

单细胞分析用流式质谱仪的研制与表征

吴娜¹, 杜绪兵², 李绍兵², 张政², 郑义炯²,
曾安², 李鹏¹, 李磊³

(1. 浙江普罗亭健康科技有限公司, 浙江 杭州 311121; 2. 广东省麦思科学仪器创新研究院, 广东 广州 510530;

3. 暨南大学环境与气候学院, 广东 广州 511443)

摘要: 流式细胞术存在检测通道受限(通常<12个)和荧光光谱重叠等技术瓶颈, 而基于质谱检测原理的流式质谱技术通过引入金属同位素标记的方法, 实现了检测通道的显著扩展(>40个)和检测通道间信号干扰的有效抑制。然而, 进口设备的高昂成本严重制约了该技术向科学研究及临床检验等领域的推广应用。本研究成功研制了一套国产化的流式质谱仪, 由气动进样模块、电感耦合等离子体(ICP)离子源、四极杆离子传输系统、飞行时间质量分析器(TOF MS)和高频数据采集系统等核心部件组成, 采用多元素金属标准溶液对仪器性能进行系统表征。结果表明, 自制仪器的全质量范围分辨率超过 550(FWHM); 在 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 进样流速下, 灵敏度达到 9×10^5 cps/pg($^{159}\text{Tb}^+$); 对 Cs、Tb、Ir 的检出限分别为 0.4、0.2、0.04 ng/L; 8 h 质量稳定性测试显示, 质量偏移量 < 0.1 u; 细胞表面蛋白表达的检测结果与国际主流仪器(Helios)具有高度一致性。本研究成果填补了国内高端质谱流式细胞分析仪器的技术空白, 为推进单细胞多参数研究提供了重要的技术支撑。

关键词: 单细胞分析; 多通道检测; 流式质谱仪; 电感耦合等离子体电离

中图分类号: O657.63 文献标志码: A 文章编号: 1004-2997(2025)06-0879-10

DOI: 10.7538/zpxb.2025.0085 CSTR: 32365.14.zpxb.2025.0085

Development and Characterization of a Mass Cytometer for Single-Cell Analysis

WU Na¹, DU Xu-bing², LI Shao-bing², ZHANG Zheng², ZHENG Yi-jiong², ZENG An², LI Peng¹, LI Lei³

(1. Puluoting Health Technology Co., Ltd., Hangzhou 311121, China;

2. Guangdong Maisi Innovation Research Institute of Scientific Instrument, Guangzhou 510530, China;

3. School of Environment and Climate, Jinan University, Guangzhou 511443, China)

Abstract: Flow cytometry is widely used for single-cell analysis but is constrained by a limited number of detection channels (typically < 12) and by spectral overlap between fluorophores. Mass cytometry, based on mass spectrometric detection principles, addresses these limitations by employing metal isotope labeling, enabling a substantial expansion of detection channels (> 40) and effectively reducing inter-channel signal interference. Nevertheless, the high cost of imported mass cytometers has significantly hindered their widespread adoption in both scientific research and clinical diagnostics. In this study, the development of a domestically manufactured mass cytometer was reported, representing a significant advancement in high-end analytical instrumentation. The

system integrated a pneumatic sample introduction module, an inductively coupled plasma (ICP) ion source, a quadrupole ion transmission system, a time-of-flight mass spectrometer (TOF MS), and a high-frequency data acquisition module. Performance evaluation was conducted using multi-element metal standard solutions. The instrument achieved a full mass range resolution exceeding 550 (full width at half maximum, FWHM). At a sample flow rate of 30 $\mu\text{L}/\text{min}$, the sensitivity for $^{159}\text{Tb}^+$ reaches 9×10^5 cps/pg. Limits of detection are determined to be 0.4 ng/L for Cs, 0.2 ng/L for Tb, and 0.04 ng/L for Ir. An 8 h mass stability test demonstrates a mass drift of less than 0.1 u. Furthermore, the detection of cell surface protein expression using the developed instrument shows high concordance with results obtained from a leading commercial system (Helios). The successful construction and validation of this instrument fill a critical technological gap in the domestic market for high-performance mass cytometry. Its demonstrated resolution, sensitivity, stability, and analytical accuracy establish a robust platform for high-dimensional single-cell analysis. This achievement not only supports the expansion of multi-parameter cellular studies in basic research, but also holds substantial potential for translational applications in clinical diagnostics and precision medicine.

Key words: single-cell analysis; multi-channel detection; mass cytometry; inductively coupled plasma ionization

细胞作为生命的最小功能单位, 承载着基因组、转录组、蛋白质组和代谢组^[1]等多层次的生物信息, 在疾病研究^[2-3]、免疫学^[4-5]和药理学^[6-7]等领域具有重要意义。由于细胞存在异质性^[8], 某些基因和蛋白的表达很难在细胞群的测量中被直接观察到, 细胞群的整体信息往往会掩盖单个细胞之间的个体差异性^[9]。因此, 单细胞检测是细胞检测的一个重要发展趋势。

单细胞检测分析技术包括光谱、电化学和质谱^[10]。其中, 流式细胞术^[11](flow cytometry)是最经典且应用非常成熟的单细胞光谱检测技术, 至今已有 50 多年的发展史。传统的流式细胞术是一种基于荧光基因偶联抗体检测单细胞内目标蛋白质的方法, 由于可选择的荧光基因数量有限, 且存在光谱干扰的问题^[12], 限制了其在多参数检测中的发展。2008 年, Tanner 等^[13]提出使用过渡金属标签代替传统的荧光基因, 解决了检测通道数量少和荧光串色的问题。2009 年, Bandura 等^[14]研发了首台流式质谱仪, 使得金属标签代替传统荧光基因的技术得到实际应用^[15]。单细胞流式质谱仪(mass cytometry)是利用质谱技术对单细胞进行多参数检测的流式技术^[16], 其核心原理在于利用过渡金属元素作为示踪标记物替代传统荧光基因, 通过金属螯合物对抗体进行特异性标记, 使标记抗体与靶细胞表面抗原发生特异

性结合, 随后由进样器及加热雾室将细胞悬液样本转化为单细胞液滴引入电感耦合等离子体质谱(ICP-MS), 从而对金属同位素进行检测分析, 进而实现单细胞水平蛋白质组分的定性与定量分析。目前, 由 Standard BioTools 公司研发的 Helios 等系列产品占据国际流式质谱技术领域的领先地位。近年来, 我国学者利用该技术在慢性移植物抗宿主疾病^[17]、白血病^[18]、肝癌^[19]、心血管疾病^[20]等研究领域取得重要进展。然而, 国内流式质谱仪研发仍处于起步阶段, 仅有浙江普罗亭、上海宸安生物、杭州谱康医学科技等少数企业开展相关研发工作。

本文将系统阐述一款自主研发的单细胞分析用流式质谱仪, 详细描述仪器的结构与组成, 并对检出限、灵敏度、质量分辨率、长期质量稳定性、细胞表面标志物检测准确性及细胞分群能力等关键性能参数进行全面表征。

1 仪器设计

自制流式质谱仪示意图示于图 1, 主要由进样系统、加热雾室、ICP 离子源、离子传输系统、飞行时间质量分析器及信号采集与处理系统等核心组件构成。具体工作流程为: 带有稀土金属元素标签的细胞样本通过进样装置引入加热雾室, 在雾室中, 细胞表面的大部分水分被蒸发干

干燥。干燥后的细胞随后进入 ICP 离子源, 在离子源中经历去溶、原子化和离子化过程, 最终生成金属离子、电子及中性粒子等电离产物。电离产物通过三锥接口进入质谱仪, 锥后端设计有 1 个四极偏转器来实现正离子与电子以及中性粒子的分离, 从而消除电子和中性粒子的干扰。鉴于流式质谱所使用的金属标签通常为稀土元

素和过渡金属元素, 其质量范围集中在 75~210 u 之间, 因此经过四极偏转器的离子流进入 1 组四极杆进行离子选择性传输。为进一步提升仪器分辨率, 在四极杆结构后设计了 1 个双四极结构, 实现了离子束的整形, 确保离子束以较小的位置分散进入质量分析器, 从而获得更高的质谱分辨性能。

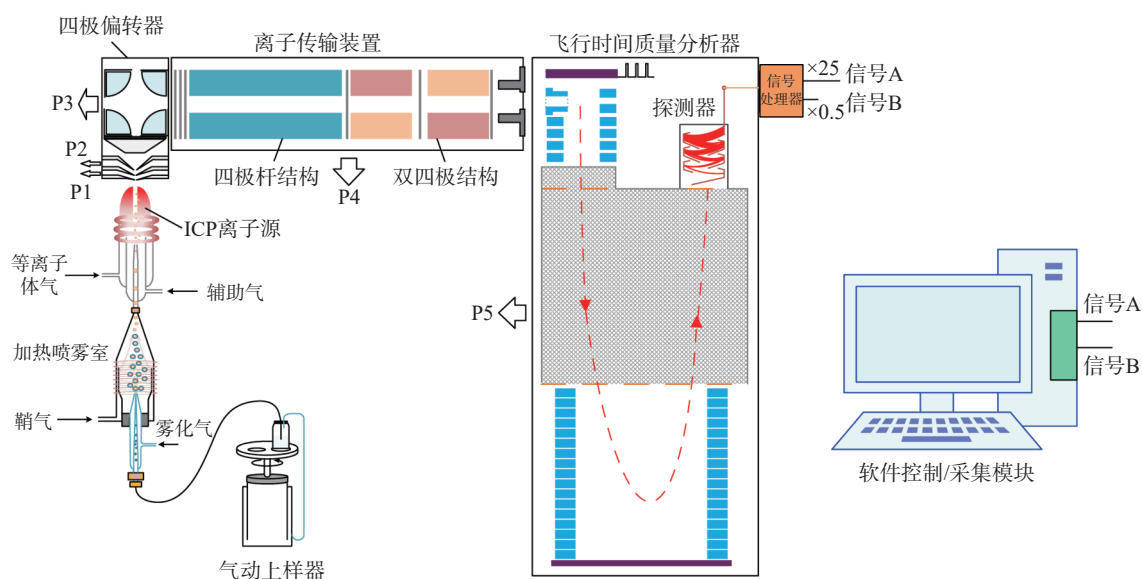


图1 自主研发的流式质谱仪示意图

Fig. 1 Schematic diagram of self-developed mass cytometry

1.1 真空系统

仪器的真空系统通过 1 个三锥接口将其与大气压分隔开, 共分为五级真空。第一级真空采用 1 个转速为 42 m³/h (Leybold, SV 40 BI) 的油封旋转泵作为接口泵; 第二、三、四级真空采用 1 个三级涡轮分子泵 (Leybold, TURBOVAC 350-400 i) 抽真空; 第五级真空采用 1 个转速为 250 L/s (Leybold, TURBOVAC 250 i) 的涡轮分子泵抽真空。其中, 选用 1 个抽速为 9.7 m³/h (Edwards, rv8) 的油封旋转泵作为三级涡轮分子泵和第五级涡轮分子泵的前级泵。五级真空度分别维持在 $P_1=300$ Pa、 $P_2=3$ Pa、 $P_3=4\times 10^{-2}$ Pa、 $P_4=4\times 10^{-4}$ Pa、 $P_5=4\times 10^{-5}$ Pa 左右。

1.2 进样系统及离子源

进样系统采用气动进样, 样品以 30 μ L/min 的速度进入雾化器。在雾化气驱动下, 样品溶液在雾化器尖端形成锥角气溶胶喷雾进入加热雾室。雾室恒温 (190 \pm 10) $^{\circ}$ C, 实现样品气溶胶的快

速干燥。鞘气以适宜流速 (通常 0.45~0.75 L/min) 沿雾室内壁切向通入。该设计可有效抑制细胞因重力沉降或湍流扩散导致的壁碰撞损失, 从而提升细胞的传输效率。

采用 ICP 电离源, 通过射频发生器的电磁耦合作用维持高温等离子体的稳定^[21], 所使用的气体通常为氩气。ICP 离子源示意图示于图 2, 氩气通入三层石英炬管, 最外层是冷却气, 流速为 15 L/min 左右; 中间层为辅助气, 最中间气体为

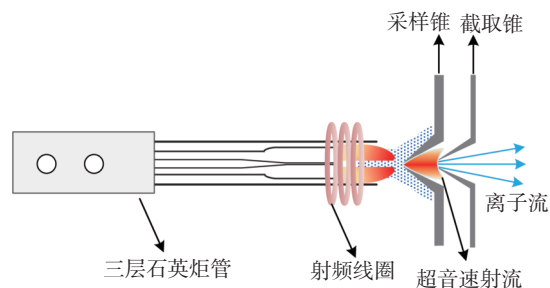


图2 ICP 离子源示意图

Fig. 2 Schematic diagram of ICP ion source

中心气,流速均为 1 L/min 左右。自研的流式质谱仪冷却气流速为 13 L/min,辅助气流速在 0.5~2 L/min 范围内可调;中心气流速为雾化气和鞘气的加和,雾化气流速在 0~0.6 L/min 范围内可调,鞘气流速在 0~2 L/min 范围内可调。

1.3 离子传输系统

离子传输系统由静电四极偏转器、四极杆质量过滤器和离子束整形器组成。样品经离子源电离后,除生成目标离子外,还产生大量次级粒子,包括电子、中性粒子及基体离子。高密度电子会通过空间电荷效应扰乱目标离子传输,导致灵敏度下降及信号波动;同时,电子撞击检测器会产生与离子信号相似的伪脉冲电流,形成本底噪声。中性粒子撞击检测器引发的二次电子放大效应进一步加剧了背景噪声。基体离子包括 Ar^+ 、 ArO^+ 、 ArC^+ 、 ArN^+ 、 ArH^+ 、 Ar_2^+ 等,其浓度显著高于目标离子,通常可达数个数量级。这些离子的存在大大缩短了探测器的使用寿命,同时也降低了仪器灵敏度。为实现仪器高灵敏度的要求和保护探测器,需要有效消除次级粒子干扰。首先,利用静电四极偏转器的电场对不同极性的带电粒子具有相反的偏转作用,实现正离子与电子以及中性粒子的分离;随后,利用四极杆“质量截断”和“共振激发”的特性,有效去除质量数低于 75 的基体离子,并衰减质量数为 80 的 Ar_2^+ 。离子经四极杆质量过滤器筛选后进入离子束整形器,该系统采用双四极杆静电透镜组对离子束进行空间聚焦和形态调控,通过优化电场分布将离子束压缩为薄层状准直束流,有效降低了离子在传输过程中的空间位置分散和发散角分布,从而减小离子进入飞行时间质量分析器时的初始空间和角度分散度,最终实现质谱分辨率的提升。

自制的流式质谱仪中,四极杆质量过滤器采用射频方波(820 kHz)与正弦波(410 kHz)复合电场的加电方式,示于图 3。通过精确调控射频电压实现双重功能:其一,选择性剔除 $m/z < 70$ 的低质量离子;其二,基于偶极共振技术有效衰减基体干扰离子 $^{40}\text{Ar}_2^+$ 。该加电模式不仅确保了目标离子的高效传输,同时显著降低了基体干扰,有效延长了探测器的使用寿命。

其中,射频方波驱动四极杆与传统的正弦波驱动类似,都具有相似稳定区,但边界条件有所

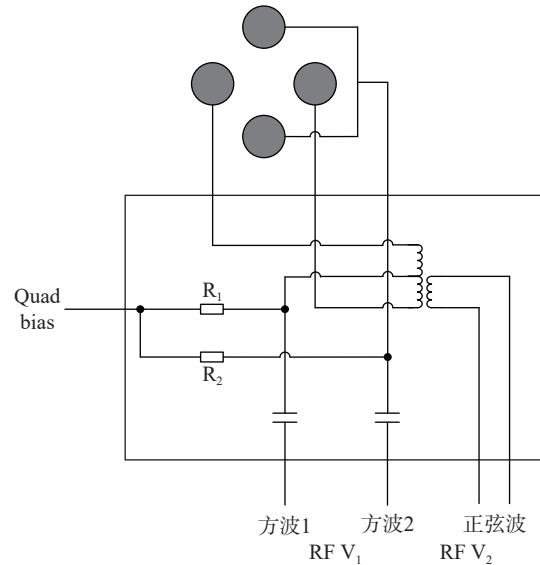


图 3 四极杆加电方式

Fig. 3 Electrical connection to the quadrupole

差异。研究表明^[22],占空比为 50%的方波驱动四极杆的第一稳定区图示于图 4。根据 $q=4eV/m\omega^2r_0^2$,当场半径 r_0 和频率固定时,增加电压值 V ,使得离子在 $q=0.7125$ 的边界按照质量数从小到大被剔除。因此,可以通过调节电压值剔除质量数 70 以下的离子。Konenkov 等^[23]研究表明,通过施加辅助四极激发的方式可以使第一稳定区分裂成多个小的稳定区,即第一稳定区中引入了不稳定区,使得存在多个可用于离子过滤的工作点。同时,共振射频幅值越大,稳定区中出现不稳定区域的面积越大。因此,通过精确调控辅助射频电压参数,可在 m/z 80 附近构建选择性窄带不稳定区,诱导原本处于稳定区的 $^{40}\text{Ar}_2^+$ 离子发生动力学失稳,从而实现对该双电荷氩离子干扰峰的高效滤除。

1.4 质量分析器和探测器

本研究采用垂直引入式飞行时间质量分析器(Orthogonal-TOF MS),其脉冲排斥频率达

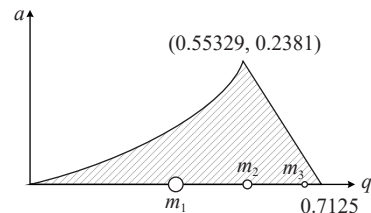


图 4 50%占空比的方波驱动四极杆第一稳定区示意图
Fig. 4 Schematic diagram of the first stable region of a quadrupole driven by a square wave with 50% duty

100 kHz。与四极杆、离子阱等质量分析器相比, TOF MS 具有瞬时全谱采集能力, 可同时检测所有质量数的离子并生成完整质谱图; 相较于轴向 TOF, 正交式设计可有效消除离子初始动能分散, 显著提升分辨率。离子经质量分析后由探测器(ETP Ion Detect™)接收, 检测信号经双通道处理: 通道 1 增益 25 倍, 通道 2 衰减 50%, 实现动态范围扩展。

1.5 信号采集与数据处理

采用 8 bit、1 GSa/s 的双通道数据采集系统对信号处理器输出进行同步采集。系统实时记录脉冲时序、幅值信息及脉冲计数, 其中脉冲计数采用双模统计算法^[14]: 在低信号强度区间, 基于检测脉冲峰数实现离散脉冲计数; 在高信号强度区间, 基于检测脉冲积分强度得到模拟强度计数。通过绘制模拟强度计数与离散脉冲计数的关系图, 确定相关系数显著的区域($r^2 > 0.8$), 该区域范围内回归曲线的斜率即为双模转换系数, 将此系数乘以脉冲积分强度, 可在高信号水平下实现对脉冲计数的准确估算^[24]。

实验采集的信号经模数转换后生成原始集成质量数据(integrated mass data, IMD)文件, 该文件以矩阵形式存储每次脉冲周期中各质量通道的离子计数信息。为实现细胞水平分析, 需将 IMD 文件转换为流式细胞术标准(flow cytometry standard, FCS)文件格式。转换过程中, 依据预设事件阈值^[24](10~150 次脉冲/事件)对连续脉冲信号进行离散化处理, 剔除未检测到离子信号或超出事件长度范围的 IMD 数据区域, 并将符合阈值条件的信号整合为独立细胞事件。最终生成的 FCS 文件包含各事件中质量特异性离子通道的累积计数信息, 可通过 Flowjo、Cytobank 等专业分析软件进行后续的细胞群体解析。

2 结果与讨论

使用铯(Cs)、铽(Tb)、铱(Ir)3 种元素的单标溶液配制浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1 $\mu\text{g/L}$ 的混标溶液, 用来表征仪器的灵敏度和检出限; 使用 Tb、铋(Bi)2 种元素的单标溶液配制浓度为 0.5 $\mu\text{g/L}$ 的混标溶液, 用于表征质量稳定性; 分辨率的表征选取钇(Y)、铟(In)、钕(Nd)、Tb、铽(Tm)、Ir、Bi 几种金属元素配制浓度为 0.5 $\mu\text{g/L}$ 的混标溶液, 计算金属离子峰的分辨率(FWHM)。

为了得到所需浓度溶液, 首先将 1 000 mg/L 的单标溶液逐级稀释到 100 mg/L 和 10 $\mu\text{g/L}$, 使用 10 $\mu\text{g/L}$ 的单标溶液作为母液配制所需浓度的混标溶液。

采用细胞质控品(贝克曼库尔特股份有限公司产品)作为参照, 细胞质控品中所含靶标蛋白及其占比列于表 1。利用自制的流式质谱仪检测相应金属标签及其信号强度, 从而实现对目标蛋白表达水平的间接定性与定量分析。基于已知的标准值, 通过与仪器检测值对比来表征仪器检测细胞表面标志物的准确性。

表 1 金属标志物对应的蛋白
Table 1 Proteins corresponding to metal markers

蛋白 Protein	金属标志物 Metal marker	标准值 Standard value/%
CD3	¹¹⁵ In	73±9
CD4	¹⁹⁷ Au	47±9
CD8	¹⁹⁸ Pt	25±6
CD19	¹⁴⁸ Nd	14±5
CD56	¹⁴¹ Pr	10±4

为进一步表征仪器检测单细胞蛋白的准确性, 同时使用 Helios 仪器和自制仪器检测人外周血免疫细胞中各蛋白的表达, 通过生物信息学分析得到细胞分群的数量及各群所含细胞数的占比情况, 并比较 2 台仪器结果的一致性。

2.1 检出限

使用 Cs、Tb、Ir 3 种元素表征仪器检出限。检出限公式为 $C_L = K \cdot S_b / M$, 其中 K 为置信因子, 一般取 2 或者 3; S_b 为背景标准偏差; M 为标准曲线在不同浓度范围内的斜率。在最优仪器参数下测试 0.2、0.4、0.6、0.8、1 $\mu\text{g/L}$ 5 种不同浓度的金属混标溶液, 每个浓度采集 1 min, 取平均值作为各元素不同浓度的测试值, 不同浓度的标准曲线示于图 5, 可得到 3 种元素在不同浓度范围内的斜率, 即 M 值。采集去离子水中 3 种元素的信号响应值作为背景值, 采集 1 min, 计算采集时间内 3 种元素的背景标准偏差。取 $K=3$, 测量结果列于表 2, Cs、Tb、Ir 的检出限分别为 0.4、0.2、0.04 ng/L, 表明该仪器具备超痕量分析的能力。

2.2 灵敏度

灵敏度反映了仪器对一定样品量的信号响应。灵敏度 $S = I/Q$, 其中, I 表示信号响应值, Q 表

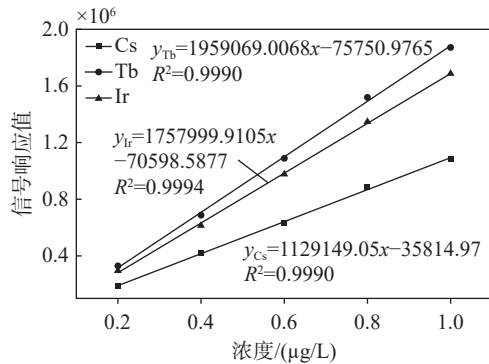


图5 不同浓度的标准曲线

Fig. 5 Standard curves of different concentrations

表2 检出限测量结果

Table 2 Measurement results of limits of detection

金属元素 Metal element	背景标准偏差 Background standard deviation (S_b)	标准曲线斜率 Calibration slope (M)	检出限 LOD/ (ng/L)
Cs	159	1129149	0.4
Tb	157	1959069	0.2
Ir	20	1758000	0.04

示进样量。图5反映了不同进样浓度下, Cs、Tb、Ir 3种元素信号响应的拟合值。在30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 进样流速下, 每张谱图集成4 s的采集强度, 0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ $^{159}\text{Tb}^+$ 的信号响应值约为 9×10^5 。在相同进样流速下, 国外商品化仪器的出厂灵敏度要求一般大于 6×10^5 cps/pg ($^{159}\text{Tb}^+$), 自制流式质谱仪的灵敏度能够达到这一指标, 完全满足应用需求。

2.3 分辨率

配制浓度为0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的Y、In、Nd、Tb、Tm、Ir、Bi混标溶液, 在最优仪器参数下测试混标溶液中各元素离子峰对应的分辨率。分辨率 $R = M/\Delta M$, 其中 ΔM 表示离子峰的半峰宽(FWHM), $^{40}\text{Ar}_2^+$ 、 $^{89}\text{Y}^+$ 、 $^{115}\text{In}^+$ 、 $^{142}\text{Nd}^+$ 、 $^{159}\text{Tb}^+$ 、 $^{169}\text{Tm}^+$ 、 $^{191}\text{Ir}^+$ 、 $^{209}\text{Bi}^+$ 的分辨率均大于550, 最高分辨率可达700, 示于图6, 表明自制的流式质谱仪具有良好的质量分辨率, 能够达到国外商品化仪器的同等水平。

2.4 质量稳定性

在最优仪器参数条件下, 进样测试0~8 h元素质量的变化, 每小时采集1次数据, 得到元素离子峰对应的质荷比。分别选取低($^{80}\text{Ar}_2^+$)、中($^{159}\text{Tb}^+$)、高($^{209}\text{Bi}^+$)3个质量元素, 不同质量元素8 h内的质量偏移量在0.02~0.1 u之间, 表明该流式质谱仪具有良好的质量稳定性。

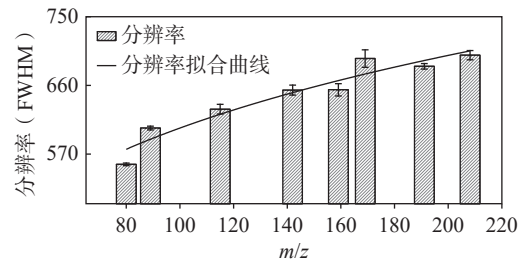


图6 分辨率测试结果

Fig. 6 Test results of resolution

2.5 细胞表面标志物准确性

以标准血样本为测试样品, 检测标准血细胞中表面标志物的准确性。将样本分为5份(编号为样本1~5), 重复实验5次, 采集得到IMD和FCS文件。单次排斥采集离子的实时状态示于图7a, 横坐标表示排斥次数, 纵坐标表示离子质量(即离子通道), 图中的点表示采集到的离子信号。细胞表面携带大量金属标签, 当细胞通过离子源时被电离产生的离子数量较多, 因此采集到的信号较密集, 而2个细胞间的离子信号较稀疏。样本1采集的数据示于图7a, 可知, 排斥数在150~650次范围内采集到4个单细胞数据。4个单细胞的IMD数据示于图7b, 反映了单个细胞的离子通道和强度信息, 即单个细胞所含对应蛋白的含量。第1个细胞的质谱图示于图7c, 反映了金属标签及其离子信号强度的关系。

Flowjo是一种广泛使用的流式细胞术分析软件包^[25]。将样本1的FCS文件用Flowjo软件打开, 根据抗体对应的金属种类选择横纵坐标, 以“Pseudocolor”和“Contour Plot”2种图片显示类型展示细胞分群结果, 示于图8。可知, 样本1中CD3+细胞的占比为70.0%, 以“Contour Plot”图片显示类型展示, 该类型以等高线的形式显示细胞密度分布, 用矩形圈门圈出CD3表达为阳性的细胞群, 即可得到CD3+细胞群的占比, 示于图8a。CD3+CD4+细胞的占比为46.2%, 以“Pseudocolor”图片显示类型展示, 该类型将细胞密度映射到1个颜色梯度上, 可清晰呈现细胞聚集情况, 同样用矩形圈门圈出CD3、CD4表达为阳性的细胞群, 即可得到CD3+CD4+细胞群的占比, 示于图8b。类似的, CD3+CD8+细胞的占比为24.6%, CD3-CD19+细胞的占比为10.9%, CD3-CD56+细胞的占比为9.9%, 分别示于图8c~8e。其余4个样本采用同样的方法进行分析, 结

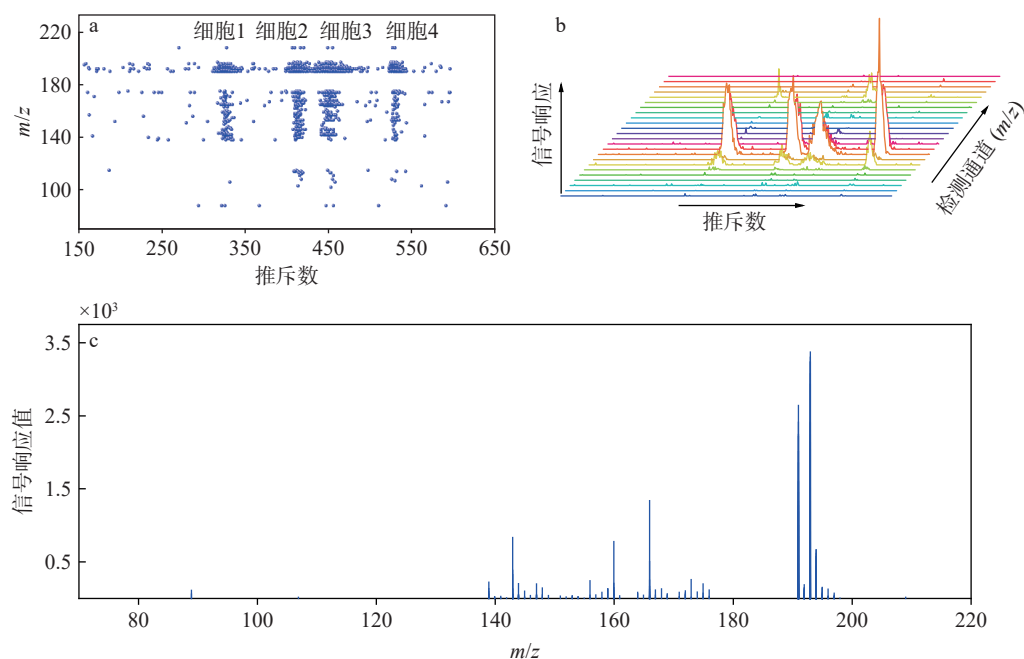


图7 采集离子实时状态(a), IMD数据(b), 第1个细胞质谱图(c)

Fig. 7 Collecting the real-time state of ions (a), IMD data (b), and the first cell mass spectrum (c)

果列于表3。细胞表面蛋白表达水平处于标准含量范围内,表明本文研制的流式质谱仪在检测细胞表面蛋白方面具有良好的准确性。

2.6 细胞分群

以人外周血作为样本,平行比较国外商品化

仪器与自制仪器对免疫细胞的分析性能。外周血样本经处理得到单细胞悬液,通过实验设计采用41种不同单一质量数金属标签标记的抗体对单细胞进行染色,最终获得结合金属标签的单细胞悬液。将相同样本一分为二,同时使用国外仪

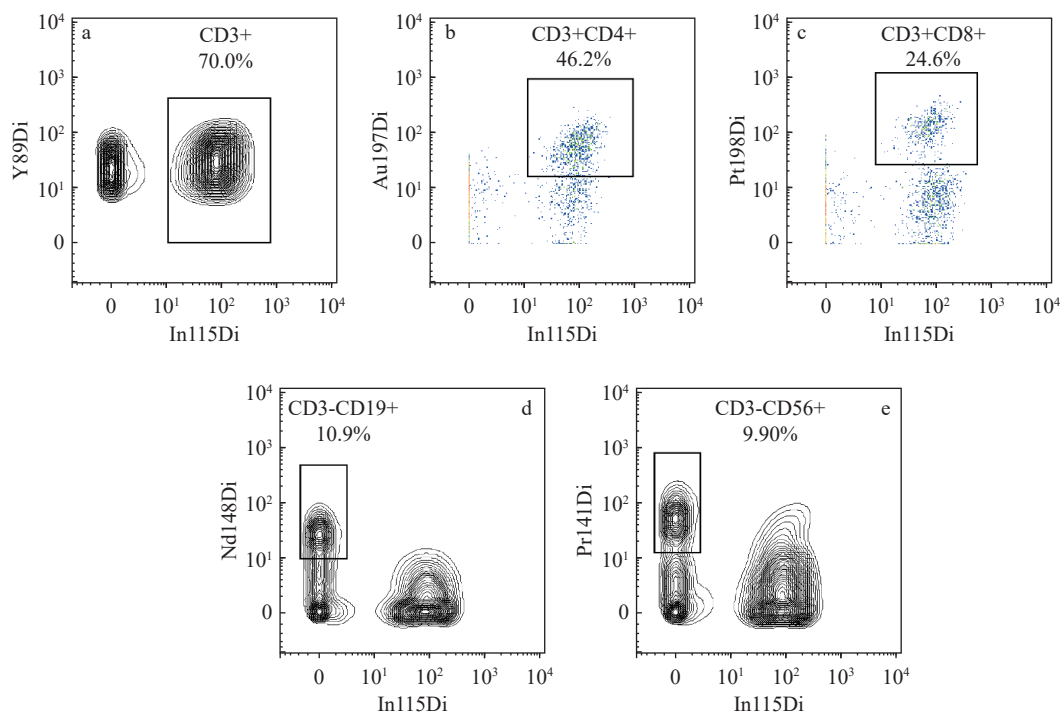


图8 样本1中表面标志物占比分析

Fig. 8 Analysis of the proportion of surface markers in sample 1

表3 细胞表面蛋白表达测试结果

Table 3 Test results of cell surface protein expression

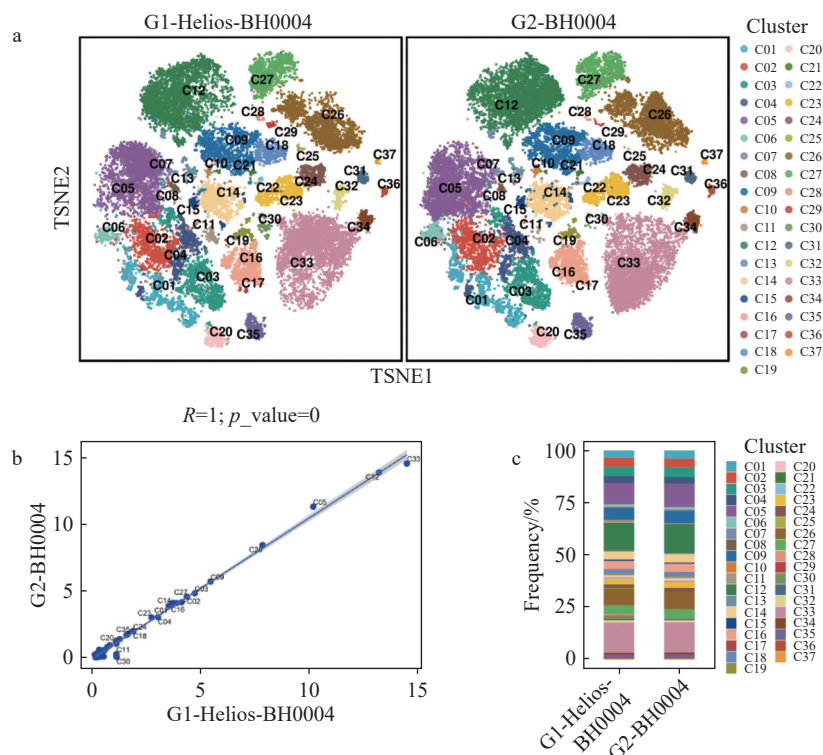
表面标志物 Surface marker	占比 Proportion/%					标准值 Reference value/%	测量值 Measured value/%	样本标准差 Sample standard deviation	变异系数 CV/%
	1	2	3	4	5				
CD3+	70.0	69.7	70.9	69.9	67.7	73±9	69.68	1.20	1.72
CD3+CD4+	46.2	47.0	47.5	46.0	43.3	47±9	46.00	1.63	3.54
CD3+CD8+	24.6	23.0	23.9	22.2	24.0	25±6	23.54	0.94	4.00
CD3-CD19+	10.9	11.0	12.1	12.8	12.5	14±5	11.86	0.87	7.32
CD3-CD56+	9.90	10.3	9.85	9.26	11.3	10±4	10.12	0.76	7.47

器 Helios 和自制仪器进样采集 15 万个细胞事件, 分别得到 FCS 文件, 命名为“G1-Helios-BH0004”“G2-BH0004”, FCS 文件包含每个细胞事件中 41 个检测通道的总集成离子计数。通过对数据进行 t-SNE 降维, 分析得到 37 个免疫细胞亚群, 分布情况示于图 9a, 可见, 2 台仪器对同一样本的免疫细胞分群分布具有高度一致性。进一步对 37 个免疫细胞亚群的细胞数进行 Pearson 相关性分析(图 9b), 并结合各亚群细胞占比的堆叠图(图 9c), 结果表明, 2 台仪器在免疫细胞

分群上表现出高度一致性。

2.7 与国外商品化仪器关键性能的对比

本研究研制的流式质谱仪与国外商品化仪器的对比结果列于表 4(信息来源于产品手册)。可见, 灵敏度和分辨率这 2 个关键性能指标已达到同类产品的同等水平。为进一步提升仪器的自动化水平与检测通量, 后续研发重点将聚焦于高通量全自动进样系统的开发。该系统的核心组件拟设计为集成式自动进样转盘, 其显著特征为可同时容纳并顺序处理多达 12 个独立样品管。



注: a. t-SNE 图; b. 亚群细胞数 Pearson 相关性分析图; c. 亚群占比堆叠图

图9 外周血测试数据生信分析结果图

Fig. 9 Results of analysis of peripheral blood test data

表4 国内外流式质谱仪关键性能对比

Table 4 Comparison of key performance of mass cytometry at home and abroad

机构/产品 Department/Product	进样模块 Sample introduction	成像模块 Imaging	灵敏度 Sensitivity ($^{159}\text{Tb}^+$)/(cps/pg)	分辨率 Resolution (FWHM)
Stand Bio Tools/Helios	单管/非自动	否	$>6\times 10^5$	>400
Stand Bio Tools/CyTOF XT	多管/全自动	是	$>6\times 10^5$	>400
自研仪器	单管/非自动	否	9×10^5	550~700

3 结论

本研究成功研制了1台国产化流式质谱仪。该仪器采用金属标签替代传统荧光基团,实现了超40个检测通道的多参数检测能力,为深入解析组织微环境、疾病发生机制和免疫反应过程提供了强有力的技术支持。通过采用多元金属标准溶液对仪器基本性能参数进行表征,自制流式质谱仪在灵敏度、分辨率等核心技术指标上均达到国外商品化仪器同等性能水平。此外,采用细胞质控品验证了自制仪器在细胞表面标志物检测中的高准确性。为进一步评估实际应用性能,以人外周血作为样本,将自制流式质谱仪与国外主流仪器 Helios 进行平行对比实验,2台仪器在免疫细胞分群方面具有高度一致性。本研究为流式质谱技术的国产化发展提供了技术支撑,同时为单细胞多参数分析提供了自主可控的技术平台。当前仪器已完成单细胞水平的功能验证,但在临床自动化诊治及高通量进样方面仍需优化,为此,后续将集成自动进样转盘模块以提升样本处理效率。通过持续升级自动化与通量性能,该仪器有望在疾病诊断、药物开发和免疫治疗等领域展现出广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] WANG D, BODOVITZ S. Single cell analysis: the new frontier in 'omics'[J]. *Trends in Biotechnology*, 2010, 28(6): 281-290.
- [2] WEERATUNGA P, DENNEY L, BULL J A, REPAPI E, SERGEANT M, ETHERINGTON R, VUPPUSSETTY C, TURNER G D H, CLELLAND C, WOO J, CROSS A, ISSA F, de ANDREA C E, MELERO BERMEJO I, SIMS D, McGOWAN S, ZURKE Y X, AHERN D J, GAMEZ E C, WHALLEY J, RICHARDS D, KLENERMAN P, MONACO C, UDALOVA I A, DONG T, ANTANAVICIUTE A, OGG G, KNIGHT J C, BYRNE H M, TAYLOR S, HO L P. Single cell spatial analysis reveals inflammatory foci of immature neutrophil and CD8 T cells in COVID-19 lungs[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 7 216-7 235.
- [3] ZHAO S, CHEN D P, FU T, YANG J, MA D, ZHU X, WANG X, JIAO Y, JIN X, XIAO Y, XIAO W, ZHANG H, LV H, MADABHUSHI A, YANG W, JIANG Y, XU J, SHAO Z. Single-cell morphological and topological atlas reveals the ecosystem diversity of human breast cancer[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 6 796-6 817.
- [4] WANG Y, XU B, XUE L. Applications of CyTOF in brain immune component studies[J]. *Engineering*, 2022, 16: 187-197.
- [5] 韦连心, 潘立鑫, 胡嘉欣, 李枝键, 陆钦晨, 王玺, 冯超, 向邦德, 王秋雁, 陶玉婷. 基于质谱流式技术研究 HBV 和非 HBV 相关肝癌的免疫微环境[J]. *广西医科大学学报*, 2021, 38(5): 929-935.
WEI Lianxin, PAN Lixin, HU Jiabin, LI Zhijian, LU Qinchen, WANG Xi, FENG Chao, XIANG Bangde, WANG Qiuyan, TAO Yuting. Study on the immune microenvironment in HBV and non-HBV related with hepatocellular carcinoma based on mass cytometry[J]. *Journal of Guangxi Medical University*, 2021, 38(5): 929-935(in Chinese).
- [6] 田红娟, 张任乐, 乔艳红, 张登霞, 刘蓓. 新型单细胞分析技术——质谱流式细胞术在白血病治疗中的应用[J]. *肿瘤防治研究*, 2021, 48(2): 5.
TIAN Hongjuan, ZHANG Renle, QIAO Yanhong, ZHANG Dengxia, LIU Bei. The application of a novel single-cell analysis technique-mass spectrometry flow cytometry in the treatment of leukemia[J]. *Research on Cancer Prevention and Treatment*, 2021, 48(2): 5(in Chinese).
- [7] BENDALL S C, SIMONDS E F, QIU P, AMIR E D, KRUTZIK P O, FINCK R, BRUGGNER R V, MELAMED R, TREJO A, ORNATSKY O I, BALDERAS R S, PLEVIRITIS S K, SACHS K, PE'ER D, TANNER S D, NOLAN G P. Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a

- human hematopoietic continuum[J]. *Science*, 2011, 332(6 030): 687-696.
- [8] GRAF T, STADTFELD M. Heterogeneity of embryonic and adult stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(5): 480-483.
- [9] CAI L, FRIEDMAN N, SUNNEY XIE X. Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level[J]. *Nature*, 2006, 440(7 082): 358-362.
- [10] 刘子辉. 基于 ICP-MS 的单细胞元素分析研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
- [11] GIVAN A L. Flow cytometry: an introduction[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2011, 699: 1-29.
- [12] IYER A, HAMERS A A J, PILLAI A B. CyTOF[®] for the masses[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 815-828.
- [13] TANNER S D, BANDURA D R, ORNATSKY O, BARANOV V I, NITZ M, WINNIK M A. Flow cytometer with mass spectrometer detection for massively multiplexed single-cell biomarker assay[J]. *Pure and Applied Chemistry*, 2008, 80(12): 2 627-2 641.
- [14] BANDURA D R, BARANOV V I, ORNATSKY O I, ANTONOV A, KINACH R, LOU X, PAVLOV S, VOROBIEV S, DICK J E, TANNER S D. Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(16): 6 813-6 822.
- [15] TANNER S D, BARANOV V I, ORNATSKY O I, BANDURA D R, GEORGE T C. An introduction to mass cytometry: fundamentals and applications[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2013, 62(5): 955-965.
- [16] ATKURI K R, STEVENS J C, NEUBERT H. Mass cytometry: a highly multiplexed single-cell technology for advancing drug development[J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 2015, 43(2): 227-233.
- [17] 高阳. 基于单细胞质谱流式技术研究慢性移植抗宿主病患者的免疫图谱[D]. 广州: 南方医科大学, 2019.
- [18] 郭元成, 刘蓓. 质谱流式细胞术: 急性髓系白血病精准诊疗的新热点[J]. *兰州大学学报(医学版)*, 2022, 48(1): 81-84.
- GUO Yuancheng, LIU Bei. Mass flow cytometry: a new hot spot in accurate diagnosis and treatment of acute myeloid leukemia[J]. *Journal of Lanzhou University (Medical Edition)*, 2022, 48(1): 81-84(in Chinese).
- [19] 解文韬. 基于质谱流式技术的肝癌肝移植免疫特征谱构建及移植后肿瘤复发的人工智能预测研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2021.
- [20] 钟淑涵. 基于质谱流式技术的小鼠心肌梗死免疫调控网络研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2021.
- [21] JARVI K E. 电感耦合等离子体质谱手册[M]. 尹明, 李冰, 译. 北京: 原子能出版社, 1997.
- [22] 范荣荣. 真空紫外单光子电离源-数字线性离子阱的性能表征及改进[D]. 上海: 上海大学, 2014.
- [23] KONENKOV N V, COUSINS L M, BARANOV V I, SUDAKOV M Y. Quadrupole mass filter operation with auxiliary quadrupolar excitation: theory and experiment[J]. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2001, 208(1/2/3): 17-27.
- [24] OLSEN L R, LEIPOLD M D, PEDERSEN C B, MAECKER H T. The anatomy of single cell mass cytometry data[J]. *Cytometry Part A*, 2019, 95(2): 156-172.
- [25] BENDALL S C, NOLAN G P, ROEDERER M, CHATTOPADHYAY P K. A deep profiler's guide to cytometry[J]. *Trends in Immunology*, 2012, 33(7): 323-332.

(收稿日期: 2025-06-12; 修回日期: 2025-07-18)