

## 流式细胞仪样品流速的即时标定及误差分析\*

# A QUICK METHOD TO MEASURE THE SAMPLE CURRENT OF THE FLOW CYTOMETER AND ITS ERROR MARGIN

彭兴跃 何学佳 邵寒娟

(厦门大学生命科学学院 361005)

关键词 流式细胞仪, 流速标定, 误差分析

流式细胞仪是进行细胞生物学研究的重要仪器, 在微型浮游生物的研究中也起着很重要的作用<sup>[1]</sup>, 但流式细胞仪测定对进样体积的准确度和精密度往往都有较高的要求。目前的几种商业化流式细胞仪(如 Beckman Coulter 的 EPICS XL, Becton Dickinson 的 FACSCALIBUR, Becton Dickinson 的 LSR, Cytomation 的 Mo Flo BTA, Partec-PAS 的 Dako GALAXY<sup>4</sup>) 采用的进样方式主要有两种, 即针筒式进样和压力式进样。压力式进样是普遍采用的进样方式, 如贝克曼-库尔特的 Epics XL 型流式细胞仪。虽然该仪器设有定量体积进样, 但实际上进样体积是根据进样时间和进样流速进行计算的。因此, 进样流速的准确与否直接关系到进样体积是否准确可靠。为此本文利用分析天平称量的方法来标定进样流速(张利华<sup>[1]</sup>也采用了类似的称量法来确定进样体积), 发现原来仪器设定的流速参数与使用时实际数值有较大的偏离。因此, 及时地对流速参数进行准确标定是十分必要的, 为此作者研究了利用分析天平称量标定该参数的方法。同时, 考虑到不同盐度海水具有不同的比重及粘度, 可能引起系统误差, 也考察了盐度 0~35.01 范围内该参数的变化情况。

## 1 仪器及方法

### 1.1 仪器及标准海水

流式细胞仪为 Beckman-Coulter Epics XL, 1999 年购入。分析天平采用精确至 0.1 mg 的电子天平。不同盐度的海水采用标准海水(青岛海洋大学, 盐度 35.01)用重蒸水进行稀释而成。

### 1.2 实验方法

流式细胞仪开机稳定进入工作状态后, 分别采用高、中、低 3 种流速进样, 每种流速设定不同的进样时间, 最大设到 100 s。当然也可以设定更长的进样时间, 这主要看样品测定所用的时间范围而定。如果时间长, 线性相关系数也会更接近 1, 但整个实验用机时间也长, 而偶然误差的绝对值并不会变化太大。本研究主要考察进样误差的情况, 所以最长时间设在 100 s。进样前将样品(重蒸水或不同盐度的海水)装入进样管中, 进行精确称量。进样后将装有剩余样品的进样管重新称量以求得进样前后的损失质量, 即实际进入仪器管道中的质量。体积则根据不同盐度海水的条件密度计算, 计算参考《海洋学常用表》<sup>[2]</sup>, 温度采用仪器空调房间的实际温度 24℃。

## 2 数据结果及分析

### 2.1 进样时间与进样体积的线性关系

图 1 显示了进样时间与质量损失具有比较好的线性关系, 不同流速的直线在纵轴上的截距是十分接近的。这表明, 仪器进样流的死体积或填补真空体积与流速没有关系, 只与仪器本身有关。而 3 条直线的斜率实际上就是进样的流速。从这 3 条直线计算出来的低速、中速及高速进样状态下样品流的流速分别为 0.3788, 0.8093, 1.2864 mg/s, 换算成体积流速则为

\*国家自然科学基金资助项目 49806004 号及高等学校骨干教师资助计划资助。

第一作者: 彭兴跃, 出生于 1966 年, 博士, 副教授。E-mail: xypeng@xmu.edu.cn

收稿日期: 2002-04-01; 修回日期: 2002-10-01。

0.3729, 0.7968, 1.2664  $\mu\text{l/s}$ 。这与仪器原来设定的每 60 s 20  $\mu\text{l}$  是有很大差别的。可见, 想要得到精确的进样体积, 流速的校正是必须的。

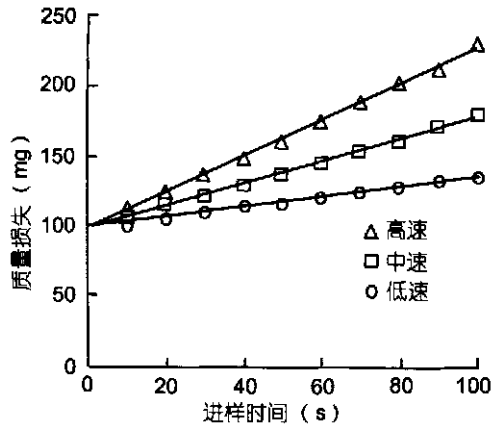


图1 仪器置于低速、中速、高速时样品质量损失与进样时间的关系(样品盐度 24.50)

## 2.2 线性方程各参数与盐度的关系

压力进样实质上是通过固定流路的压力差来控制流速的目的, 而样品流的流速本身会受到粘度甚至比重的影响。在海水样品的实际测定中, 盐度变化会引起比重及粘度的微小变化, 进而影响到进样体积的准确度及精密度。从图 2 可以看出密度与粘度的变化幅度。密度从盐度为 0 时的 0.997 变为 35 时的 1.024, 增加了 2.6%。粘度系数则从  $9.18 \times 10^{-3}$  变为  $9.90 \times 10^{-3}$  增加了 7.9%。考虑这些因素, 作者配制了不同盐度的水样来考察盐度对样品流流速的影响。

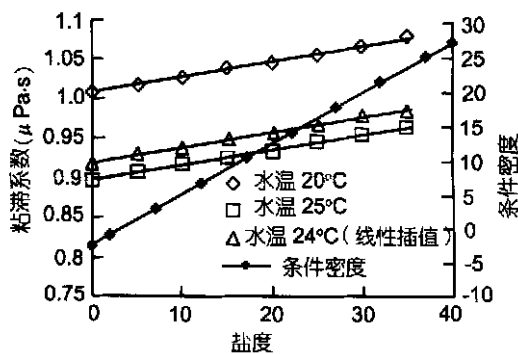


图2 盐度 0~35 范围内粘度系数和条件密度的变化情况数据引自文献 4。其中 24℃ 的粘度系数为 20℃ 和 25℃ 时粘度系数的线性插值; 一个大气压下的实际密度 ( $\text{g/ml}$ ) = 1 + 条件密度/1000

图 3 是不同盐度样品进样流速的实测值。从图中可以看出流速随盐度的变化略呈中间高, 两边低的趋势, 这个趋势低速和中速更为明显一点。确切地说, 曲线有向下弯曲的趋势。由于盐度越大, 粘滞系数越大, 同样的压力差流速会更小, 曲线向下弯曲是必然的。考虑比重(密度)的影响, 如果样品流进口与出口有正的落差, 则盐度增加又有使流速增加的趋势。因为仪器的管路十分复杂, 难以将这两种影响直接进行计算量化, 但这两种影响因素共同作用产生图 3 的图形是可能的。

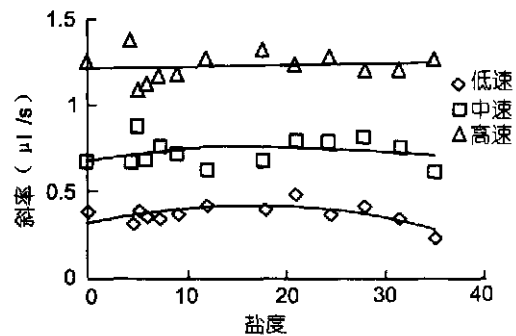


图3 盐度 0~35.01 之间根据回归直线斜率计算所得进样流速的变化情况

图 4 是回归直线截距受盐度影响的情况。总的趋势是随盐度的增加而减少。

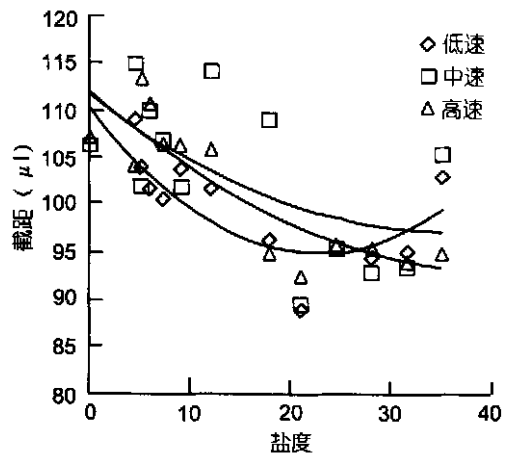


图4 盐度 0~35.01 之间回归直线截距的变化情况

## 2.3 压力式进样的误差分析

让我们进一步分析误差的来源。表 1 是不同盐度

样品改变进样时间测量所得数据线性回归后的残差 ( $S_R$ ), 实际计算是扣除回归直线预测值后计算标准偏差, 该偏差反映了固定样品盐度测量进样流速的偶然误差。表 2 是固定进样时间改变盐度所得的标准偏差 ( $S_S$ ), 如果盐度的改变不影响进样流的流速, 即图 2 所示的微弱趋势是假的, 数据的波动同样是由偶然误

差引起,  $S_R$  与  $S_S$  则在数值上接近。然而, 表 2 的值 ( $S_S$  平均值  $5.40 \sim 7.19 \mu\text{l}$ ) 明显大于表 1 的值 ( $S_R$  平均值  $2.01 \sim 2.51 \mu\text{l}$ ), 这说明盐度带来了新的偏差, 由于图 2 和图 3 呈现一定的趋势, 可以认为盐度带来了一定的系统误差。在实际的工作中, 可以做出如图 2 所示的拟合曲线来校正盐度变化带来的系统误差。

表 1 进样时间与体积损失 ( $\mu\text{l}$ ) 回归直线的残差 ( $S_R = \sqrt{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}, n=10, y$  为回归预测值)

仪器 设定 流速	盐度													平均
	0.00	4.52	5.16	5.99	7.29	9.03	12.05	17.82	21.01	24.51	28.01	31.51	35.01	
低速	2.84	4.31	1.76	1.40	1.71	1.45	0.66	2.42	3.59	0.55	4.03	0.43	0.96	2.01
中速	1.28	4.07	5.21	3.50	2.11	3.00	4.80	0.34	1.63	0.96	2.61	1.03	0.77	2.41
高速	4.67	1.32	4.13	2.33	2.28	4.05	2.98	3.61	1.18	1.39	1.62	0.83	2.22	2.51

表 2 固定进样时间体积损失 ( $\mu\text{l}$ ) 随盐度变化的标准偏差 ( $S_S = \sqrt{\sum (y_j - \bar{y})^2}, n=13, \bar{y}$  为平均值)

仪器设 定流速	进样时间 (s)										平均
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
低速	6.93	4.86	4.17	4.22	4.38	4.53	5.70	5.91	6.78	6.52	5.40
中速	8.03	8.44	6.66	6.32	6.82	6.71	5.08	6.08	8.02	6.83	6.90
高速	5.82	6.02	7.10	6.97	7.14	7.71	6.92	7.29	8.15	8.75	7.19

## 2.4 即时标定流速的必要性及可能的简单步骤

从以上的讨论可以看出, 压力进样的误差主要有两个方面来源: (1) 偶然误差, 其标准偏差可控制在  $\pm 3 \mu\text{l}$  左右; (2) 样品本身的比重粘度等因素带来的系统误差, 对海水测定来说就是盐度变化带来的系统误差, 比偶然误差大很多, 使得标准偏差可达到  $\pm 7 \mu\text{l}$  以上。需要强调的是, 仪器压力的稳定性是更加影响进样精度的因素, 而仪器压力可能在一段时间以后有所变化, 如果要求比较高的进样精度, 也必须定期对样品流流速进行标定。而且, 仪器预置的定量进样参数可能与实际值相差甚远。

称量法标定流速的方法很简单。首先确定样品的比重, 即称量已知体积的样品重, 实际操作中可用容量瓶定容; 取该样品装入进样管, 设定仪器进样时间, 进样前后称量求得失重。由于进样时间与质量损失的线性很好 (见图 5), 在仪器稳定以后, 快速的标定过程只需取 3~5 个不同的进样时间就可以达到足够的精度。标定也可以直接用实际样品进行。

## 3 结论

只配有压力进样装置的流式细胞仪如果要对进

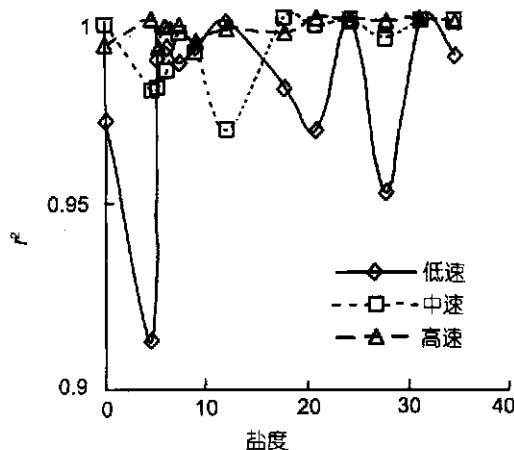
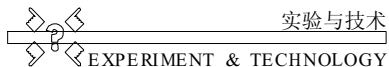


图 5 盐度 0~35.01 回归直线相关系数平方 ( $r^2$ ) 的变化情况

样体积进行定量, 需要对样品流的流速进行校正。称量法简单易行, 可以在测定样品时的一小段时间内快速完成。该方法可使进样精度达到标准偏差  $\pm 3 \mu\text{l}$  左右。盐度会影响样品流的流速, 但同样可以校正。



### 参考文献

- 1 张利华.流式细胞术在微型浮游植物研究中的应用 I. 流式细胞术对微型浮游生物丰度测量方法的探讨, 华东师范大学学报(自然科学版),2000,3: 85~89
- 2 朱波夫 H.H., 施正铨等译.海洋学常用表.北京:科学

出版社,1965. 68~73, 185

- 3 Vives - Rego J. *et al.*. Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology, *FEMS Microbiology Reviews*, 2000,24: 429~448
- 4 Graeme V. Chapman. Instrumentation for flow cytometry, *Journal of Immunological Methods*, 2000,243: 3~12