

荧光流式细胞仪的标准化研究进展

吕英楷, 刘文丽, 胡志雄*

中国计量科学研究院医学计量中心, 北京 100029

摘要 目前,关于荧光流式细胞仪的计量和溯源方面的资料相对有限。为了研究基于荧光检测的流式细胞仪的技术发展并加快其标准化进程,对国内外文献资料进行整合,并总结了荧光流式细胞仪的类别、应用、相关标准化研究进展和关键参数的详细信息,主要包括仪器分辨率、散射光和荧光灵敏度、荧光线性相关系数、检出限、准确性、可重复性和稳定性等。国内外对广泛使用的几种评价荧光流式细胞仪性能的计量方法具有基本一致的标准。各个研究组织与应用领域对于流式细胞仪的性能具有不同的需求,一套完整可溯源的表征流式细胞术的计量标准及其评价方法能够方便实验室之间进行可重复和可比较的研究交流与讨论。

关键词 荧光检测; 流式细胞仪; 标准化; 计量; 溯源

中图分类号 TH773

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP220662

Progress in Standardization of Fluorescence Flow Cytometer

Lü Yingkai, Liu Wenli, Hu Zhixiong*

Center for Medical Metrology, National Institute of Metrology, Beijing 100029, China

Abstract Currently, resources to improve the metrology and traceability of fluorescence flow cytometer are relatively limited. To study the technical development of flow cytometer based on fluorescence detection and accelerate progress toward standardization, this paper integrates domestic and foreign literatures. Furthermore, detailed information regarding types of fluorescence flow cytometers, their applications, standardization research progresses, and critical parameters including instrument resolution, scattered light and fluorescence sensitivity, fluorescence linear correlation coefficient, detection limit, accuracy, repeatability, and stability are summarized. Foreign and domestic conventional standards are available for several widely used metrology methods to evaluate fluorescence flow cytometer performance. Various research organizations and application areas have different requirements for flow cytometer performance. A complete and traceable set of metrology standards for characterizing flow cytometry, and corresponding evaluation methods enable reproducible and comparable research communications and discussions between laboratories.

Key words fluorescence detection; flow cytometer; standardization; metrology; traceability

1 引 言

流式细胞术是一种强大的分析工具,可应用于免疫学、分子生物学、细菌学、病毒学、癌症生物学和传染病监测方面^[1-6]。在过去的 30 年里,它的发展取得了巨大的进步,为免疫系统和其他细胞生物学领域的研究提供了前所未有的信息。流式细胞术用于分析单个细胞,以了解它们拥有或产生的蛋白质、核酸和其他生物分子;并用于分析细胞群(或亚群),以区分不同的细胞类型和谱系。流式细胞术还被生物制药厂商广泛用于

研究由活细胞制成或由活细胞组成的疗法(细胞治疗)^[7-9]。细胞和基因疗法以及其他再生医学产品的进步不断提高了对用于细胞表征的高质量、稳健且经过验证的测量的需求。荧光流式细胞术,包括成像流式细胞术^[10-12],已经成为一个重要的平台,因为它能够快速并同时分析异质细胞群和亚细胞分析物,例如免疫细胞亚群(中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞)^[13]。此外,多参数流式细胞仪可用于疫苗研发^[14]、药物和癌症研究^[1]、临床诊断和免疫治疗^[15]。

然而,在来自不同仪器平台、地点和时间的计量结

收稿日期: 2022-01-28; 修回日期: 2022-03-08; 录用日期: 2022-03-17; 网络首发日期: 2022-03-27

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFC2401400)

通信作者: *huzhixiong@nim.ac.cn

果的可信度和可比性方面仍然存在挑战^[16],影响了在研究过程和临床环境中基于流式细胞术数据的关键决策。计量结果之间的差异会给诊断和治疗决策带来不确定性,阻碍基础科学的进步。美国国家标准与技术研究院流式细胞仪标准联盟(NIST Flow Cytometry Standards Consortium)和美国国立卫生研究院(NIH)汇集了包括医学界、工业界、学术界和政府的利益相关者,以实现以下目标^[17]:1)制定可溯源的参考标准,包括参考材料、参考数据、参考方法和测量服务,用于为校准微球分配等效数量的参考荧光团(ERF)并评估相关的不确定性和效用;2)制定候选参考标准,包括生物参考材料、参考数据、参考方法;3)根据候选参考材料设计实验室间研究,以支持最佳实践方法和标准方法的开发。

到目前为止,商用的流式细胞仪主要测量激光束经分析细胞的散射光(前向和侧向)和大于 30 种荧光通道^[18]。基于荧光检测原理的流式细胞仪可以为疾病检测等产生大量实验数据,以供医生和研究人员参考和分析。本文首先总结了过去 30 年荧光流式细胞仪的技术发展,包括基本原理、分类和主要应用,并且强调了其标准化计量方法的需求。基于对国际标准和国内标准研究现状的整合,给出了可用于评估流式细胞仪性能的计量学参量的详细介绍和仍然存在的

问题和挑战。通过对荧光流式细胞仪标准化研究的分析与讨论,给出了未来研究与医学工作者应考虑的方向,从而使流式细胞术更好地为人类健康服务。

2 荧光流式细胞仪的技术发展

流式细胞术(flow cytometry)可以快速定量地检测来自异质群体中数千到数百万个细胞在液流中通过光束流动时的物理特征。这项技术能够在短时间内处理大量样本,产生大量可应用于临床诊断的实验数据。流式细胞检测技术已经在临床中被广泛使用,并且随着可检测标志物数量的增加而不断发展。

2.1 荧光流式细胞仪的基本原理

传统的流式细胞仪由 3 部分组成,如图 1 所示。首先,流体系统(Fluidic System)采用流体动力学聚焦方法利用鞘液(通常是缓冲盐水溶液)通过加压将样品输送并聚焦到激光探测点,在激光聚焦点处分析样品;其次,光学系统(Optical System)由激发光学器件(一个或多个激光器)和收集光学器件[光电倍增管(PMT)或光电二极管(PD)]组成,激光光源作用于细胞样品,从而激发出特定荧光信号;最后,电子系统(Electronic System)将来自光探测器的光电信号转换为可由计算机读取的数字信号。

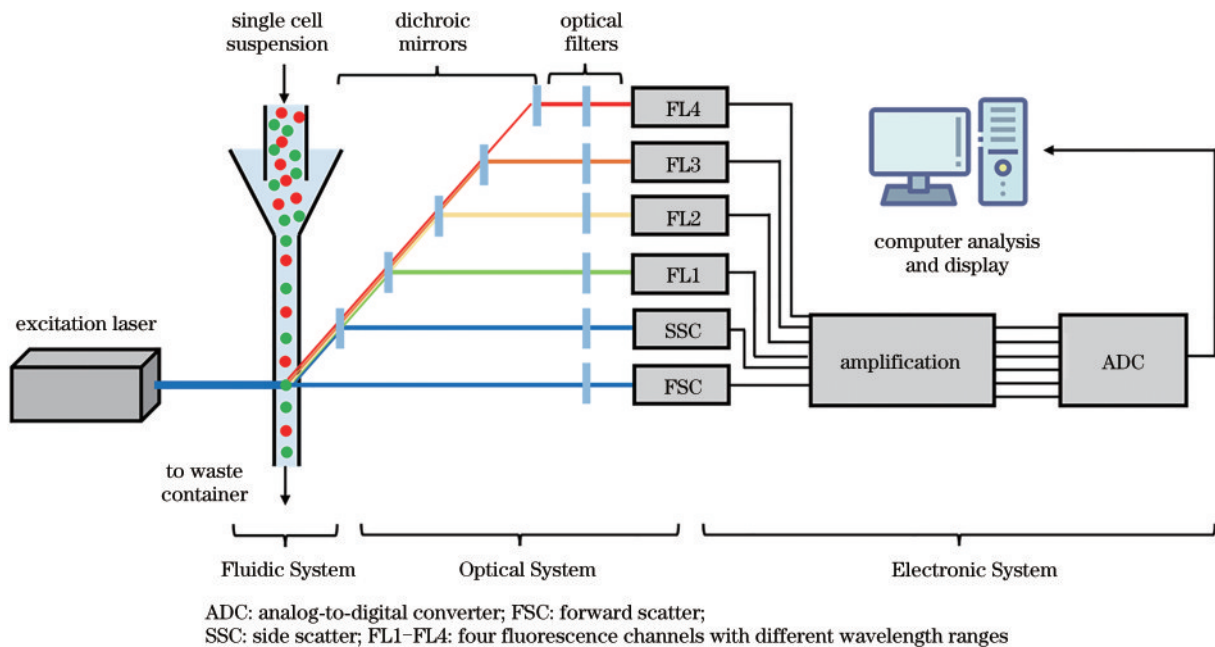


图 1 流式细胞仪结构示意图

Fig. 1 Schematic of flow cytometer

2.1.1 流体系统

流式细胞仪的流体系统控制细胞依次穿过激光束。这种流体动力学聚焦特性是 Reynolds 在 1883 年描述的同轴层流体力学原理。为了确保流体动力学聚焦的良好质量,流体系统必须非常稳定。样品悬浮液首先被加压,然后在通过喷嘴之前注入鞘液中。细胞悬浮液的速度取决于鞘液压力,该压力对于分析仪是固定的。因此,

样品压力越高,越多的细胞则有机会在流体中横向移动,这会导致流体动力学聚焦的精度降低,从而导致样品分析质量下降。流通池可以说是系统的核心,因为它是激光束和细胞相互作用的地方。这里用光学收集系统检测散射光(前向散射和侧向散射)和荧光信号。

2.1.2 光学系统

激发光源进入细胞内部环境后会发生散射(前向

散射和侧向散射)并激发出荧光。首先,当细胞通过激发光源时,激光束与细胞内物质(细胞核和细胞器等)相互作用,会产生不同方向的散射光。小角度的前向散射光(FSC)在激光束轴向上被光电二极管或光电倍增管收集,其强度与细胞的相对大小有关。大角度的侧向散射光(SSC)和荧光发射光在与激光束呈 90° 的地方被分别收集。此外,侧向散射光和荧光由多个二向色镜(dichroic mirror)和滤光片(optical filter)引导至特定的检测器,带通滤光片确定读取的光波长,以便检测和测量每个单独通道的荧光信号^[19]。值得注意的是,二向色镜(短通或长通)是使波长较短或较长的光通过并以一定角度反射剩余光的滤光片。例如:450二向色长通滤光片(DLP)允许波长超过450 nm的光通过,并以一定角度反射较短波长的光,然后将其发送到另一个检测器;带通滤光片用来在小窗口范围内检测特定波长的光,450/50带通滤光片(BP)使波长为 $450\text{ nm} \pm 25\text{ nm}$ 范围内的荧光通过滤光片并由检测器读取。

多激光系统通常在具有20个参数的仪器(FSC、SSC和18个荧光检测器)中很常见。有的仪器平台引入了5个或更多激光器来测量30~50个参数,但这些不太常见。传统流式细胞仪最常用的激光波段有405 nm(紫色)、488 nm(蓝色)、532 nm(绿色)、552 nm(绿色)、561 nm(绿黄色)、640 nm(红色)和355 nm(紫外线)。额外的激光波长可用于特殊的实验需求。此外,还有一些仪器用雪崩光电二极管(APD)代替PMT用于荧光检测,目的是提高灵敏度。

2.1.3 电子系统

检测器(光电二极管和光电倍增管)将来自细胞的光信号(光子)转换为脉冲电信号并进行放大。该脉冲随后被数字化(ADC)、记录并由特定软件处理。光电二极管一般用于高强度信号,而光电倍增管更适用于低强度信号。低强度信号需要通过倍增电极在光电倍增管中连续放大。

2.2 荧光流式细胞仪的分类

传统的流式细胞仪利用鞘液将样品聚焦在探测点,样品与激光产生相互作用,从而测量前向散射光、侧向散射光和荧光。在此基础上,对传统的流式细胞仪进行不同程度的改进,则可以满足特定的测量需求,例如基于声聚焦的流式细胞仪、细胞分选仪、成像流式细胞仪等。

2.2.1 基于声聚焦的流式细胞仪

声聚焦流式细胞仪利用超声波的能量将细胞聚焦在流体中心从而进行光检测^[20]。与传统的流式细胞仪相比,这种方式不需要鞘液,从而减少消耗品的使用和浪费,并同时大大提高了仪器的便携性^[21-23]。此外,声聚焦方法对开发廉价的小型化流式细胞仪,对从资源贫乏地区的疾病诊断到分布式传感器网络的应用都很重要,例如发展中国家的艾滋病监测和进展分析^[24-25]。

值得注意的是,声聚焦技术可以突破传统流式细胞仪对细胞尺寸大小探测的极限($<70\ \mu\text{m}$)。Piyasena等^[26]开发了多节点声学聚焦流动池,如图2所示,可以将粒子(小至红细胞,大至直径为 $107\ \mu\text{m}$ 的细胞)定位到多达37个平行液流中。这种方法将对稀有细胞检测的应用(例如循环肿瘤细胞)、大颗粒分析的应用和高通量流式细胞仪的应用产生重大影响。

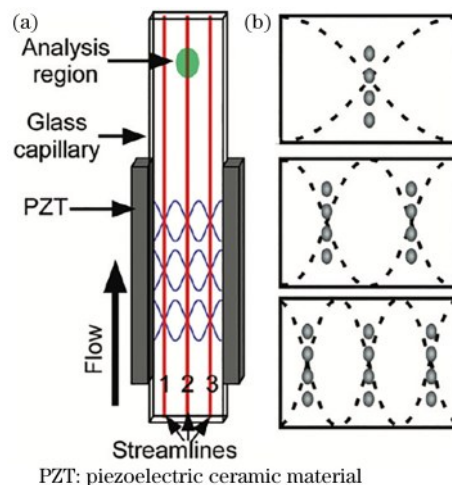


图2 玻璃器件中的多节点声聚焦^[26]。(a)用矩形玻璃毛细管制成的声学流通池示意图;(b)固定宽度毛细管的前三个压力节点的位置(上为半波长,中为一个波长,下为一个半波长)

Fig. 2 Multinode acoustic focusing in glass devices^[26].

(a) Schematic of acoustic flow cell made with a rectangular glass capillary; (b) location of first three pressure nodes of a fixed width capillary (top with width of $\lambda/2$, center with width of λ , bottom with width of $3\lambda/2$)

2.2.2 细胞分选仪

基于荧光标记的细胞分选仪根据荧光探针或染色剂来识别细胞类型。在传统的荧光激活细胞分选仪(FACS)中,如图3所示,带有荧光标记的细胞在层流中排列以穿过聚焦的激光束,并被照射几微秒。在此期间,细胞会发出荧光,检测系统根据接收到的荧光波长识别每个被标记的细胞,然后细胞被封装在带电的气溶胶液滴中并被静电分选^[27]。

为了避免气溶胶液滴的形成,许多研究小组使用荧光标记物来识别微流体环境中的细胞,并通过各种机制将它们分离,包括电动机制(例如电泳、介电泳和电渗流)^[28-30]、声泳机制(使用体声驻波、声表面驻波或行波)^[31-33]、光学操作^[34-36]、机械系统^[37-39]。

与传统的荧光流式细胞仪类似,微流体技术通常会执行以下操作:细胞与激光束的相互作用、实时识别、快速命令驱动的分选。这些优势使基于荧光标记的方法成为细胞分选中最常见和最成熟的技术,是微流体芯片细胞分选设备的可行选择。

2.2.3 成像流式细胞仪

成像流式细胞术(IFC)是一种同时结合了显微镜

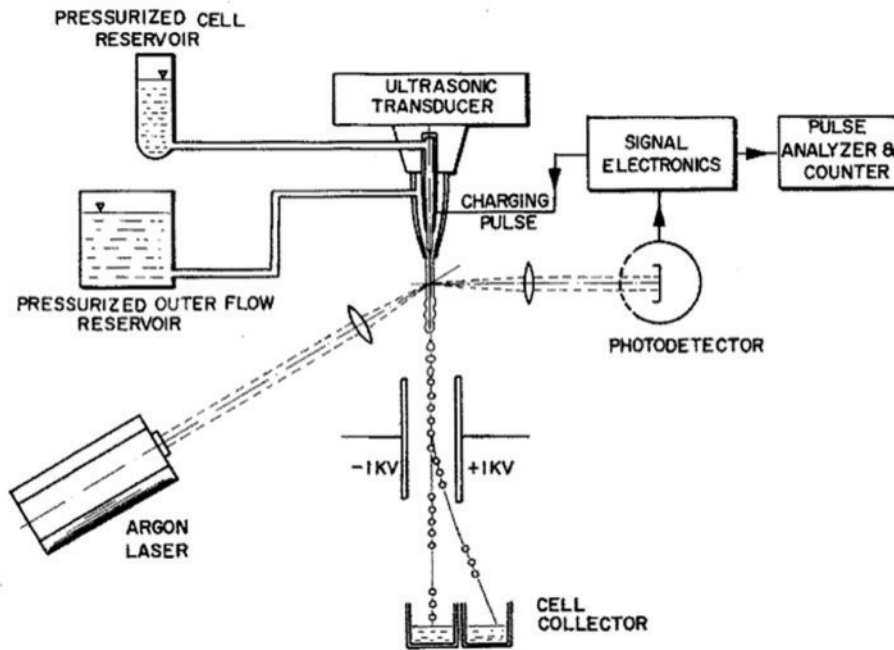


图 3 荧光激活细胞分选仪示意图^[27]

Fig. 3 Schematic of fluorescence-activated cell sorter^[27]

成像和流式细胞术优势的混合技术,用于对流动环境中的细胞进行高通量成像^[40]。当每个细胞流过激发光源和检测器(例如 CCD)时,系统会捕获每个细胞的图像数据来进行分析。这种方法极大地增强了收集到的信息内容(包括细胞大小、形态及细胞内生化信号等),但同时也伴随着一些技术挑战,包括需要获取高速移动的单细胞的高分辨率(无模糊)图像、集成多种成像模式(如荧光^[41-42]、拉曼^[43-44]、明场和暗场成像^[45])、在短曝光时间内要实现较高的检测灵敏度等。

最近的研究表明,IFC 可以对单细胞、多细胞簇和小聚集体中的分子[肽、蛋白质、蛋白质复合物、核酸(DNA、RNA、miRNA)、糖脂、分子组合等]进行定位和定量,并将它们的空间分布映射到细胞隔间^[11],最后用深度学习等方法进行高通量数据分析,如图 4 所示^[46]。其中单细胞测量能够揭示隐藏在群体平均值中的信息。例如,使用荧光分子作为标记物,IFC 可以分析宿主-病原体的相互作用,量化细胞内寄生虫,并具有提供对宿主-蛋白质相互作用的高通量分析和对寄

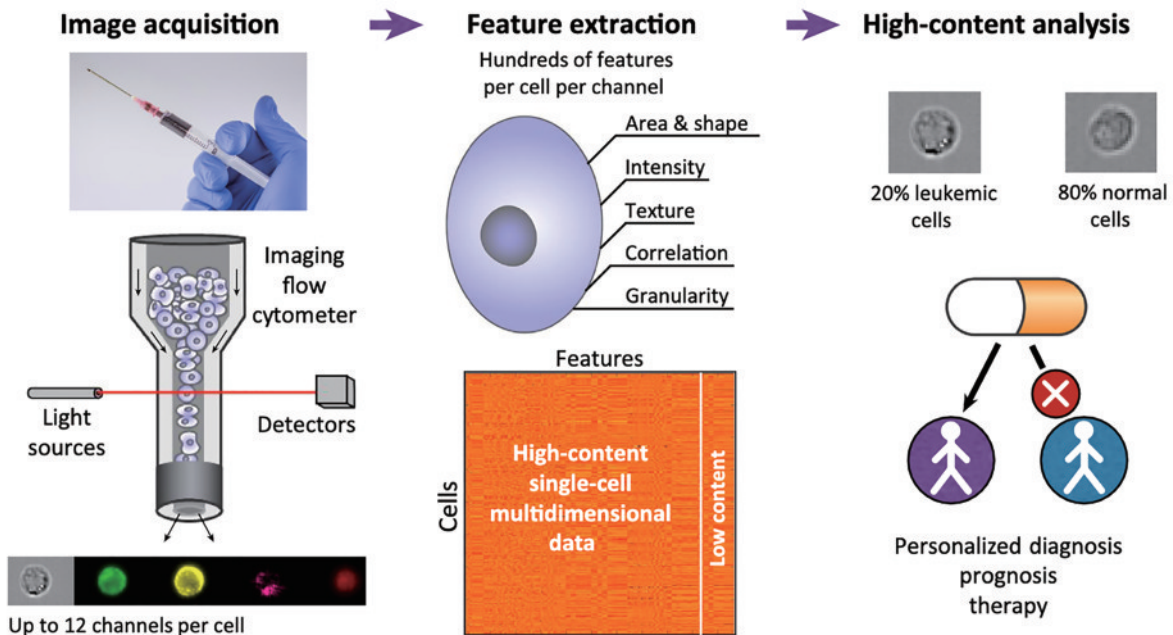


图 4 成像流式细胞术以高通量获取单细胞图像的流程^[46]

Fig. 4 Flowchart of acquiring single cell images by imaging flow cytometry in high throughput^[46]

生虫和微生物感染药物评估的潜力^[47]。

IFC 在分析活细胞与死细胞和凋亡细胞^[48]、黏附的血小板/血小板碎片^[49]或细胞外囊泡(EV)之间的联系时非常有用。在这些情况下,使用传统的流式细胞术并仅利用 FSC/SSC 参数作为鉴别标准可能会将阴性染色细胞解释为阳性细胞。凋亡标记物^[50]和/或 CD41a+ 的表达^[51]显示了这一点。CD41a 是一种糖蛋白(Ca⁺⁺依赖性异源二聚体),可作为血小板表面黏附蛋白的受体并介导细胞与底物和细胞与细胞之间的黏附。许多漂浮在血管中的癌细胞暂时被血小板包裹,可能会逃避免疫监视^[51-52],而 IFC 是对它们进行分析最有前途的方法。此外,IFC 在区分死亡细胞^[53]和活化细胞中的假阳性事件方面也非常有帮助。

如今,成像流式细胞术利用传统流式细胞术和荧光显微镜的互补优势在实地细胞分析中取得了巨大的进步^[10,12,54]。细胞成像仪器的进步正在推动基于荧光的细胞形态和细胞异质性分析的复兴。随着所提出的问题变得越来越复杂并需要多模式和多色细胞分析,定量在形态参数测量以及荧光和显色强度测量领域变得非常重要。

2.3 荧光流式细胞仪的应用

流式细胞术拥有丰富的技术,并且适用于多个研究领域^[55]。由于流式细胞术可同时鉴别单个细胞上的多种抗原,而且能够在极短的时间内分析大量细胞,因此它是医学免疫学研究、临床血液病诊断、治疗及细胞周期研究的重要检测手段^[15]。

2.3.1 免疫表型分析

免疫表型分析是流式细胞术最常见的应用^[13]。它能够利用流式细胞术同时分析混合细胞群的多个参数^[56]。免疫表型实验最简单的形式是针对细胞表面的抗原用荧光染料偶联抗体对细胞进行染色。大多数这些抗原被赋予“分化簇”编号(或 CD 编号),以便使用通用命名法来定义针对特定细胞抗原的单克隆抗体。例如:CD3 是“3 号分化簇”,用于定义存在于所有 T 细胞上的 T 细胞共同受体;而大多数免疫细胞具有特定的 CD 标记物,将它们定义为细胞群;还有 T 细胞标记(CD3、CD4、CD8)、B 细胞标记(CD19、CD20)、单核细胞标记(CD14、CD11b)、NK 细胞标记(CD56、CD161)和活化细胞标记(CD25、CD40L、CD71、HLA-DR)^[18]。

如今,“CD”不仅仅代表着白细胞表面抗原,还有红细胞膜表面抗原、血小板表面抗原、髓系细胞表面抗原、其他组织细胞表面或细胞内的抗原等,而流式细胞术检测法可广泛应用于血液病研究中。例如,在白血病的免疫分型中,流式细胞仪利用单克隆抗体(McAb)检测白血病细胞的细胞膜和细胞浆抗原(CD),分析其表现型,以了解被测白血病细胞所属细胞系列(如髓系、红系、淋巴系等白血病亚型)及其分化程度。对白血病细胞抗原的分析研究有助于研究白血病分型,从而为诊断、治疗和预后提供依据。

2.3.2 细胞周期分析

细胞周期分析包括用饱和量的 DNA 结合染料来染色 DNA^[57-59]。在大多数情况下,细胞用体积分数为 70% 的乙醇溶液固定,使细胞通透,然后用染料(PI、7AAD、DAPI)染色。但是,有些染料可以进入活细胞对 DNA 染色而不会对细胞造成伤害,例如 Hoescht 33342^[57]。在这种类型的分析中,以线性放大的低流速采集样品,然后使用建模软件进行分析以确定细胞周期阶段。

2.3.3 细胞凋亡分析

细胞凋亡或程序性细胞死亡是免疫学和其他研究领域经常检查的一种现象^[60]。它通过去除细胞而不触发炎症反应(坏死)来维持免疫系统的稳态,这是免疫反应后克隆扩增的 T 细胞、自我靶向 T 细胞、自身反应性 B 细胞和免疫系统中的多个其他细胞的死亡机制。流式细胞术利用与细胞凋亡相关的级联事件的多个目标来检测细胞凋亡^[61-63]。例如,质膜的易位通过膜联蛋白 V 染色来识别,DNA 的核酸内切酶消化过程通过 TUNEL (TdTkj dUTP Nick End Labeling) 来检测,Caspase 的激活可以被抗体和染料测定,而线粒体凋亡通过使用染料测量线粒体膜电位并用 Hoescht 33342 染色检测细胞核中的染色质凝聚来验证^[18]。

2.3.4 细胞内细胞因子分析

细胞内细胞因子分析是通过用蛋白质转运抑制剂(布雷菲尔德菌素 A 或莫能菌素)处理细胞 2~12 h 来进行的,这样细胞产生的任何细胞因子都可以在细胞内积聚,从而实现更好的检测。在此孵育过程中,可以用各种抗原刺激细胞,例如来自疫苗的肽,以测量免疫反应。在经过蛋白质转运抑制剂处理后,对细胞进行活力标记和细胞表面标记染色,然后固定并透化,以使用抗细胞因子抗体进行细胞内染色^[18]。最后,通过流式细胞术分析标记的细胞^[64-66]。

2.4 荧光流式细胞仪的标准化

由于流式细胞仪旨在测量血液或组织液中不同种类细胞的物理和化学特性,因此,通过采用具有一些已知特性的样品(例如标准微球)可以对流式细胞仪进行表征或标准化。控制参数和特性可为一台仪器提供随时间变化的一致结果,但除非仪器经过校准,否则不一定允许对一台仪器的结果与其他仪器的结果进行定量比较。性能表征结果提供了有关流式细胞仪分析能力的详细定量信息,例如测量尺度的线性度、微弱荧光的灵敏度、DNA 含量微小差异的分辨率或可以通过光散射检测到颗粒尺寸最小的估计值等^[17]。

标准化、控制和校准为仪器采集的数据提供了不同程度的确定性。每个过程都旨在确保仪器的结果具有预期目的所需的质量^[67]。目的可能是个人研究实验或临床结果,以确定患者对治疗反应的纵向过程^[13,16,68]。每一台仪器需要在特定时间点标准化,随后在质量控制条件下运行。这些过程将仪器保持在预定

范围内,并确保结果仅在特定范围内变化。如果在仪器标准化时也对结果进行了校准,那么未来的实验结果可以客观和定量地与校准结果或其他实验室的校准结果进行比较。此外,在制定标准化时还应考虑结果的定量。荧光流式细胞仪的大多数结果用“阳性百分比”或“暗淡”或“明亮”等定性术语表示。这些术语是相对的;在一个实验室中被认为是“阴性”、“暗淡”和“明亮”的结果在另一个实验室中可能完全不同。应用具有标准化考量的荧光流式细胞仪可以定量测量荧光强度,为结果表达提供更客观的评估^[17]。

3 荧光流式细胞仪的标准化技术发展

在流式细胞术中,将描述实验方法与结果的术语与“标准”一词相结合使用是很常见的,例如“校准标准”和“标准参量”,却很少有任何迹象表明谁制定了“标准”,以何种权威或共识制定。每个实验室、不同实验室之间、不同国家的科学研究组织之间都会有其相应的规则和标准。为了能够在各个不同组织之间开展学术交流,对疾病进行诊断与探讨,全球化环境下对公共卫生进行有效管理和大数据信息共享,清晰地定义一系列使用流式细胞仪的行业与计量标准供各个领域的学者、医生和技术人员参考是非常必要的。这里总结了目前国内外最具有代表性的标准化的计量方法及其意义,并且梳理了标准化技术的研究发展。

3.1 国际标准

美国国家标准技术研究所(NIST)发起的流式细胞术标准联盟旨在加速定量流式细胞术在细胞和基因疗法的生物制造中的推广与应用。该联盟将为流式细胞术的应用制定标准化术语,并为仪器校准制定参考材料。

精确和普遍接受的术语应该在流式细胞仪和其他领域科学家之间有明确的定义,从而促进交流和理解。下面列出的参量是目前国际上被认为是在应用荧光流式细胞仪时权威且广泛接受和理解的标准术语。

准确度(Accuracy):测量值与真实值或预期值的一致程度。

精确度或可重复性(Precision or Reproducibility):同一事物重复测量彼此一致的程度。在流式细胞术中,测量精度是通过多次测量具有非常均匀特征的颗粒(生物或非生物)样品时获得的变异系数(CV)来估计的^[17]。

光散射灵敏度(Scatter Sensitivity):可以在“无颗粒”流体上方检测到小颗粒的程度。在实践中,前向散射灵敏度通常受到激发光源引起的光学噪声的限制,而侧向散射灵敏度通常受到鞘液中亚微米颗粒的限制。

荧光灵敏度(Fluorescence Sensitivity):在流式细胞术中,荧光灵敏度的概念有两个不同的方面:阈值(threshold)和分辨率(resolution)^[17]。阈值与可以检测

到的最小光量有关。它衡量流式细胞仪测量染色较暗的颗粒并将它们与无颗粒背景(阈值)区分开来的程度。当测量微弱荧光群体的平均荧光时,阈值很重要。分析的粒子数量越多,平均荧光的测量就越准确和精确。分辨率与从混合物中未染色的细胞中分离出染色较暗的细胞的能力有关,其对于细胞亚群的免疫荧光分析很重要,并且受到暗淡和未染色颗粒的CV测量值的强烈影响。分辨率结合了对暗淡和未染色粒子的荧光分布宽度的测量,而不仅仅是平均荧光。两种流式细胞仪可以具有相同的阈值,但在分辨染色较暗的群体的能力方面可能存在显著差异。

检出限(Limit of Detection):样品中可以检测到但不能量化为精确值的最低分析物量。

对准粒子(Alignment Particle):具有均匀大小、荧光和光散射特性的粒子,用于检查流式细胞仪中激发和发射光学器件的对准。校准粒子最好在所有检测器通道中发出荧光,因为这样可以同时检查所有通道。当来自粒子的信号具有最大强度和最小CV时,光学器件的对准是最佳的。颗粒越均匀,就可以更好地检测到与最佳光学对准的小偏差。最佳光学对准对于测量DNA最为关键,因为细胞与细胞之间DNA含量的固有差异非常低。

控制粒子或材料(Control Particle or Material):对稳定的材料(例如制造粒子样品)进行分析时给出的可重复结果。用于设置流式细胞仪的颗粒即使没有分配物理特性的测定值,也可用作对照。控制可用于监控仪器的稳定性并确定其是否在校准范围内可接受使用。

对照样品(Control Sample):以与测试样品或未知样品相同或几乎相同的方式制备的样品,应给出预期的结果。例如,在免疫荧光分析中,阳性对照样品可以使用已知细胞(特征在于对一组抗体具有反应性)和与测试样品相同的抗体试剂。阴性对照样品可以使用测试细胞,但不使用抗体试剂或使用不相关的抗体试剂。此外,阳性对照样品可以包含一些用作内部阴性细胞对照的阴性细胞,这也可以称为内部同种型对照。

等效可溶性荧光色素的分子(Molecules of Equivalent Soluble Fluorophore, MESF)和等效数量的参考荧光团(Equivalent Reference Fluorophore, ERF):测量的颗粒荧光中来自荧光颗粒的信号等于来自溶液中已知数量分子的信号。ERF与MESF的不同之处在于附着在颗粒上的荧光团和溶液中的荧光团可能非常不同,并且可能具有非常不同的摩尔吸收率。因此,MESF是ERF的一个特例,即标记荧光团和溶液中的荧光团是相同的。这是一种实用的方法,因为已知浓度的粒子可以直接与荧光分光计中的荧光染料溶液进行比较。NIST开发了一种确定粒子MESF的方法^[69-70],生产了标准荧光素溶液(标准参考材料

1932),还解决了使用 MESF 定量荧光时要考虑的实际问题^[71]。

抗体结合能力(Antibody Binding Capacity, ABC):在饱和染色条件下可以与细胞结合的特定类型抗体的数量。研究人员还使用术语“ABC”来代表“每个细胞结合的抗体”。该术语可能并不总是意味着需要饱和染色,部分原因是同一细胞群上不同种类的抗体同时染色引起的干扰。

线性响应(Linear Response):使用微球或其他染色颗粒(如包含聚集体的细胞核)可以方便地在有限的线性范围内测量荧光强度的相对线性^[72]。对样品的测量应该给出直方图分布的平均通道,它是单个粒子的平均通道的倍数。

目前,在一些商用的流式细胞仪中可以校准的参量包括粒子直径或体积(或检出限)、每个粒子的荧光染料(MESF 或 ERF)数量、抗体结合能力/每个细胞结合的抗体(ABC)和粒子浓度(例如每微升粒子数)。校准不需要每天进行,但必须在校准前每天对仪器进行质量控制。只要测量值不超过应用程序确定的可接受限值,使用控制材料监控测量值可确保仪器仍处于校准状态。如果控制超出范围,则需要重新校准。如果仪器被更换或维修过,通常建议重新校准。

值得注意的是,很多不受流式细胞仪控制的因素会极大地影响结果。校准良好的仪器和仔细的质量控制无法纠正那些未正确维护、制备和使用的样品和试剂。如果数据分析有误,仪器产生的良好数据也不能保证得到正确的结果。流式细胞仪的硬件只是系统中必须正确工作才能获得良好结果的一部分。

3.2 国内标准

基于医药行业标准 YY/T0588—2005《流式细胞仪》^[73]和计量技术法规 JJF 1665—2017《流式细胞仪校准规范》^[74]的内容,目前国内对基于荧光检测原理的分析性流式细胞仪的性能评价方法主要包括测试仪器的分辨率(散射光和荧光)、灵敏度(荧光和 FSC)、荧光线性、检出限、仪器的准确性、可重复性和稳定性。这些性能评估方法与国际上采用的一般标准化参量基本一致,可以对流式细胞仪的性能进行可溯源的计量、比较与评判。

此外,在评估流式细胞仪性能时,通常要确保说明书上要求的正常仪器工作与环境条件(例如环境温度变化不超过 5%),并且使用与流式细胞仪适配的试剂、质控品以及标准微球^[17,75],并在实验之前按照制造商的使用说明对流式细胞仪进行正确的校准与操作。这里对国内使用的计量方法及其参数进行更详细的描述。

3.2.1 分辨率

将适量多重荧光强度混合的标准微球(如 RCP-30-2)稀释于体积为 1 mL 的磷酸盐缓冲液(PBS)中,充分混匀后上机测试,获取 FSC 和各个荧光通道的

CV 值。对于分辨率的一般要求是:FSC 通道的 CV 小于等于 2.0%;FITC、PE 通道的 CV 小于等于 2.0%;其他荧光通道的 CV 小于等于 4.0%。此外,在分析血液样品时,从 FSC/SSC 图应能将外周血中的血小板和红细胞、白细胞三群(淋巴细胞、单核细胞、粒细胞)分开。

3.2.2 灵敏度

将适量多重荧光强度混合的标准微球(如 RCP-30-5A)用体积为 1 mL 的鞘液充分混匀后上机测试,获取各个峰的平均荧光强度,并根据标准微球说明上各个峰 MESF,用随试剂附带的标准软件计算荧光灵敏度。技术要求一般是:绿色荧光的 FITC 不大于 200MESF;红色荧光的 PE 不大于 100MESF。另外,在测量 FSC 检测灵敏度时,取直径为 1 μm 的无荧光标准微球(如 3K1000)加入 1 mL 鞘液中,充分混匀后上机测试,检查直方图上显示的峰值信号及其对应的直径。一般要求 FSC 检测灵敏度应不大于 1 μm 。

3.2.3 荧光线性

在装有 1 mL 鞘液的试管中加入适量多重荧光强度混合的标准微球(如 RCP-30-5A),充分混匀后上机检测,获取各个峰的平均荧光强度。对实验结果进行直方图分析,根据标准微球说明书提供的各个峰 MESF 值,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),要求 $r \geq 0.98$ 。

3.2.4 检出限

根据线性回归方程,计算无荧光标记的空白微球的平均荧光强度值对应的 MESF,即为荧光检出限(LOD)。

3.2.5 准确性和可重复性

流式细胞仪的准确性是检验仪器测量结果与预期值一致的程度。可使用标准的表面标志物(如 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 次可测定 CD3、CD4、CD8 阳性百分比,分别计算平均值。要求测量结果在质控品说明书给出的参考范围内。另外,对质控品进行重复测量 20 次,并分别计算 CD3、CD4、CD8 阳性百分比的 CV,可评估流式细胞仪的可重复性。要求 CV 小于等于 10%。

3.2.6 仪器稳定性

在周围环境温度变化不超过 5% 的条件下(如设定温度 $\pm 3^\circ\text{C}$)内,在装有 1 mL 鞘液的试管中加入适量单色荧光微球标准物质,充分混匀后上机测试,得到标准微球平均荧光强度(L_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,得到标准微球平均荧光强度(L_2)。计算得到荧光偏差百分比 $B = (L_1 - L_2) \times 100\% / L_2$ 。要求在 8 h 内得到的 FSC 及所有荧光通道峰值平均荧光强度偏差不得超过 $\pm 10\%$ 。

3.3 标准化技术的研究发展

目前,健康的人体免疫系统所包含的异质性以及预示各种疾病的免疫学变化仅被部分记录和报道,而它们的全面阐明被称为“人类免疫学项目”^[76]。对于人类免疫系统产生变化的准确测量,需要通过精确和标准化的分析来区分真正的生物学变化和人为技术因素导致的差异。因此,为了使“人类免疫学项目”取得成功,研究人员利用需要标准化的荧光流式细胞术对健康和有疾病的人群进行免疫表型分析。

利用细胞表面标记物,对特定免疫细胞亚群的定义在不断发展,特别是对于当前被集中研究的细胞类型。这些类型包括调节性 T (Treg) 细胞、分泌白细胞介素 17 (IL-17) 的辅助性 T (TH17) 细胞、树突状细胞 (DC)、自然杀伤细胞 (NK)。然而,即使是具有良好表征的细胞亚群,例如幼稚和记忆 T 细胞,在各种研究中根据不同的生物标记组合也会有不同的定义。由于它们引入了未知量的异质性,研究之间的比较变得困难。

在认识到免疫表型标准化的必要性之后,美国国立卫生研究院 (NIH) 和临床免疫学学会联合会 (FOCIS) 于 2009 年成立了一个实验室联盟。2010 年,该联盟召集了一个国际实验室小组,成员来自 FOCIS 卓越中心 (FCEs)、人类免疫表型分析联盟 (HIPC) 以及流式细胞术领域内主要的学术和工业领导者。来自这些小组的大约 50 名参与者在 2011 年 1 月在 NIH 召开的名为 Flow Immunophenotyping Technical Meeting 的研讨会上提出了一套用于 B、T 和 NK 细胞、单核细胞和 DC 表型分析的所需标准标志物。2012 年, Maecker 等^[76]深入讨论了免疫学界如何就这些标志物和定义达成共识的内容,从而形成用于人类免疫监测的标准化免疫表型分型小组。例如,基于当前全球艾滋病毒传染的巨大负担,HIPC 提出的 8 色抗体混合免疫表型方法使大型流式细胞仪制造厂商纷纷响应并提出系统级的解决方案,对 CD4+T 细胞的计数实现标准化,以实现小于 10% 的实验室间变异系数^[77]。值得注意的是,为了实现标准化检测的最大化收益,需要集中收集并挖掘数据^[78]。通过这种方式,可以跨越年龄、性别和种族等变量来确定目前鲜为人知的细胞亚群和功能的正常范围。结果将是更快速地发现有助于免疫相关疾病的诊断、预后和治疗监测的生物标志物。

此外,欧盟支持的 EuroFlow 联盟旨在通过引入 8 色流式细胞仪和完全标准化的实验室程序和抗体面板,实现对免疫表型诊断和分类的创新和标准化,以便在不同实验室之间实现最大程度的可比性^[79]。例如,他们采用了与目标平均荧光强度值 (MFI) 偏差最高 15% 的验收标准,以便在日常监测期间对仪器进行校准和设置。开发用于样品制备的 EuroFlow 标准操作流程 (SOP) 能够提供标准的稳健可靠的数据,结合用于定义仪器设置和荧光补偿的标准化 EuroFlow

SOP,它允许为单个仪器、同一实验室内不同仪器、不同实验室之间的不同仪器生成高度可比和可重复的数据。总体看来,EuroFlow 中心 6 年的广泛合作实验和对数百名患者样本的分析为血液系统恶性肿瘤的完全标准化诊断和分类提供了创新的方案、软件工具和抗体面板。

尽管流式细胞术广泛用于细胞分析,包括大型 (>20 μm) 神经元和肺泡巨噬细胞、淋巴细胞 (~10 μm) 和血小板 (2~3 μm),其在细胞外囊泡 (EVs) 和其他亚微米颗粒 (MPs) 分析中的应用仍存在许多挑战并产生了许多有争议的结果,部分原因是仪器检测的局限性,以及在如何解释数据方面缺乏可靠的方法^[80]。Cointe 等^[81]首次验证了基于微珠的散射光信号在不同流式细胞仪平台上标准化 MP 计数的新策略。使用分辨率和背景噪声 (BNR) 水平作为仪器鉴定标准,这项标准化策略被证明与 85% (44/52) 参与调研的仪器兼容。除了散射光信号,也有其他研究组将荧光作为首选阈值^[82-83]。Nolan 等^[84]梳理了利用流式细胞仪检测血小板囊泡的方法,深入探讨了仪器间变异系数 (inter-instrument CVs)、荧光检出限 (LOD)、平均等效可溶性荧光团 (MESF) 等标准化参数的应用场景与意义。目前,国际细胞外囊泡学会、国际细胞学促进会、国际血栓形成和止血学会正在领导一个 EV 流式细胞术工作组,用来标准化 EV 分析的荧光校准和数据报告。这种标准化将加速对新的高灵敏度仪器的适应和验证,用于分析生物流体中的 EV,包括血浆中的血小板 EV。

与国际组织相比,国内目前对荧光流式细胞仪的标准化研究还处于起步阶段。由于流式细胞仪绝大部分应用于医院和研究组织的检验医学专业领域中,关于流式细胞仪标准化研究的报告相对分散,各组织的研究人员基于不同的实验研究目的所报告的标准化参数也各有差异。

总的来说,国内应用流式细胞仪所报告的研究结果以准确度^[85]、精确度 (或可重复性)^[86-87]、平均荧光强度^[88-89]、检出限^[90]等标准化参数为主。绝大部分的流式细胞仪来自美国 BD 公司和 Beckman Coulter 公司两大制造商,实验研究所使用的标准物质、试剂盒以及软件工具等均由生产流式细胞仪的厂商提供,分析数据的软件均使用 SPSS 的不同版本。陈淑英等^[91]参照美国临床实验室标准化协会 (CLSI) 系列文件和相关参考资料所提供的方案,利用 BD FACS Canto II 流式细胞仪对科室常用的流式检测项目 (外周血淋巴细胞亚群:CD3+T 细胞、CD3+CD4+T 细胞、CD3+CD8+T 细胞、B 细胞和 NK 细胞) 的精密度、准确度、线性范围和参考区间进行验证,并对其结果与生产商声明的性能指标进行比较。结果显示各项评估指标均与生产商所示的性能参数相符。除了对各项标准化参数进行计量与溯源外,研究精确的组合门技术对急性白血病

等疾病的免疫表型分析也具有重大的临床应用价值^[92]。

国内外这些研究的共同特点是通过研究制订基于流式细胞术的细胞免疫表型分析标准,进一步推动流式细胞术的标准化。我国在临床流式细胞分析领域的标准化研究基础较为薄弱,需要参考国外的研究报告制订淋巴细胞亚群检测的标准化分析方法和操作程序,并加强对实验室人员在质量控制方面的培训,促进我国淋巴细胞亚群检测技术和荧光流式细胞仪操作程序的标准化。

3.4 讨论

尽管国内外均提出了一些可供参考的标准化计量方法来表征和评估流式细胞仪的性能^[17,73-74,93],但至今为止还没有制定出一整套完整可溯源的可供国内外各个相关领域人员使用的标准方法。对于科研领域而言,一般的实验室仅仅需要考察特定的几个参量或评估指标(如分辨率、荧光灵敏度、测量结果的可重复性)^[13,16,68,94-95],因此对于花费巨资购买一整套流式细胞仪设备并重新培训操作人员的高额成本,会谨慎考虑,这些实验室一般会借用其他研究组织或公司的设备进行单次的批量测试,以节约经济和时间成本。对于医学领域而言,尤其是医院的检验科和医学院里专门从事流式细胞分析的人员,仅仅考察几个参量是不够的。由于流式细胞仪的检测结果基本用于疾病检测、治疗和预后^[15,49-50,68,96-98],除了本文中总结的几个主要标准参量外,还要考虑其他很多因素。例如:仪器的携带污染率会错误地引起连续实验结果分析物浓度的增加,一般要求不大于1%;倍体(ploity)的线性可用来分析生物体细胞中遗传物质(如DNA)的含量^[73,93]。此外,目前与流式细胞分析相关的学术论文中很少会详细提到对仪器标准化的记录与报告,因此研究人员与制造和使用流式细胞仪的组织还需要提高对标准和规范使用规范的意识,从而加速流式细胞仪标准化的研究进展。

荧光流式细胞仪的生产制造与研究是密不可分的。因此,商业化流式细胞仪的制造厂商需要深度了解其产品的应用领域、研究人员的研究方向和目的、操作人员所需掌握的知识与技能。同时,荧光流式细胞仪的使用人员需要了解不同产品的各项性能指标。李臣宾等^[99]对2011—2013年的全国室间质评数据与同期美国Wadsworth Center质评数据进行比较,调查了临床实验室淋巴细胞亚群的检测现状。结果显示我国质评计划中相对计数的变异系数(3.0%~9.8%)略高于美国(2.0%~10.0%),而绝对计数的变异系数差距更明显。因此,进一步制订相关标准并实施标准化是非常必要的。此次参加全国质评的实验室主要使用美国BD公司、Beckman Coulter公司和德国Partec公司3个品牌的流式细胞仪,共计11种型号。其中BD公司的FACS Calibur和FACS Canto各占47.1%和

12.1%,Beckman Coulter公司的EPIC XL和Cytomics FC500C各占22.4%和12.6%,上述4种型号仪器占所有仪器的94.2%。通过报告的文献资料可以看出,商业化的流式细胞仪普遍要求用标准微粒得出的实验结果满足荧光信号强度变异系数小于2.0%、能够分辨的粒子直径小于1 μm 、携带污染率小于0.5%等条件,来达到大部分实验室的基本预期。

碧迪公司在上一代流式细胞仪FACS Calibur和FACS Aria的基础上通过进一步改进研发出新一代产品FACS Canto II。改进后的自动式样本抽吸装备极大地降低了交叉污染率,创新性的光路设计提高了对光信号的捕获能力,超快的检测速度为工作者节省了宝贵的时间,适用于临床诊断和治疗^[91]。除了开发新的激光器^[100]和提高仪器校准和标准化能力外,生产小型、价格合理且易于使用的流式细胞仪的趋势已经出现^[101-102]。我国目前有迈瑞医疗研发生产的BriCyte E6流式细胞仪^[103]。与BD FACS Canto II相比,BriCyte E6的仪器分辨率CV、携带污染率和仪器开机8 h稳定性这3项性能指标较为出色。而BD FACS Canto II的荧光检出限、荧光线性和FSC灵敏度检出限这3项性能指标更为出色。在FSC、SSC分辨率和倍体分析线性方面,BriCyte E6、BD FACS Canto II、Beckman Coulter Navios均符合行业标准^[90]。

随着流式细胞术在未来不断地向前发展,所涉及的应用领域会逐步扩大。因此,流式细胞仪稳定良好的性能是必需的基础,研究人员应更进一步将关注点集中在仪器的状态以及不同仪器所产生实验数据的可比性等方面,探索更完善的标准化实验室仪器评价方案。

4 结束语

自20世纪80年代以来,流式细胞术得到了迅速的发展。它从一个只有Fulwyler等^[104]几名专家发展和使用的技术平台转变为一个通用的实验室工具和临床诊断系统^[55]。其中,荧光流式细胞术对准确测量CD4+细胞计数至关重要,以确保患者能接受适当的抗逆转录病毒治疗,以进行HIV/AIDS监测^[105-107]。另外,使用荧光流式细胞术对化疗后患者造血免疫系统重建的CD34+细胞数量进行计数已成为临床实践的金标准^[108]。多参量流式细胞术检测(≥ 12 个荧光参数)通常用于临床疾病诊断和治疗,这在恶性血液肿瘤的临床流式细胞术分析中广泛应用^[109]。所有这些应用本质上都需要在不同的地点和时间使用不同的流式细胞仪平台得出可比较和可重复的结果。实验结果的一致性只能通过采用多种控制条件来实现,例如,用于仪器标准化和校准的颗粒以及测试过程中的生物细胞参考材料^[17]。如果不正确使用这些控制条件,流式细胞仪为人类健康和医疗带来丰富信息的价值将无法实现,更不会进一步将其推广到新的生物和临床应用中。

可以说,在未来以大数据为依托的精准医疗发展进程中,将基于荧光检测以及其他类型流式细胞仪测试的流程及计量方法逐步标准化是非常迫切的。

参 考 文 献

- [1] ur Rahman A, Khan S, Khan M. Transport of trans-activator of transcription (TAT) peptide in tumour tissue model: evaluation of factors affecting the transport of TAT evidenced by flow cytometry[J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2019, 72(4): 519-530.
- [2] Suo Y Z, Gu Z Q, Wei X B. Advances of *in vivo* flow cytometry on cancer studies[J]. *Cytometry A*, 2020, 97(1): 15-23.
- [3] Bonar M M, Tilton J C. High sensitivity detection and sorting of infectious human immunodeficiency virus (HIV-1) particles by flow virometry[J]. *Virology*, 2017, 505: 80-90.
- [4] Hassan S S, Ruusuvoori P, Latonen L, et al. Flow cytometry-based classification in cancer research: a view on feature selection[J]. *Cancer Informatics*, 2016, 14(5): 75-85.
- [5] Nery A A, Nascimento I C, Glaser T, et al. Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications[J]. *Cytometry A*, 2013, 83(1): 48-61.
- [6] Wang Y Y, Hammes F, de Roy K, et al. Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology[J]. *Trends in Biotechnology*, 2010, 28(8): 416-424.
- [7] Ruella M, Xu J, Barrett D M, et al. Induction of resistance to chimeric antigen receptor T cell therapy by transduction of a single leukemic B cell[J]. *Nature Medicine*, 2018, 24(10): 1499-1503.
- [8] Carpenter R O, Evbuomwan M O, Pittaluga S, et al. B-cell maturation antigen is a promising target for adoptive T-cell therapy of multiple myeloma[J]. *Clinical Cancer Research*, 2013, 19(8): 2048-2060.
- [9] Davatchi F, Abdollahi B S, Mohyeddin M, et al. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients[J]. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 2011, 14(2): 211-215.
- [10] Stavakis S, Holzner G, Choo J, et al. High-throughput microfluidic imaging flow cytometry[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 55: 36-43.
- [11] Han Y Y, Gu Y, Zhang A C, et al. Review: imaging technologies for flow cytometry[J]. *Lab on a Chip*, 2016, 16(24): 4639-4647.
- [12] Erdbrügger U, Rudy C K, Etter M E, et al. Imaging flow cytometry elucidates limitations of microparticle analysis by conventional flow cytometry[J]. *Cytometry A*, 2014, 85(9): 756-770.
- [13] Finak G, Langweiler M, Jaimes M, et al. Standardizing flow cytometry immunophenotyping analysis from the human ImmunoPhenotyping consortium[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 20686.
- [14] de Rosa S C. Vaccine applications of flow cytometry[J]. *Methods*, 2012, 57(3): 383-391.
- [15] Jaye D L, Bray R A, Gebel H M, et al. Translational applications of flow cytometry in clinical practice[J]. *Journal of Immunology*, 2012, 188(10): 4715-4719.
- [16] Kalina T. Reproducibility of flow cytometry through standardization: opportunities and challenges[J]. *Cytometry A*, 2020, 97(2): 137-147.
- [17] Wang L L, Hoffman R A. Standardization, calibration, and control in flow cytometry[J]. *Current Protocols in Cytometry*, 2017, 79(1): 1-3.
- [18] McKinnon K M. Flow cytometry: an overview[J]. *Current Protocols in Immunology*, 2018, 120(1): 5.
- [19] Steinkamp J A, Romero A, Horan P K, et al. Multiparameter analysis and sorting of mammalian cells [J]. *Experimental Cell Research*, 1974, 84(1/2): 15-23.
- [20] Ward M D, Kaduchak G. Fundamentals of acoustic cytometry[J]. *Current Protocols in Cytometry*, 2018, 84(1): e36.
- [21] Li Z J, Li P Y, Xu J, et al. Hydrodynamic flow cytometer performance enhancement by two-dimensional acoustic focusing[J]. *Biomedical Microdevices*, 2020, 22(2): 27.
- [22] Goddard G R, Sanders C K, Martin J C, et al. Analytical performance of an ultrasonic particle focusing flow cytometer[J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(22): 8740-8746.
- [23] Goddard G, Martin J C, Graves S W, et al. Ultrasonic particle-concentration for sheathless focusing of particles for analysis in a flow cytometer[J]. *Cytometry A*, 2006, 69(2): 66-74.
- [24] Mandy F, Bergeron M, Houle G, et al. Impact of the international program for Quality Assessment and Standardization for Immunological Measures Relevant to HIV/AIDS: QASI[J]. *Cytometry*, 2002, 50(2): 111-116.
- [25] Barry S M, Condez A, Johnson M A, et al. Determination of bronchoalveolar lavage leukocyte populations by flow cytometry in patients investigated for respiratory disease[J]. *Cytometry*, 2002, 50(6): 291-297.
- [26] Piyasena M E, Austin Suthanthiraraj P P, Applegate R W, Jr, et al. Multinode acoustic focusing for parallel flow cytometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(4): 1831-1839.
- [27] Bonner W A, Hulett H R, Sweet R G, et al. Fluorescence activated cell sorting[J]. *Review of Scientific Instruments*, 1972, 43(3): 404-409.
- [28] Wang L S, Flanagan L A, Monuki E, et al. Dielectrophoresis switching with vertical sidewall electrodes for microfluidic flow cytometry[J]. *Lab on a Chip*, 2007, 7(9): 1114-1120.
- [29] Velev O D, Bhatt K H. On-chip micromanipulation and assembly of colloidal particles by electric fields[J]. *Soft Matter*, 2006, 2(9): 738-750.
- [30] Yao B, Luo G A, Feng X, et al. A microfluidic device based on gravity and electric force driving for flow cytometry and fluorescence activated cell sorting[J]. *Lab on a Chip*, 2004, 4(6): 603-607.
- [31] Schmid L, Weitz D A, Franke T. Sorting drops and

- cells with acoustics: acoustic microfluidic fluorescence-activated cell sorter[J]. *Lab on a Chip*, 2014, 14(19): 3710-3718.
- [32] Jakobsson O, Grenvall C, Nordin M, et al. Acoustic actuated fluorescence activated sorting of microparticles [J]. *Lab on a Chip*, 2014, 14(11): 1943-1950.
- [33] Ding X Y, Lin S C S, Kiraly B, et al. On-chip manipulation of single microparticles, cells, and organisms using surface acoustic waves[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(28): 11105-11109.
- [34] Wu T H, Chen Y, Park S Y, et al. Pulsed laser triggered high speed microfluidic fluorescence activated cell sorter[J]. *Lab on a Chip*, 2012, 12(7): 1378-1383.
- [35] Wang X L, Chen S X, Kong M, et al. Enhanced cell sorting and manipulation with combined optical tweezer and microfluidic chip technologies[J]. *Lab on a Chip*, 2011, 11(21): 3656-3662.
- [36] Moffitt J R, Chemla Y R, Smith S B, et al. Recent advances in optical tweezers[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2008, 77: 205-228.
- [37] Ho C T, Lin R Z, Chang H Y, et al. Micromachined electrochemical T-switches for cell sorting applications [J]. *Lab on a Chip*, 2005, 5(11): 1248-1258.
- [38] Krüger J, Singh K, O'Neill A, et al. Development of a microfluidic device for fluorescence activated cell sorting [J]. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2002, 12(4): 486-494.
- [39] Fu A Y, Chou H P, Spence C, et al. An integrated microfabricated cell sorter[J]. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(11): 2451-2457.
- [40] Holzner G, Mateescu B, van Leeuwen D, et al. High-throughput multiparametric imaging flow cytometry: toward diffraction-limited sub-cellular detection and monitoring of sub-cellular processes[J]. *Cell Reports*, 2021, 34(10): 108824.
- [41] Hiramatsu K, Ideguchi T, Yonamine Y, et al. High-throughput label-free molecular fingerprinting flow cytometry[J]. *Science Advances*, 2019, 5(1): eaau0241.
- [42] Huang K R, Hiroki M, Zhao Y Q, et al. Deep imaging flow cytometry[J]. *Lab on a Chip*, 2022, 22(5): 876-889.
- [43] Gala de Pablo J, Lindley M, Hiramatsu K, et al. High-throughput Raman flow cytometry and beyond[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2021, 54(9): 2132-2143.
- [44] Nitta N, Iino T, Isozaki A, et al. Raman image-activated cell sorting[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 3452.
- [45] Blasi T, Hennig H, Summers H D, et al. Label-free cell cycle analysis for high-throughput imaging flow cytometry [J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 10256.
- [46] Doan M, Vorobjev I, Rees P, et al. Diagnostic potential of imaging flow cytometry[J]. *Trends in Biotechnology*, 2018, 36(7): 649-652.
- [47] Tree J A, Flick-Smith H, Elmore M J, et al. The impact of “omic” and imaging technologies on assessing the host immune response to biodefence agents[J]. *Journal of Immunology Research*, 2014, 2014: 237043.
- [48] Henery S, George T, Hall B, et al. Quantitative image based apoptotic index measurement using multispectral imaging flow cytometry: a comparison with standard photometric methods[J]. *Apoptosis*, 2008, 13(8): 1054-1063.
- [49] Ouk C, Jayat-Vignoles C, Donnard M, et al. Both CD62 and CD162 antibodies prevent formation of CD36-dependent platelets, rosettes, and artefactual pseudoexpression of platelet markers on white blood cells: a study with ImageStream®[J]. *Cytometry A*, 2011, 79(6): 477-484.
- [50] Darzynkiewicz Z, Traganos F, Zhao H, et al. Analysis of individual molecular events of DNA damage response by flow- and image-assisted cytometry[M]//*Methods in cell biology*. Amsterdam: Elsevier, 2011: 115-147.
- [51] Betz S A, Foucar K, Head D R, et al. False-positive flow cytometric platelet glycoprotein IIb/IIIa expression in myeloid leukemias secondary to platelet adherence to blasts[J]. *Blood*, 1992, 79(9): 2399-2403.
- [52] Placke T, Örgel M, Schaller M, et al. Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells[J]. *Cancer Research*, 2012, 72(2): 440-448.
- [53] Ugawa M, Sadao O. High-speed 3D imaging flow cytometry with optofluidic spatial transformation[J]. *Biomedical Optics Express*, 2022, 13(6): 3647-3656.
- [54] Blasi T, Hennig H, Summers H D, et al. Label-free cell cycle analysis for high-throughput imaging flow cytometry [J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 10256.
- [55] Adan A, Alizada G, Kiraz Y, et al. Flow cytometry: basic principles and applications[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2017, 37(2): 163-176.
- [56] Baumgarth N, Roederer M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2000, 243(1/2): 77-97.
- [57] Kim K H, Sederstrom J M. Assaying cell cycle status using flow cytometry[J]. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2015, 111: 1-16.
- [58] Rosner M, Schipany K, Hengstschläger M. Merging high-quality biochemical fractionation with a refined flow cytometry approach to monitor nucleocytoplasmic protein expression throughout the unperturbed mammalian cell cycle[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(3): 602-626.
- [59] Nunez R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2001, 3(3): 67-70.
- [60] Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Flow cytometry-based apoptosis detection[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2009, 559: 19-32.
- [61] Lecoeur H. Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases[J]. *Experimental Cell Research*, 2002, 277(1): 1-14.
- [62] Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry[J]. *Cytometry*, 1992, 13(8): 795-808.
- [63] Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2000, 243(1/2): 167-190.
- [64] Kagina B M, Mansoor N, Kpamegan E P, et al.

- Qualification of a whole blood intracellular cytokine staining assay to measure mycobacteria-specific CD4 and CD8 T cell immunity by flow cytometry[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2015, 417: 22-33.
- [65] Jung T, Schauer U, Heusser C, et al. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1993, 159(1/2): 197-207.
- [66] Maino V C, Picker L J. Identification of functional subsets by flow cytometry: intracellular detection of cytokine expression[J]. *Cytometry*, 1998, 34(5): 207-215.
- [67] Owens M A, Vall H G, Hurley A A, et al. Validation and quality control of immunophenotyping in clinical flow cytometry[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2000, 243(1/2): 33-50.
- [68] Pitoiset F, Barbié M, Monneret G, et al. A standardized flow cytometry procedure for the monitoring of regulatory T cells in clinical trials[J]. *Cytometry B, Clinical Cytometry*, 2018, 94(5): 621-626.
- [69] Schwartz A, Wang L L, Early E, et al. Quantitating fluorescence intensity from fluorophore: the definition of MESF assignment[J]. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, 2002, 107(1): 83-91.
- [70] Gaigalas A K, Li L, Henderson O, et al. The development of fluorescence intensity standards[J]. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, 2001, 106(2): 381-389.
- [71] Wang L L, Gaigalas A K, Abbasi F, et al. Quantitating fluorescence intensity from fluorophores: practical use of MESF values[J]. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, 2002, 107(4): 339-353.
- [72] Wood J C S. Establishing and maintaining system linearity [J]. *Current Protocols in Cytometry*, 2009(47): 1-4
- [73] 国家质量监督检验检疫总局. 流式细胞仪: YY/T 0588—2005[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Flow cytometer: YY/T 0588—2005[S]. Beijing: Standards Press of China, 2005.
- [74] 国家质量监督检验检疫总局. 流式细胞仪校准规范: JJF 1665—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Calibration specification for flow cytometers: JJF 1665—2017[S]. Beijing: Standards Press of China, 2018.
- [75] DeRose P, Tian L H, Elsheikh E, et al. Expanding NIST calibration of fluorescent microspheres for flow cytometry to more fluorescence channels and smaller particles[J]. *Materials*, 2020, 13(18): 4111.
- [76] Maecker H T, McCoy J P, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2012, 12(3): 191-200.
- [77] Hultin L E, Chow M, Jamieson B D, et al. Comparison of interlaboratory variation in absolute T-cell counts by single-platform and optimized dual-platform methods[J]. *Cytometry B, Clinical Cytometry*, 2010, 78(3): 194-200.
- [78] Böttcher S, Engelmann R, Grigore G, et al. Expert-independent classification of mature B-cell neoplasms using standardized flow cytometry: a multicentric study [J]. *Blood Advances*, 2022, 6(3): 976-992.
- [79] Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden V H J, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols[J]. *Leukemia*, 2012, 26(9): 1986-2010.
- [80] Welsh J A, van der Pol E, Arkesteijn G J A, et al. MIFlowCyt-EV: a framework for standardized reporting of extracellular vesicle flow cytometry experiments[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2020, 9(1): 1713526.
- [81] Cointe S, Judicone C, Robert S, et al. Standardization of microparticle enumeration across different flow cytometry platforms: results of a multicenter collaborative workshop [J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2017, 15(1): 187-193.
- [82] van der Vlist E J, Nolte-'t Hoen E N M, Stoorvogel W, et al. Fluorescent labeling of nano-sized vesicles released by cells and subsequent quantitative and qualitative analysis by high-resolution flow cytometry[J]. *Nature Protocols*, 2012, 7(7): 1311-1326.
- [83] Robert S, Lacroix R, Poncelet P, et al. High-sensitivity flow cytometry provides access to standardized measurement of small-size microparticles: brief report[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2012, 32(4): 1054-1058.
- [84] Nolan J P, Jones J C. Detection of platelet vesicles by flow cytometry[J]. *Platelets*, 2017, 28(3): 256-262.
- [85] 陈骊婷, 林孝怡, 王剑飏. UniCel DxH800 Coulter 血液分析仪血小板计数准确性评价[J]. *检验医学*, 2016, 31(8): 694-696.
Chen L T, Lin X Y, Wang J B. Accuracy of platelet count by UniCel DxH 800 Coulter hematology analyzer [J]. *Laboratory Medicine*, 2016, 31(8): 694-696.
- [86] 刘冬梅, 黄宝丽, 史进方. 标本保存温度和保存时间对流式细胞仪检测淋巴细胞亚群及人类白细胞抗原 B27 结果的影响[J]. *中国血液流变学杂志*, 2016, 26(3): 354-358.
Liu D M, Huang B L, Shi J F. Effect of sample storage temperature and time on lymphocyte subsets and HLA-B27 detected by flow cytometry[J]. *Chinese Journal of Hemorheology*, 2016, 26(3): 354-358.
- [87] 张欢欢, 张春燕, 杨晋等. 流式细胞术检测中性粒细胞膜碱性磷酸酶方法的建立[J]. *中华检验医学杂志*, 2014, 37(8): 623-627.
Zhang H H, Zhang C Y, Yang J, et al. A flow cytometric method for the detection of alkaline phosphatase expression on the membrane of neutrophils [J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2014, 37(8): 623-627.
- [88] 吕颖, 闫丹丹, 张巍, 等. 应用 Canto II 流式细胞仪建立 14~16 岁人群 CD64 正常参考值的探讨[J]. *检验医学与临床*, 2016, 13(1): 29-30.
Lü Y, Yan D D, Zhang W, et al. Establishment of normal reference value for CD64 in healthy adolescents aged 14-16 years by Canto II flow cytometer[J]. *Laboratory*

- Medicine and Clinic, 2016, 13(1): 29-30.
- [89] 于倩倩, 王会平, 翟志敏, 等. 流式细胞仪检测 CD64 平均荧光强度指数在感染性疾病中的意义[J]. 临床荟萃, 2011, 26(5): 383-387.
- Yu Q Q, Wang H P, Zhai Z M, et al. Clinical significance of determination of neutrophil CD64 mean fluorescence intensity index using flow cytometry in diagnosis of infection diseases[J]. Clinical Focus, 2011, 26(5): 383-387.
- [90] 方佩琪, 孙林, 顾梅秀, 等. 碧迪 FACS Canto II 流式细胞仪性能评价及实验室应用[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(2): 94-99.
- Fang P Q, Sun L, Gu M X, et al. Evaluation and clinical application of BD FACS canto II flow cytometer[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(2): 94-99.
- [91] 陈淑英, 陈健, 林勇, 等. BD FACSCanto II 流式细胞仪方法学性能验证[J]. 检验医学, 2016, 31(5): 405-411.
- Chen S Y, Chen J, Lin Y, et al. Methodology verification on the performance of BD FACSCanto II flow cytometry analyzer[J]. Laboratory Medicine, 2016, 31(5): 405-411.
- [92] 罗代平. 流式细胞仪三色荧光标记技术在白血病免疫分型中的应用[J]. 中国医学工程, 2016, 24(1): 123-124.
- Luo D P. Application of three-color fluorescence labeling technique by flow cytometry in immunophenotyping of leukemia[J]. China Medical Engineering, 2016, 24(1): 123-124.
- [93] 王小林, 李昂, 杨硕. 流式细胞仪性能评价方法的建立[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(10): 1366-1367, 1369.
- Wang X L, Li A, Yang S. Establishment of evaluation methods for the performance of flow cytometer[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2015, 36(10): 1366-1367, 1369.
- [94] Mizrahi O, Ish Shalom E, Baniyash M, et al. Quantitative flow cytometry: concerns and recommendations in clinic and research[J]. Cytometry B, Clinical Cytometry, 2018, 94(2): 211-218.
- [95] Stoner S A, Duggan E, Condello D, et al. High sensitivity flow cytometry of membrane vesicles[J]. Cytometry A, 2016, 89(2): 196-206.
- [96] Tan X F, Patil R, Bartosik P, et al. *In vivo* flow cytometry of extremely rare circulating cells[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 3366.
- [97] Arraud N, Gounou C, Turpin D, et al. Fluorescence triggering: a general strategy for enumerating and phenotyping extracellular vesicles by flow cytometry[J]. Cytometry A, 2016, 89(2): 184-195.
- [98] Galanzha E I, Zharov V P. Photoacoustic flow cytometry [J]. Methods, 2012, 57(3): 280-296.
- [99] 李臣宾, 陆红, 周文宾, 等. 临床实验室淋巴细胞亚群检测现状的调查与分析[J]. 临床输血与检验, 2015, 17(3): 203-208.
- Li C B, Lu H, Zhou W B, et al. Analysis of lymphocyte subsets detections in clinical laboratories in China[J]. Journal of Clinical Transfusion and Laboratory Medicine, 2015, 17(3): 203-208.
- [100] 侯杰, 贾海旭, 白雅苏拉. 915 nm 激光二极管端面泵浦的高稳定性全固态 355 nm 紫外激光器[J]. 激光与光电子学进展, 2021, 58(19): 1914003.
- Hou J, Jia H X, Bai Y S L. 355 nm all-solid state ultraviolet laser with high stability end-pumped by 915 nm laser diode[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2021, 58(19): 1914003.
- [101] O'Donnell E A, Ernst D N, Hingorani R. Multiparameter flow cytometry: advances in high resolution analysis[J]. Immune Network, 2013, 13(2): 43-54.
- [102] Shapiro H M, Perlmutter N G. Personal cytometers: slow flow or no flow? [J]. Cytometry A, 2006, 69(7): 620-630.
- [103] Kawabe K, Ochi S, Yoshino Y, et al. Metabolic status and resistin in chronic schizophrenia over a 2-year period with continuous atypical antipsychotics[J]. Therapeutic Advances in Psychopharmacology, 2015, 5(5): 271-277.
- [104] Fulwyler M J, Glascock R B, Hiebert R D, et al. Device which separates minute particles according to electronically sensed volume[J]. Review of Scientific Instruments, 1969, 40(1): 42-48.
- [105] da Silva E D, de Oliveira B C, Pereira A, et al. A flow cytometry-based serological assay to detect visceral leishmaniasis in HIV-infected patients[J]. Frontiers in Medicine, 2021, 8: 553280.
- [106] Chattopadhyay P K, Roederer M. Good cell, bad cell: flow cytometry reveals T-cell subsets important in HIV disease[J]. Cytometry A, 2010, 77(7): 614-622.
- [107] Godoy-Ramirez K, Mäkitalo B, Thorstensson R, et al. A novel assay for assessment of HIV-specific cytotoxicity by multiparameter flow cytometry[J]. Cytometry A, 2005, 68(2): 71-80.
- [108] Saraiva L, Wang L L, Kammel M, et al. Comparison of volumetric and bead-based counting of CD34 cells by single-platform flow cytometry[J]. Cytometry B, Clinical Cytometry, 2019, 96(6): 508-513.
- [109] Ai T, Tabe Y, Takemura H, et al. Novel flowcytometry-based approach of malignant cell detection in body fluids using an automated hematology analyzer[J]. PLoS One, 2018, 13(2): e0190886.