

## 流式细胞仪进样速度对细胞计数的影响

董馨忆, 柏春玲

(昆明医科大学科研实验中心, 云南 昆明 660500)

[关键词] 全血细胞计数; CyFlow Space 流式细胞仪; 进样速度

[中图分类号] Q-337 [文献标识码] A [文章编号] 2095-610X (2013) 12-0132-03

流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 是利用流式细胞仪, 用高灵敏度检测器记录下散射光及各种荧光信号, 对液流中的细胞或其他微粒进行快速测量的新型分析和分选技术<sup>[1]</sup>。流式细胞术主要包括了样品的液流技术、细胞的分选和计数技术, 以及数据的采集和分析技术等<sup>[2,3]</sup>。其中, 分析细胞的浓度或细胞亚群浓度统称为计数, 对于临床诊断、细胞培养、生物工程学研究等都有很重要意义。目前, 昆明医科大学科研实验中心新进一台 CyFlow Space 流式细胞仪, 为了能够在将来的实验中取得较好的科研数据, 笔者针对细胞计数这个方面对该台仪器进行了一些测试。

### 1 材料与方法

#### 1.1 标本的采集

在严格执行实验室质控下, 按照实验室操作标准及规范, 采集健康人外周静脉血 5 mL 用肝素抗凝后, 送实验室检测。

#### 1.2 标本上机前准备

室温下, 充分摇匀后取出 40  $\mu$ L, 用 PBS 稀释 1 000 倍后, 分装于 3.5 mL 专用样品管内, 每管 1 mL, 避光保存。为了减小误差, 每种进样速度重复 3 次。

#### 1.3 检测方法

采用德国 partec 公司生产的 CyFlow Space 流式细胞仪, 摇动样本使细胞颗粒呈悬浮状, 但避免产生气泡, 上样。用 SSC 和 FSC 两个参数为横坐标和纵坐标, 调节电压参数, 找到大部分细胞群后, 修改 speed 为 1、2、3、5、7、9, 记录计数结果。

#### 1.4 统计学处理

数据采用 SPSS 软件进行统计学处理, 采用方差分析。

### 2 结果

各速度流式细胞仪检测见图 1。数据结果见表 1。参照表 1 使用方差分析,  $P=0.065$ , 各组总体方差齐性 ( $P>0.05$  方差齐性);  $F=225.425$ ,  $P<0.01$ 。在  $\alpha=0.05$  水准上, 拒绝  $H_0$ , 接受  $H_1$ , 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 在验后概率和齐性子集两结果中, 六组速度总数有不同, 两两比较有差异并且都存在统计学意义 ( $P<0.05$ )。说明不同进样速度对全血细胞计数结果影响不同。

为了避免误差, 同时也为了检测新仪器的检测重复稳定率, 对该实验每种速度同时重复测量 3 次, 计算均值和标准差, 得到的结果如表 2, 根据表 2 的数据得到一个分析图 (图 2), 如图 2 所示标准差的值小, 在图上的表现就是上下的线短, 说明数据比较集中, 误差小, 仪器的检查重复稳定率高。

### 3 讨论

流式细胞仪是目前世界不同学科的最新研究成果和结晶<sup>[4]</sup>。它可分析到细胞悬液中的所有细胞, 并能同时精确监控样本流体积, 完成体积计数。从以上数据表明, 全血细胞计数不能单纯使用光源前向角 (FSC) 和侧向角测量 (SSC) 两参数进行计数, 在全血细胞没有荧光标记的情况下计数, 所得到的结果是有偏差的。

[作者简介] 董馨忆 (1984~), 女, 云南普洱市人, 医学学士, 助理实验师, 主要从事实验室及大型仪器管理工作。

[通讯作者] 柏春玲. E-mail: chunling1024@163.com

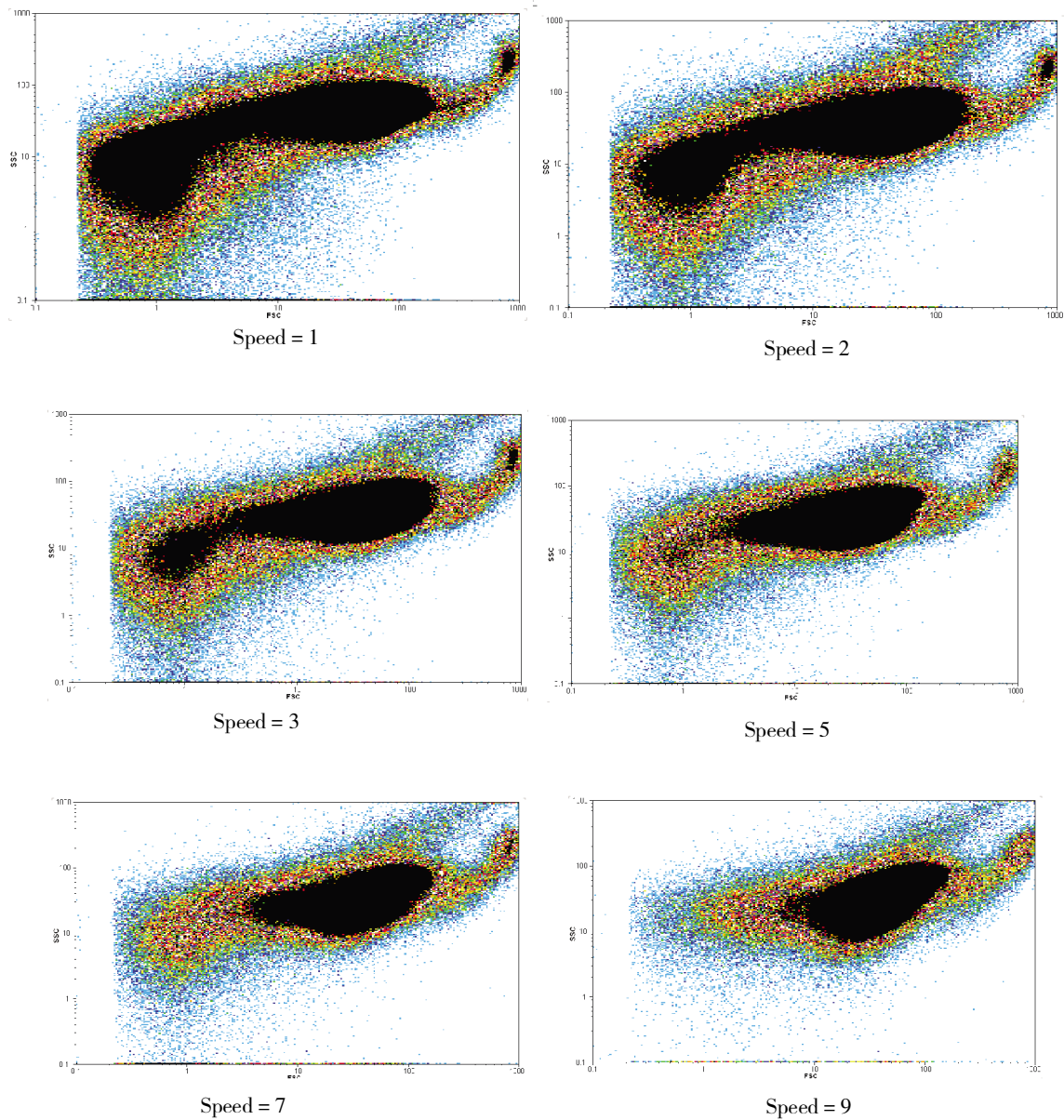


图 1 各速度流式细胞仪检测图

表 1 6 组测样速度的全血细胞计数各重复测量三次的结果 (个/mL)

进样速度	结 果		
Speed=1	5 015 540**	5 284 620**	4 871 985**
Speed=2	4 112 930**	4 020 580**	3 844 995**
Speed=3	3 385 845**	3 546 470**	3 342 890**
Speed=4	2 517 480**	2 117 205**	2 511 460**
Speed=5	2 149 665**	2 116 175**	2 077 880**
Speed=6	1 666 420**	1 739 925**	1 613 760**

组间比较, \*\* $P < 0.01$ .

表 2 6 组进样速度的全血细胞计数各重复测量 3 次的均值和标准差  $[(\bar{x} \pm s), \text{个}/\text{mL}]$ 

进样速度	均值 $\pm$ 标准差
Speed=1	5 057 381.667 $\pm$ 171 035.970 1
Speed=2	3 992 835 $\pm$ 111 129.443 5
Speed=3	3 425 068.333 $\pm$ 87 616.803 98
Speed=4	2 382 048.333 $\pm$ 187 288.642 7
Speed=5	2 114 573.333 $\pm$ 29 327.979 34
Speed=6	1 673 368.333 $\pm$ 51 740.450 38

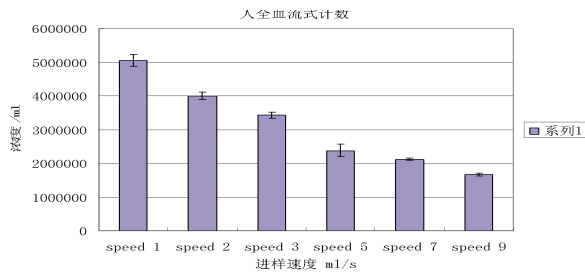


图 2 6 组速度各重复测量 3 次的标准差

流式细胞仪进行分析时,除荧光外,还同时测量每个细胞的物理光强度,散射光在光源前向角和侧向角测量<sup>[5]</sup>,散射光强度代表细胞的大小和形态.没有进行染色的全血细胞内容丰富,不同大小和各类型的细胞,包括杂质都会存在,而由于 CyFlow Space 流式细胞仪灵敏度很高,能测到的光信号和强度范围十分广,不同大小和类型的细胞产生的信号也不相同,再加上不同的进样速度有不同的推进压力,这就对计数的结果产生了很大影响.同时,通过实验,笔者也得出 CyFlow Space 流式细胞仪误差小,仪器的检查重复稳定率高的结果.

综上所述,笔者认为若将全血细胞染色处理后,有相应的荧光标记和大致一样的荧光强度后,应该能够提高结果的检测准确率.由于实验所用的方法属于探索性质,可能导致个别实验数据出现一定偏差,将进一步对研究结果进行验证和改进技术方法.

## [参考文献]

- [1] 李靖,李成斌,顿文涛,等.流式细胞术(FCM)在生物学研究中的应用[J].中国农学通报,2008,6(24):107-111.
- [2] 宋平根,李素文.流式细胞术的原理和应用[M].北京:北京师范大学出版社,1992:1-88.
- [3] 谢小梅,许杨.流式细胞术.中国生物工程杂志[J].2003,23(9):100-104.
- [4] 王淑静,毕建杰,郝建民.流式细胞仪在动物疫病检测中的应用[J].实验科学与技术,2012,10(1):34-36.
- [5] 魏熙胤,牛瑞芳.流式细胞仪的发展历史及其原理和应用进展[J].现代仪器,2006,12(4):8-11.

(2013-10-14 收稿)