3K1000 标准微球, 加入装有 1 mL 鞘液的试管中, 充分混匀后上机检测, 检查直方图上显示的峰值信号及显示峰值信号的标准微球直径。技术要求: FSC 检测灵敏度应不大于 1 μm 。

1.2.4 仪器分辨率 将 RCP-30-2 标准微球稀释于 1 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)中, 混匀后上机测试, 获取 FSC 和 FL1~6 各荧光通道的变异系数(CV)。技术要求: FSC 通道 $CV \leq 2.0\%$; FITC、PE 通道 $CV \leq 2.0\%$; PerCP、PE-Cy7、APC、APC-Cy7 通道 $CV \leq 4.0\%$ 。

1.2.5 FSC 和侧向角散射光(SSC)分辨率 (1)取 5 μL 枸橼酸钠抗凝外周血, 加入装有 1 mL 鞘液的试管中, 混匀后上机检测。技术要求: FSC/SSC 图应能将外周血中的血小板和红细胞分开。(2)取 100 μL 乙二胺四乙酸抗凝外周血, 溶血处理后上机检测。技术要求: FSC/SSC 图应能将外周血的白细胞三群(淋巴细胞、单核细胞、粒细胞)分开。

1.2.6 倍体分析线性 DNA QC Particles 中的小鸡红细胞核(CEN)或小牛胸腺细胞核(CTN)经过碘化丙啶(PI)染色后上机检测, 获取 G₂/M 期(四倍体细胞峰)与 G₀/G₁ 期(二倍体细胞峰)平均荧光强度, 计算二者比值。技术要求: 比值范围 1.95~2.05。

1.2.7 携带污染率 取适量 4K-03 标准微球, 用 1 mL 鞘液稀释混匀后连续上机测试 3 次, 计算标定区域的颗粒数, 分别记为 H₁₋₁、H₁₋₂、H₁₋₃。进行一次标本管返冲循环后, 再进行空白数量测试, 连续测试 3 次, 计算标定区域的颗粒数, 分别为

$L_{1\sim1}$ 、 $L_{1\sim2}$ 、 $L_{1\sim3}$ 。按照此程序循环 3 次,再计算携带污染率值(C_i),取最大值。

$$C_i = \frac{(L_{1\sim1} - L_{1\sim3})}{(H_{1\sim3} - L_{1\sim3})} \times 100\%$$

式中: C_i 为第 i 次循环的携带污染率, $i=1\sim3$ 。技术要求:携带污染率不大于 1%。

1.2.8 表面标志物检测的准确性 使用 CD3-FITC/CD8-PE/CD45-PerCP/CD4-APC 四色试剂对 StatusFlow® Flow Cytometry Control 质控品进行 CD3、CD4、CD8 标记,重复 5 次,测定 CD3、CD4、CD8 阳性百分比,分别计算平均值。技术要求:结果应在质控品说明书给定的参考范围内。

1.2.9 表面标志物检测的重复性 使用 CD3-FITC/CD8-PE/CD45-PerCP/CD4-APC 四色试剂对 StatusFlow® Flow Cytometry Control 质控品进行 CD3、CD4、CD8 标记,重复测定 20 次,分别计算 CD3、CD4 和 CD8 阳性百分比结果的 CV。技术要求: $CV \leq 10\%$ 。

1.2.10 仪器稳定性 环境温度变化不超过设定温度的 5% 时,取适量 RCP-30-2 加入装有 1 mL PBS 的试管中,充分混匀后上机检测,得到标准微球平均荧光强度(FL_1)。连续开机 8 h 后,在流式细胞仪的相同设置条件下重复前述步骤,得到标准微球的平均荧光强度(FL_2)。按公式计算 FL_1 、 FL_2 偏差值(B)。

$$B = \frac{(FL_1 - FL_2)}{FL_2} \times 100\%$$

技术要求:在 8 h 内检测 FSC 及所有荧光通道峰值平均荧光强度偏差值不超过 $\pm 10\%$ 。

2 结 果

2.1 荧光灵敏度和荧光线性 FITC 通道荧光灵敏度为 48 MESF, PE 通道荧光灵敏度为 50 MESF, 二者的 r 分别为 0.997 8、0.997 2, 满足规定的技术要求。

2.2 FSC 检测灵敏度 FSC 检测灵敏度检测结果见图 1, 直方图上显示直径为 1 μm 微球的信号峰, 满足规定的技术要求。

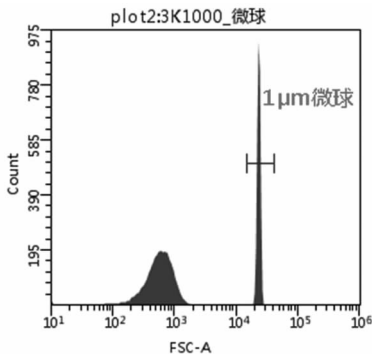


图 1 FSC 检测 1 μm 标准微球结果

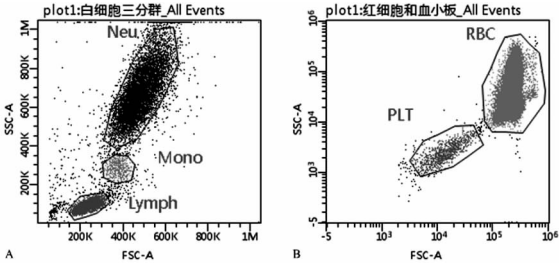
2.3 分辨率 FSC 及各荧光通道($FL_{1\sim6}$)的 CV 分别为 1.2%、1.0%、1.5%、2.0%、2.6%、3.2%、2.4%, 均满足规定的技术要求。

2.4 FSC 和 SSC 分辨率 FSC 和 SSC 散点图可将淋巴细胞、单核细胞、粒细胞分开, 也能将血小板和红细胞分开, 满足规定的技术要求, 见图 2。

2.5 倍体分析线性 G_2/M 期和 G_0/G_1 期平均荧光强度分别为 527 383.1、266 246.7, 比值为 1.98, 满足规定的技术要求。

2.6 携带污染率 3 次检测的携带污染率分别为 0.02%、0.04%、0.03%, 满足规定的技术要求。

2.7 表面标志物检测准确性 质控品 CD3、CD4、CD8 阳性百分比的平均值均在说明书给定的参考范围内, 满足规定的技术要求, 见表 1。



Neu、Mono、Lymph、RBC、PLT 分别表示中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞、红细胞、血小板。

图 2 FSC 和 SSC 分辨率检测结果

表 1 表面标志物 CD3、CD4、CD8 阳性百分比及参考范围(%)

表面标志物	平均值	参考范围
CD3	73.01	64.3~84.3
CD4	47.75	42.4~55.4
CD8	22.26	17.1~31.1

2.8 表面标志物检测的重复性 质控品 CD3、CD4、CD8 阳性百分比结果的 CV 分别为 0.83%、1.31%、2.40%, 满足规定的技术要求。

2.9 仪器稳定性 0 h 和 8 h 检测了 FSC 及 $FL_{1\sim6}$ 荧光通道平均荧光强度, 偏差值均满足规定的技术要求, 见表 2。

表 2 FSC 和各荧光通道 0、8 h 荧光峰值及偏差值

通道	FL_1	FL_2	B(%)
FSC	495 524.5	492 700.8	-0.57
FL_1	501 430.5	496 944.2	-0.89
FL_2	499 678.7	486 376.9	-2.66
FL_3	500 452.8	473 755.4	-5.33
FL_4	506 854.7	486 773.9	-3.96
FL_5	481 059.0	468 061.3	-2.70
FL_6	496 353.7	487 408.4	-1.80

3 讨 论

关于流式细胞仪性能的评价, 国际上还没有公认的方法和标准。对于科研领域而言, 一般通过考察重复性和荧光灵敏度等指标, 即可对仪器性能做出初步评价^[1,3-5], 但对于医学领域来说, 仅仅考察重复性和荧光灵敏度是不够的。流式细胞仪输出的检测结果会被用于疾病诊治、预后判断等。因此, 除了重复性和荧光灵敏度外, 更关注于可能影响检测结果准确性的性能指标。为此, 国家食品药品监督管理局在 2005 年发布了医药行业标准《YY/T0588-2005 流式细胞仪》, 对流式细胞仪的评价项目不仅涵盖了重复性、荧光灵敏度等基本性能, 而且增加了表面标志物准确性、表面标志物重复性、携带污染率等临床医生更为关注的性能指标, 并对各项性能指标的技术要求等做了明确的定义^[3]。

尽管《YY/T0588-2005 流式细胞仪》已经发布多年, 但该标准对于仪器分辨率的具体计算方法、对各(下转第 1369 页)

表 1 患者 EPS 中白细胞与精液主要参数的关系 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	密度($\times 10^6/\text{mL}$)	活率(%)	(a+b)级活力(%)	液化时间(min)	pH 值
A 组	189	38.9 \pm 9.7	39.2 \pm 19.1	39.2 \pm 19.1	48.3 \pm 10.9	6.5 \pm 0.7
B 组	94	54.5 \pm 13.1	52.1 \pm 24.6	41.5 \pm 13.5	29.8 \pm 7.8	7.0 \pm 0.5
<i>P</i>	—	<0.05	<0.01	<0.05	<0.05	>0.05

—:无数据。

3 讨 论

EPS 是前列腺分泌的一种乳白色液体,含有多种蛋白和非蛋白成分,蛋白成分主要包括前列腺特异度抗原、前列腺酸性磷酸酶、乳酸脱氢酶,蛋白水解酶和纤维蛋白酶等,其中蛋白水解酶和纤维蛋白酶作为液化因子有促进精液液化的作用。非蛋白成分主要包括锌、柠檬酸和脂类,而脂类中大部分为卵磷脂。临床上与 EPS 检查密切相关的成分是卵磷脂小体和白细胞^[3]。正常的 EPS 涂片镜检可见大量的黄白色折光的卵磷脂小体均匀布满视野,而白细胞很少,一般都低于每高倍视野下 10 个,且呈散在分布。当前列腺受到病原体感染或一些非感染性因素刺激时,可以引起血液中的大量白细胞渗出并在前列腺内堆积,从而造成 EPS 检查的异常,临床以慢性前列腺炎较为多见^[4]。

研究表明慢性前列腺炎与男性不育呈密切相关,能够导致不育,但具体机制还不完全明确^[1,5]。随着临床及实验技术的不断结合,慢性前列腺炎与精子质量之间的关系也将逐步得到阐述^[6]。由于生殖道其附属性腺出现感染,特别是精囊炎及前列腺炎等,系精液中白细胞最重要的来源,而大量的白细胞于附睾及前列腺的上皮浸润,从而导致附属性腺的功能障碍,使患者精液中 EPS 活化酶活性下降,与精囊分泌液体中一种叫做凝固因子的物质失衡,导致液化时间延迟。精液液化异常又会影响精液的黏度,精液黏度一旦增高,会直接影响精子活力^[3]。EPS 作为精液的重要组成部分,占精浆的 20%~30%,其作用主要是供给精子营养成分。一旦发生炎症,EPS 中就会出现大量细菌,可消耗精浆中的营养成分并产生细菌毒素,从而影响精子的存活率。

本研究结果显示,白细胞数量与卵磷脂小体数量及红细胞数量均无相关性,而陈国宏等^[7]的研究结果表明,白细胞数量与卵磷脂小体数量呈负相关,与本研究结果之所以不一致,主要原因可能是样本选取具有一定的差异性,有待进一步验证。更具具有重要意义的是,A 组 EPS 中白细胞数量高于 10 个/HP,B 组白细胞数量低于 10 个/HP,两组相比,A 组患者精液中精子密度、活动率与(a+b)级活力均明显低于 B 组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),提示 EPS 中白细胞数量越高,精液主要参数越低,

此结果与贾胜荣^[8]的报道一致。另外,本研究还对两组患者的抗精子抗体、白细胞酯酶等其他检测指标也进行了分析,结果更加明确了白细胞数量与精液质量的负相关性。

综上所述,不育患者 EPS 显微镜检查项目中的白细胞数量能够明显影响精液的质量,同时慢性前列腺炎也可能引发男性不育。临床检查发现 EPS 中白细胞数量增多,以及明确出现生殖道感染时,须给予患者积极的抗感染治疗,以提高其精液质量。

参考文献

[1] Punab M, Kullisaar T, Mandar R. Male infertility workup needs additional testing of expressed prostatic secretion and/or post-massage urine[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82776.

[2] Hamamah S, Seguin F, Bujan L, et al. Quantification by magnetic resonance spectroscopy of metabolites in seminal plasma able to differentiate different forms of azoospermia[J]. Hum Reprod, 1998, 13(1): 132-135.

[3] Paz GF, Sofer A, Homonnai ZT, et al. Human semen analysis: seminal plasma and prostatic fluid compositions and their interrelations with sperm quality[J]. Int J Fertil, 1977, 22(3): 140-147.

[4] 段梅. 慢性前列腺炎患者前列腺液白细胞计数与症状严重度相关性分析[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2009, 11(12): 1880-1881.

[5] Huaijin C, Junyan Z, Naiguan C. Prostatic fluid and sperm examination: 106 cases. Preliminary study on infertility[J]. Acta Urol Belg, 1998, 66(1): 19-21.

[6] Alshahrani S, McGill J, Agarwal A. Prostatitis and male infertility[J]. J Reprod Immunol, 2013, 100(1): 30-36.

[7] 陈国宏, 李兰群, 王传航, 等. 慢性前列腺炎症状评分与前列腺液白细胞及卵磷脂小体数量相关性分析[J]. 中国性科学, 2009, 18(2): 17-18.

[8] 贾胜荣. 前列腺液白细胞数检测对男性不育的诊断意义[J]. 现代诊断与治疗, 2012, 23(4): 359.

(收稿日期:2015-01-12)

(上接第 1367 页)

荧光通道分辨率的技术要求,以及各项评价指标的具体操作步骤描述得不够详尽,使得该标准在医学领域中未能得到广泛应用。为此,本次评价对分辨率的具体计算方法和对各通道分辨率的技术要求做了细化,对评价的具体操作过程也做了说明,为医学实验室评价流式细胞仪的性能提供了一套详尽的参考方法。

参考文献

[1] Sack U, Tarnok A. Cellular diagnostics: Basic principles, methods and clinical applications of flow cytometry[M]. Basel: Karger,

2009.

[2] 刘艳荣. 实用流式细胞术-血液病篇[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2010.

[3] 国家食品药品监督管理局. YY/T0588-2005 流式细胞仪[S]. 北京: 国家食品药品监督管理局, 2005.

[4] Hoffman R. Standardization, calibration, and control in flow cytometry[M]. NJ, USA: John Wiley & Sons, 2012.

[5] Shapiro HM. Practical flow cytometry[M]. 4th ed. NJ, USA: John Wiley & Sons, 2003.

(收稿日期:2015-01-07)