

细胞计数仪

一、细胞计数仪可视硬件及其功能介绍

- ① 外接硬件：（a）导电液桶，装 4% 的 NaCl 溶液（4 克分析纯 NaCl 溶于超纯水中，并定容至 100 ml，配置好后用 0.5 μm 的过滤膜之后才能使用），连接导电液桶的管路顶端（仪器左侧面板）显示 DILUENT，导电液桶连接有 2 个感应器（感应桶中导电液的量和高度，导电液不足，打开仪器软件时提示需要加注导电液）；（b）废液桶，连接桶的管路顶端显示 WASTE，连接有 1 个感应器，若废液桶满，开软件时提示清空废液桶
- ② 仪器左侧面板 3 个按钮：最上策按钮调节视野、清晰度；中间按钮上下调节；最下按钮为左右调节。调节效果以观测仪器正面左上窗口中间气泡状影像（小孔管的小孔）是否清洗为标准。小孔中间出现黑影，表面小孔堵塞，需要点击软件主界面 System/Unblock Aperture 反冲给小孔排堵
- ③ 面板正面上方按钮，向上扭动按钮，搅拌子顺指针转动；向下扭动，搅拌子逆时针转动
- ④ 控制搅拌子转动速度按钮，顺时针扭动，搅拌子转动加快；逆时针扭动，搅拌子转动变慢
- ⑤ 样品室。（a）电极：有两个，电极 1 一般固定，不经行调试；电极 2（小孔管），根据样品颗粒大小选择合适孔径的小孔管（更换时参照更换小孔管实验步骤）。小孔管上面按钮，顺时针或逆时针扭动可松开或固定小孔管。小孔管上的小孔需要对准样品室左侧壁上的空洞，以便更好的观测小孔管上小孔状态（畅通还是堵塞）。（b）搅拌子，起搅拌作用，使微颗粒均匀分布于导电液中。搅拌子上面按钮起固定和松开搅拌子作用。松开按钮，可对搅拌子固定的方向进行调节。（c）样品杯，最多可加注 150 ml 导电液，开始测定之前必须使样品颗粒均匀分布于导电液中。（d）样品台，放置样品杯，可上下移动，依据实验要求调节固定的位置。（e）陷阱，它的功能是用来防止大的密集的微粒进入系统，当样品的沉淀达到了红色标记就必须清洁陷阱。（f）Lamp 起照明作用，可让实验人员观测样品室中的样品，同时易于观察样品管中的小孔状态（畅通或堵塞）

二、样品信息及运行参数设置

（1）Sample Information

点击 Sample Information 下面的“Change”按钮，出现“Enter Sample Info”界面，该界面下填写样品的基本信息。Group ID 组号或样品批号。Sample ID 样品名称。Operator 实验者姓名。Bar Code 填写 NA。Comment 对样品进行评论、注释和说明。Run Number 已经运行样

品的数量

选择 Sample Information / Edit Sample Info, 出现 Edit Sample Info 界面。选择“Volume”, 填写样品原始体积(液体样品, ml), Electrolyte Volume, 样品杯中总体积, Analytic Volume 分析样品的体积。选择“Mass”, 填写颗粒干粉的质量 Density (g/ml) 颗粒干粉溶于多少体积的导电液, 同样 Electrolyte Volume 表示样品杯中总体积, Analytic Volume 表示分析样品的体积

(2) SOM 设置

点击 SOM 下面的“Change”按钮, 对运行参数进行设置, 包括以下方面:

Control Mode, Time 框中填写数字, 表示运行多长时间实验自动停止。Volumetric 框中填写数字表示分析多少体积的样品后实验自动停止。Total Count 框中填写数字表示分析多少颗粒后实验自动停止。Modal Count 框中填写数字表示峰值数达到多少实验自动停止。Manual 手动停止实验

选中“Flush Aperture Tube before first run”, 表示运行前清理小孔管。Number of Run 循环测定同一样品的次数。Wait Between Runs 每 2 次测样之间等待的时间。Save Average of All Runs 保存所有运行后的平均值。Print Average Report 打印报告。

点击“Aperture”图标, 出现“Change Aperture Tube”界面, 根据所使用小孔管的小孔直径大小作出选择。点击“Threshold”图标, 出现“Sizing Threshold”界面, Sizing Threshold 框中填写数字(小孔直径大小 $\times 2\%$), Counting Threshold 框中填写数字(小孔直径大小 $\times 2\%$)。Measure Noise Level 测定背景噪音。该值在 2 以下符合要求, 一般主要测定导电液的背景噪音。

点击“Current & Gain”, 出现 Current Gain Settings, 设置小孔管的内外电极的电流, 可直接点击 Auto Set, 也可根据不同规格小孔管所规定的电流值进行手动填写。点击“Electrolyte”, 出现“Select Electrolyte and Dispersent”界面, 选择实验时所使用导电液的类型。

点击“Flush”, 设置每个样品测定完成之后小孔管冲洗参数, 一般选择“Defaults”即可。点击“Directory”, 设置保存文件的路径。

(3) Preview

该键的功能主要测试样品的颗粒浓度(对待测样品而言, 浓度值在 8%~10%为最佳)或者导电液的背景噪音(浓度值越小越好, 表示导电液所含的杂质颗粒越少)

(4) Start, 点击该按钮, 开始测定样品

(5) Stirrer 和 Lamp

选中 Stirrer (Stirrer 框中出现“√”号)，搅拌子开始运行；选中 Lamp (Stirrer 框中出现“√”号)，仪器右侧面板上的灯亮，照亮样品室

(6) Waste Tank 指示废液桶中废液量的多少，当蓝色充满整个 Waste Tank 框时，需要清空 Waste Tank 中的废液

三、更换小孔管步骤

(1) 软件主界面点击“Run/Change Aperture Tube Wizard”，出现“Change Aperture Tube Wizard”，显示第一步操作“Remove the currently installed aperture tube”移去目前安装的小孔管。具体方法：逆时针转动小孔管的紧固装置（180 度）到“打开密封位置”，用力拉下小孔管。

(2) 点击“Next”下一步“Install a new aperture tube”，选择合适要分析的样品的小孔管，将新的小孔管套在电极上，旋转 180 度卡紧小孔管，注意小孔管的小孔必须对准样品室左侧壁上的空洞，便于观测小孔状态（畅通或堵塞）

| Aperture Size (μm) | Analysis Range (μm) |
|--------------------|---------------------|
| 20 | 0.4 - 12.0 |
| 30 | 0.6 - 18.0 |
| 50 | 1.0 - 30.0 |
| 70 | 1.4 - 42.0 |
| 100 | 2.0 - 60.0 |
| 140 | 2.8 - 84.0 |
| 200 | 4.0 - 120.0 |
| 280 | 5.6 - 168.0 |
| 400 | 8.0 - 240.0 |
| 560 | 11.2 - 336.0 |
| 1000 | 20.0 - 600.0♦ |
| 2000 | 40.0 - 1200.0♦ |

♦ Range depends on sample density

(3) 点击“Next”下一步“Place a beaker of clean electrolyte on the platform”，在样品台上放置 1 杯清洁的导电液。

(4) 点击“Next”下一步“Close the door”，将样品台升到合适的高度，关上样品间的门

(5) 点击“Next”下一步“Select the electrolyte solution”，在“Select the electrolyte solution”界面 Electrolyte 下拉菜单中选择 ISOTON

(6) 点击“Next”下一步“Select the new aperture”，出现“Change Aperture Tube”对话框，选中需要安装小孔管的类型和型号，点击“OK”

(7) 点击“Next”下一步“Fill the system”，点击“Fill the system”仪器自动将管路充满电解液

(8) 点击“Next”下一步“Adjust the metering pump”，点击“Metering pump”按钮，仪器自动调整测量泵

(9) 点击“Next”下一步“Set Current and gain”，点击“Current & Gain”，直接点击“Auto Set”，分析的是微颗粒，选择“Particles”，分析的是细胞，选择“Cells”，点击“OK”即可

(10) 点击“Next”下一步“Measure noise level”，点击“Measure Noise”测定空白电解液中的噪音水平

(11) 点击“Next”下一步“Calibration”，假如安装的小孔管是第一次使用，需要校验。就在此时做，如是以前校验过的小孔管，现在可以做校验的再确认。关于细节，参阅第 5 节。假如没有必要校验，点击 Next，点击 Done

四、校验和校验的再确认

(1) 校验品的选择（不同粒径的校验品从 Beckman 公司购买）

小孔孔径 检验品标称峰值 推荐的 CC 校验品标称峰值

| Aperture Size (μm) | Calibrator Nominal Modal Size (μm) | Recommended Beckman Coulter CC Calibrator Nominal Modal Size (μm) |
|--------------------|------------------------------------|---|
| 20 | 2 – 4 | 2 |
| 30 | 3 – 6 | 3 |
| 50 | 5 – 10 | 5 |
| 70 | 7 – 14 | 10 |
| 100 | 10 – 20 | 10 |
| 140 | 14 – 28 | 20 |
| 200 | 20 – 40 | 30 |
| 280 | 28 – 56 | 30 |
| 400 | 40 – 80 | 43 |
| 560 | 56 – 128 | 65 |
| 1000 | 60 – 150 | 90 |
| 2000 | 90 – 260 | 90 |

校验时所用的校验品和粒径范围

(2) 准备校验品

向 20 ml 规格 ACCUVETTE 加注适量电解液，滴入数滴校验品，样品杯放置在分析位置（适合于孔径不大于 100 微米的小孔管）；孔径大于 100 微米的小孔管，需使用更大的样品杯

(3) 状态面板点击“Preview”或点击“Run / Preview”，浓度显示条大小在 8%~10%为合适，浓度太低，则需要向样品杯中加注校验品；浓度太高，用电解液进行稀释，直至浓度在合适范围

(4) 运行校验品：点击主菜单 Run / Calibrate Aperture，出现对话框 Calibrate Size，在校验品尺寸框中填入校验品的峰值，这个值可以在检验品的附带数据表中查到。

(5) 点击“Start”按钮，当校验完成，点击“Accept New Kd”，仪器校验完成。校验文件一般存储在 C: \MS 目录下

(6) 获得平均 Kd 值。重复上述步骤 (1) ~ (5)，得到 10 个 Kd 数值，计算 10 次 Kd 值的平均值

(7) 在小孔 Kd 值列表中输入平均值。点击“Run / Change Aperture Wizard”，出现“Change Aperture Tube Wizard”对话框，选中 Select the new aperture tube 100 μ m 后点击 Aperture Tube 按钮，出现“Change Aperture Tube”对话框，选中所使用的小孔管（类型和型号一致），点击 Edit List，在“Edit Aperture Tube List”编辑列表中，点击校验的小孔尺寸，输入小孔管的序列号及平均值后，再点击 Update 即可

(8) 校验的确认：样品杯中加适量电解液和数滴校验品一点击 Preview 确定微颗粒的浓度，接近 10%为最佳（浓度低继续添加，浓度高用电解液稀释）一点击“Run / Verify Aperture Calibration”一在校验品尺寸框中输入校验品的峰值一点击“Start”一运行完成，对话框出现校验的状态。如果校验的确认结果在范围之外，则重新进行校验

五、其它事项

(1) 转换脉冲到粒径的设定：点击软件主界面 Settings / Convert Pulses to Size Settings，出现“Convert Pulses to Size Settings”对话框，Size bins 在 4~300 之间选中；粒径分析范围为小孔管直径的 2%~60%；Bing Spacing 选择数据分析时 X 轴的单位（分析颗粒直径或体积时，有对数和线性两种；Multisizer II Edit. 这个功能和 Multisizer IIe 是类似的，它是用来修正非垂直通过小孔管的微粒导致的误差，只在窄粒径分布时选用）。该设置可在数据分析时或分析前进行设置

(2) 保存标准操作方法: SOM设置完成之后, 点击软件主菜单Settings / Save an SOM, 文件可以存储在位于C:\MS\SOP 目录下的SOM 文件夹中。没有数目的限制, 保存下来的文件以便将来直接调用。调用方法: 主菜单中点击Settings, 然后点击Load Run SOM。要改变标准操作方法, 点击SOM下面的Change或Settings / Change SOM

(3) 运行背景。背景就是一个没有样品的电解液的分析, 也可以称之为“空白分析”。当分析低浓度的样品时, 特别有必要进行背景的分析。设置方法: (a) 选择与分析样品时同样的设置和参数; (b) 在样品室分析部位放上有清洁电解液的样品杯; (c) 状态面板中点击“Start”按钮; (d) 完成之后存储实验结果(需给背景实验结果命名)

(4) 减去背景: (a) 在主菜单中, 点击“Settings / Load Background Run”; (b) 选择背景文件, 选中背景文件后直接点击“Open”, 从现在开始, 以后的分析将自动减除背景值。要想去掉此功能, 点击“Settings / Remove Background Run”

(5) 使用400 μ m或更大的小孔管进行微粒浓度的测定: 使用较大孔径的管测定颗粒时, 使用体积控制模式没有实际意义(测量泵允许的最大体积为 2 ml, 2 ml体积的电解液通过小孔只需较短的时间, 由于对于样品的合适浓度有限制, 因此所计数的微粒数不足以得到一个好的统计结果, 因而结果的重现性就比较差), 因此多采用时间控制模式。为避免高的流速造成的噪音, 电解液加入甘油或蔗糖增加黏稠度, 降低流速, 同时有助于较重颗粒的悬浮。时间控制模式下, 必需人工测定流速之后(单位时间内样品杯中减少的电解液的体积: 毫升 / 秒), 才能测定微颗粒的浓度

六、仪器维护: 每天分析生物样品、食物及腐蚀性液体的实验结束后, 必需清洁仪器管路系统

- (1) 将电解液容器从仪器脱开
- (2) 在主菜单, 点击 System, 点击 Drain System
- (3) 在排空系统完成之后, 放回电解液容器。连接注明放清洁剂的容器。对于生物或食物的应用, 建议的清洁剂是Coulter Clenz 或2%的漂白剂。对于其它的应用, 蒸馏水就可以了
- (4) 在主菜单中, 点击System, 点击Fill System
- (5) 重复步骤(3)
- (6) 让系统充满清洁液直至下一个工作日
- (7) 在下一个工作日使用仪器之前, 重复步骤 1 到 4, 但这时, 要换回电解液。

七、数据分析

(1) Sample Information / SOM 设置完成之后, 先点击 Preview 查看样品的浓度, 在 8%~10% 为最佳

(2) 点击 “Start”, 运行结束后, 软件主界面右方下侧出现实验结果图。图形顶端出现文件名 (开始实验前进行 SOM 设置时给文件的命名), 下方主菜单 RunFile / Edit / View / Graph / Analyze / Display 可对实验结果进行统计分析、图形可视化设置、文件存储等操作

(3) Runfile 主菜单: ①Open for Overlay 将 2 个或多个文件在同一窗口中打开, 图形重叠更能直观判断不同样品之间的差异; ②Save 保存实验结果; ③Save as 将实验结果进行另存; ④Delete 删除选中的文件; ⑤Print 打印; ⑥Print Report 打印报告; ⑦Report preview 报告预览; ⑧Print window 打印窗口; ⑨Export data 输出数据, 文件格式为 XLS; ⑩Get Info 获取运行该样品的信息, Get file History 获取文件历史信息

(4) View 菜单: ①Graph, 选中实验结果以图形展示; ②Listing, 选中实验结果以列表形式显示; ③Size, 选中图形横坐标为微粒直径 (μm), 纵坐标可设置为数量、体积、表面积等参数; ④Zoom in, 图形放大; ⑤Zoom out, 图形回复默认值大小

(5) Graph 菜单: ①Number, 表示图形 Y 轴为微颗粒数量; ②Number%, 表示不同直径大小的微颗粒数量占总数量的百分比; ③Number per ml, 每毫升所含微颗粒的数量; ④Volume, 微颗粒的体积; ⑤Volume%, 表示不同直径大小的微颗粒体积占总微颗粒体积的百分比; ⑥Volume per ml, 每毫升所含微颗粒的体积; ⑦Surface Area 微颗粒表面积; ⑧Surface Area per ml 每毫升所含微颗粒的表面积; ⑨Surface Area%, 表示不同直径大小的微颗粒表面积占总微颗粒表面积的百分比; ⑩Number+Volume, 数量+体积 (Y 轴); +1) Number%+Volume%, 数量百分比+体积百分比 (Y 轴); +2)X 轴可更改为 Volume (体积)、Area (表面积) 和 Diameter (直径)

(6) Analyze 菜单: ①Statistics 统计分析结果; ②Load Background Run 选择运行空白对照样品的文件, 点击打开, 统计分析结果将自动减除背景值

(7) Display 对图形可视化显示设置, 包括图形显示种类的选择、X 轴和 Y 轴的设置等方面

八、创建一个标准的操作流程 (SOP)

(1) 创建 SOP 之前先创建一个 SOM 和 Preferences 文件。在 SOM 下 Change 中对 SOM 各参数进行设置, 设置完成点击 “Settings / Save an SOM” (选择路径、给 SOM 文件命名)

(2) 创建一个 Preferences 文件, 点击主菜单 Preferences 对各项进行设置, 包括 Printed Report

/ Size / Trend / Pulse / View Option.....最后点击 Save Preferences As 保存 Preferences 文件，也可直接点击 Save Preferences As Default，保存 Preferences 为默认值（参数设置为系统默认值）

（3）点击 Settings / Create an SOP，出现对话框，选择 SOM 文件和 Preferences 文件后点击 Save 保存 SOP 文件（选择保存路径及给文件命名）

（4）下次运行类似属性的实验时，直接点击 Settings / Load an SOP 出现对话框，选择 SOP 文件，点击打开即可

（5）只需对 Sample Information 进行编辑设置，无需对 SOM 进行设置

（6）先点击 Preview，样品浓度符合要求，即可点击 Start 开始开展实验

九、仪器使用过程中注意事项

（1）搅拌子转速控制在 10-12，11 比较合适

（2）每测量 120-140 个样品时，最好执行 drain system 一次，以排除气泡

（3）当使用 0.9% 电解液测量直径在 10 μ m 以上的微颗粒时，背景值对结果的影响可以忽略不计

（4）每次取样品杯时，速度不宜过快，否则容易产生气泡

（5）当界面提示 Flow rate is too high，此时一般可以采用 Flush Aperture tube 手段解决；当连续两次提示 Flow rate is too high，此时可以 Fill system 一次加以解决；超过两次时，建议 drain system-fill system 加以解决；问题仍然无法解决时，在主界面菜单中，选择 system-Troubleshooting-purge metering pump，连续进行五次，然后再 fill system

（6）机器左侧的废液桶和吸电解液桶，盖子一定要拧紧，如果较松，容易导致系统进入大量气泡，影响机器正常运行

（7）系统主界面左下方的 waste Tank 一般会在 10-12 个样品时自动清零，但若等系统自动清理时，会造成样品的重复测量，影响实验进度，同时还造成系统报错，因此建议当水条到达 stirrer 的最后一个字母时，手动清理废液

（8）系统清理废液时，可以取出样品杯，进行下一步的准备

（9）为提高仪器的正常快速使用，建议悬浮液中尽量不要包含大块的悬浮物

（10）搅拌子的位置以位于样品的杯子中下部为适宜，不要靠近底部太近，否则容易产生大量的气泡

