

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2015 年 3 月 26 日 (26.03.2015)



(10) 国际公布号
WO 2015/039425 A1

- (51) 国际专利分类号:
G01N 15/14 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2014/074474
- (22) 国际申请日: 2014 年 3 月 31 日 (31.03.2014)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201310429336.5 2013 年 9 月 18 日 (18.09.2013) CN
- (71) 申请人: 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司 (SHENZHEN MINDRAY BIO-MEDICAL ELECTRONICS CO., LTD) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园区科技南十二路迈瑞大厦, Guangdong 518057 (CN)。北京迈瑞医疗电子技术研究院有限公司 (BEIJING SHEN MINDRAY MEDICAL ELECTRONICS TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市海淀区上地信息产业基地创业路 8 号群英科技园 5 号楼三层, Beijing 100085 (CN)。

- (72) 发明人: 胡鹏 (HU, Peng); 中国北京市海淀区上地信息产业基地创业路 8 号群英科技园 5 号楼三层, Beijing 100085 (CN)。雷霆 (LEI, Ting); 中国北京市海淀区上地信息产业基地创业路 8 号群英科技园 5 号楼三层, Beijing 100085 (CN)。赵玉梅 (ZHAO, Yumei); 中国北京市海淀区上地信息产业基地创业路 8 号群英科技园 5 号楼三层, Beijing 100085 (CN)。谭伟峰 (TAN, Weifeng); 中国北京市海淀区上地信息产业基地创业路 8 号群英科技园 5 号楼三层, Beijing 100085 (CN)。

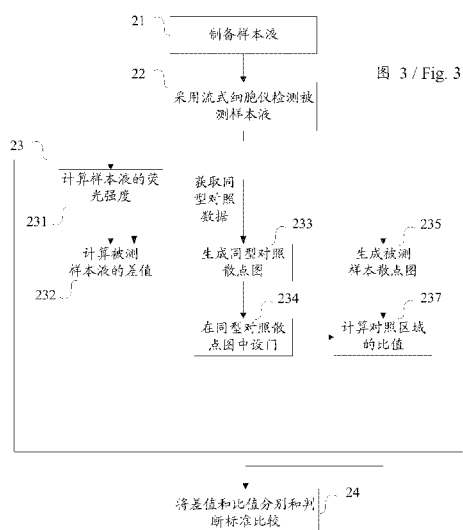
- (74) 代理人: 广州华进联合专利商标代理有限公司 (ADVANCE CHINA IP LAW OFFICE); 中国广东省广州市天河区花城大道 85 号 3901 房, Guangdong 510623 (CN)。

- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,

[见续页]

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR TESTING SEX OF SAMPLE, AND JUDGMENT STANDARD DETERMINATION METHOD

(54) 发明名称: 检测样本阴阳性的设备、方法及判断标准的确定方法



21 PREPARING SAMPLE LIQUID
22 EMPLOYING FLOW CYTOMETRY (FCM) TO TEST SAMPLE LIQUID
23 ACQUIRING HOMOTYPE REFERENCE DATA
24 RESPECTIVELY COMPARING A DIFFERENCE AND A SPECIFIC VALUE WITH A JUDGMENT STANDARD
231 CALCULATING THE FLUORESCENCE INTENSITY OF THE SAMPLE LIQUID
232 CALCULATING THE DIFFERENCE OF THE TEST SAMPLE LIQUID
233 GENERATING A HOMOTYPE REFERENCE SCATTER DIAGRAM
234 GATING THE HOMOTYPE REFERENCE SCATTER DIAGRAM
235 GENERATING A TEST SAMPLE SCATTER DIAGRAM
237 CALCULATING THE SPECIFIC VALUE OF A REFERENCE AREA

(57) Abstract: A method for determining a judgment standard for judging the sex of an unknown sample, method for improving the testing accuracy of a cell surface antigen expression, and device for testing the sex of a sample; mixing the test sample liquid with fluorescent testing reagent to obtain dyed test sample liquid; employing flow cytometry (FCM) to test the test sample liquid so as to obtain the fluorescence intensity of the test sample liquid; calculating the difference between the fluorescence intensity of the test sample liquid and a homotype reference fluorescence intensity; comparing the difference with a preset fluorescence critical value, and determining the expression of the cell surface antigen according to the comparison result. The determination of a proper fluorescence critical value reduces the interference of nonspecific combination on a test result, and improves the test accuracy of HLA-B27 antigen expression.

(57) 摘要: 一种用于判断未知样本阴阳性的判断标准的确定方法、提高细胞表面抗原表达检测准确性的方法以及检测样本阴阳性的设备, 将被测样本液与荧光检测试剂混合处理, 得到染色后的被测样本液, 采用流式细胞仪检测被测样本液, 得到被测样本液的荧光强度, 计算被测样本液的荧光强度与同型对照的荧光强度的差值, 将差值与预设的荧光临界值进行比较, 根据比较结果判断细胞表面抗原的表达。通过确定适合的荧光临界值减少了非特异性结合对检测结果的干扰, 提高了检测 HLA-B27 抗原

表达的准确性。



QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD,
TG)。

- (84) **指定国** (除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

说明书

检测样本阴阳性的设备、方法及判断标准的确定方法

技术领域

本申请涉及未知样本抗原表达阴阳性检测，尤其涉及一种用于判断未知样本中抗原表达阴阳性的判断标准的确定方法、提高细胞表面抗原表达检测准确性的方法以及检测样本阴阳性的设备。

背景技术

人类白细胞表面抗原（Human Leukocyte Antigen, HLA）是人类主要组织相容性复合体（Major Histocompatibility Complex, MHC）的表达产物，在免疫系统中主要负责细胞之间的相互识别和诱导免疫反应，调节免疫应答的功能。根据HLA结构、功能和组织分布的不同可分为三类：I类分子为HLA-A、HLA-B及HLA-C系列抗原，其广泛分布于各组织有核细胞表面；II类分子为HLA-DR、HLA-DP及HLA-DQ系列抗原，其主要在B淋巴细胞和抗原呈递细胞上表达；III类分子为补体成分。

HLA-B27抗原属于I型MHC，基本上表达在机体所有有核细胞上，尤其是淋巴细胞表面含量丰富，在临床研究上需要测量白细胞表面HLA-B27抗原的表达。HLA-B27抗原属于B7交叉反应族（Cross-reaction Group HLA-B7, CREG HLA-B7）成员，B7交叉反应族成员包括HLA-B27、HLA-B7、HLA-B42、HLA-B22、HLA-B40以及HLA-B13等一系列抗原。HLA-B27抗原对应的HLA-B27单克隆抗体均可与B7交叉反应族成员有不同程度的交叉反应。

目前，HLA-B27抗原表达水平检测的方法主要有：补体依赖的细胞毒试验（Complement dependent cytotoxicity, CDC）、酶联免疫测定试验（Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay, ELISA）、聚合酶链式反应检测法（Polymerase Chain Reaction, PCR）以及流式细胞法（Flow Cytometry, FCM）。FCM因其无需分离淋巴细胞，操作简单且具有很高的灵敏度和特异性，因此被广泛使用。

FCM主要是利用荧光标记的HLA-B27抗原对应的单克隆抗体，与淋巴细胞

表面的 HLA-B27 抗原结合,使淋巴细胞发出一定的荧光,这种荧光的荧光强度值可被流式细胞仪测定,通过所测定的荧光强度值的高低判断淋巴细胞表面是否存在 HLA-B27 抗原,从而判断样本的阴阳性。一种采用 FCM 检测 HLA-B27 抗原表达的方案是:采用 FITC-HLA-B27/PE-CD3 双色试剂和样本反应,通过流式细胞仪分析 CD3 阳性细胞 FITC 通道荧光值的强弱,将荧光值的中位值和试剂瓶上预设的临界值比较来判定样本的阴阳性,该方法操作较简单,但结果有时不够准确。

发明内容

基于此,有必要提供一种能提高细胞表面抗原表达检测结果的准确性的用于判断未知样本阴阳性的判断标准的确定方法、提高细胞表面抗原表达检测准确性的方法以及检测样本阴阳性的设备。

一种用于判断未知样本阴阳性的判断标准的确定方法,包括:

将多个试验样本分别和荧光检测试剂混合处理,得到各自对应的试验样本液,所述多个试验样本针对于感兴趣抗原已知被确定为阴性或阳性,所述荧光检测试剂中包括采用第一荧光物质标记的与感兴趣抗原对应的抗体;

采用流式细胞仪检测各试验样本液中各细胞发出的第一荧光物质的荧光信号,获得第一荧光强度值;

根据所述试验样本液中感兴趣细胞的第一荧光强度值,计算该试验样本液的荧光强度;

计算所述试验样本液的荧光强度与同型对照的荧光强度的差值;

根据试验样本的已知的阴阳性,从多个试验样本的差值中确定出一个最合适值作为判断未知样本阴阳性的荧光临界值。

一种提高细胞表面抗原表达检测准确性的方法,包括:

将被测样本与荧光检测试剂混合处理,得到染色后的被测样本液,荧光检测试剂中包括采用第一荧光物质标记的与感兴趣抗原对应的抗体;

采用流式细胞仪检测被测样本液,检测被测样本液中各细胞发出的第一荧光物质的荧光信号,获得第一荧光强度值;

根据被测样本液中感兴趣细胞的第一荧光强度值计算被测样本液的荧光强度；及

计算被测样本液的荧光强度与同型对照的荧光强度的差值，所述差值用于与预设的荧光临界值进行比较。

一种用于检测细胞表面抗原表达的设备，包括：

样本液制备系统，用于将被测体液样本与荧光检测试剂混合处理，得到染色后的被测样本液，荧光检测试剂中包括采用第一荧光物质标记的与感兴趣抗原对应的抗体；

流式细胞仪，用于检测被测样本液，所述流式细胞仪检测被测样本液中各细胞发出的第一荧光物质的荧光信号，获得第一荧光强度值；及

数据处理系统，用于接收流式细胞仪输出的数据，根据被测样本液中感兴趣细胞的第一荧光强度值计算被测样本液的荧光强度，计算被测样本液的荧光强度与同型对照的荧光强度的差值，所述差值用于与预设的荧光临界值进行比较。

在上述用于判断未知样本阴阳性的判断标准的确定方法、提高细胞表面抗原表达检测准确性的方法以及检测样本阴阳性的设备中，可确定一个适合的值作为荧光临界值，减少了非特异性结合对检测结果的干扰，提高了对 HLA-B27 抗原表达检测结果的准确性。

附图说明

为了更清楚地说明本发明实施例，下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其他的附图。

图 1 为一实施方式的检测细胞表面抗原表达设备的结构示意图；

图 2 为一实施方式的确定判断标准的流程图；

图 3 为一实施方式的检测细胞表面抗原表达的流程图；

图 4 为被测样本 1 的散射光的散点图；

图 5 为被测样本 1 的同型对照散点图；

图 6 为被测样本 1 的被测样本散点图；
图 7 为被测样本 2 的散射光的散点图；
图 8 为被测样本 2 的同型对照散点图；及
图 9 为被测样本 2 的被测样本散点图。

具体实施方式

以下说明提供了用于完全理解各个实施例以及用于本领域的技术人员实施的特定细节。然而，本领域的技术人员应该理解，无需这样的细节亦可实践本发明。在一些实例中，为了避免不必要地混淆对实施例的描述，没有详细示出或描述公知的结构和功能。除非上下文清楚地要求，否则，贯穿本说明书和权利要求，用语“包括”、“包含”等应以包含性的意义来解释而不是排他性或穷尽性的意义，即，其含义为“包括，但不限于”。在本详细描述部分中，使用单数或复数的用语也分别包括复数或单数。

细胞表面抗原通常分布于各组织中的有核细胞表面，通过分析发现，荧光标记的单克隆抗体与淋巴细胞表面 HLA-B27 抗原存在非特异性结合，而这种非特异性结合对 HLA-B27 抗原的阳性或阴性的判断会造成干扰，例如，某些淋巴细胞表面 HLA-B27 抗原真实呈阴性，而由于上述非特异性结合，使得这些淋巴细胞表面 HLA-B27 抗原检测为阳性，从而降低了白细胞表面抗原检测的准确度。本申请实施例中，采用流式细胞法判断细胞表面抗原的表达。在一实施方式中，这种采用流式细胞法来检测细胞表面抗原表达的设备的结构示意图如图 1 所示，可包括样本液制备系统 101、流式细胞仪和数据处理系统 104，样本液制备系统 101 用于将被测体液样本与荧光检测试剂混合处理，得到染色后的被测样本液。流式细胞仪用于检测被测样本液，流式细胞仪通常包括光检测单元 102 和流动室 103，被测样本液在鞘液的裹挟下以单细胞方式通过流动室 103 的检测区域，光检测单元 102 用于收集各细胞粒子发出的光。光检测单元 102 包括至少一个检测通道，其中包括荧光检测通道，荧光检测通道用于检测因细胞被荧光物质标记后发出的荧光。为了将不同荧光物质发出的荧光区别开来，荧光检测通道可以包括多个荧光检测通道，例如第一和第二通道，每个通道的滤光波段与其检测的荧光

物质的发光波段相同。样本液制备系统 101 制得的样本液可通过输送系统 105 输送到流式细胞仪的流动室 103。数据处理系统 104 用于接收流式细胞仪输出的数据，对数据进行处理。被测体液样本可以是血液，也可以是尿液等其它体液。在检测时通常以某一抗原为感兴趣抗原，判断被测样本针对于该感兴趣抗原的阴阳性。

下面以 HLA-B27 抗原为感兴趣抗原、以血液样本为例进行说明。

在一实施方式，用于判断未知样本阴阳性的判断标准的确定方法，判断标准包括荧光临界值和比值临界值。请参考图 2，其为确定判断标准的流程图。该方法包括以下步骤：

步骤 10，选择多个试验样本，该多个试验样本针对于 HLA-B27 抗原已知其阴阳性。将每个试验样本按照步骤 11-13 进行处理。为方便描述，在步骤 11-13 中只针对一个试验样本进行描述。

步骤 11，采用样本液制备系统将试验样本分别和荧光检测试剂混合处理，制成需要的试验样本液。荧光检测试剂中包括采用第一荧光物质标记的 HLA-B27 抗原的抗体（以下简称 HLA-B27 抗体）和采用第二荧光物质标记的与感兴趣抗原的干扰抗原对应的抗体（以下简称干扰抗体）。HLA-B27 抗体例如可以是单克隆抗体，第二荧光物质与第一荧光物质为不同发光波长的荧光素或荧光蛋白等荧光物质，例如，第一荧光物质为 FITC，第二荧光物质为 PE，或者第一荧光物质为 PE，第二荧光物质为 FITC。对于 HLA-B27 抗原来说，干扰抗原是与它同族的其它抗原，主要是 HLA-B7。当将荧光检测试剂和试验样本混合后，被荧光标记的 HLA-B27 抗体和 HLA-B27 抗原结合，被荧光标记的干扰抗体和干扰抗原（例如 HLA-B7 抗原）结合，因此携带有 HLA-B27 抗原和干扰抗原的白细胞被荧光物质染色，同时被荧光标记的 HLA-B27 抗体也与干扰抗原（例如 HLA-B7 抗原）发生交叉反应。通过清洗分离，将未与白细胞结合的标记物清除，得到染色后的试验样本液。

步骤 12，采用流式细胞仪检测试验样本液。当试验样本液通过流式细胞仪的流动室时，通过特定的荧光检测通道检测细胞因被荧光物质标记而发出的荧光。流式细胞仪的光检测单元根据后端光收集的需要可以包括多个光检测通道，多个

光检测通道的光检测器可以是各自独立，也可以是合一的。其中第一通道用于检测第一荧光物质发出的荧光，该通道的光检测器可检测的波长包括第一荧光物质的发光波长，以使被第一荧光物质标记的细胞发出的荧光可被第一通道收集，获得第一荧光强度值。第二通道用于检测第二荧光物质发出的荧光，该通道的光检测器可检测的波长包括第二荧光物质的发光波长，以使被第二荧光物质标记的细胞发出的荧光可被第二通道收集，获得第二荧光强度值。每个被荧光物质标记的细胞对应一个第一荧光强度值和一个第二荧光强度值。在本步骤中，除了检测细胞因被荧光物质标记而发出的荧光外，为了减少后续的数据处理量，还可以在本步骤中检测细胞因被光束照射而发出的散射光，因此，检测通道还包括散射光检测通道。在一种具体实例中，检测的散射光包括反映细胞体积大小的前向散射光和反映细胞内部复杂度的侧向散射光。流式细胞仪将检测的各种光信号转换为电信号传输给数据处理系统。

步骤 13，数据处理系统对流式细胞仪检测的各种数据进行处理，计算各样本液的差值和比值，所述比值为落入对照区域的细胞数与全部细胞数的比值，比值例如可以是一个百分比，或与百分比相等的小数。

差值的计算步骤包括：

步骤 131，根据第一荧光强度值计算该试验样本液的荧光强度。在计算样本液的荧光强度时，可根据该试验样本液中感兴趣细胞的第一荧光强度值来计算，感兴趣细胞可以是全部白细胞，也可以仅是淋巴细胞。因 HLA-B27 抗原尤其在淋巴细胞表面含量丰富，因此在一种较佳的实施例，可只根据淋巴细胞的第一荧光强度值计算该试验样本液的荧光强度，具体步骤包括：利用步骤 12 收集的散射光，对白细胞进行分类统计，识别出淋巴细胞，获取淋巴细胞的第一荧光强度值，根据这些淋巴细胞的第一荧光强度值计算该试验样本液的荧光强度。荧光强度可以是这些第一荧光强度值的平均值，也可以是这些第一荧光强度值的中位值。

步骤 132，计算试验样本液的差值。获取试验样本液的荧光强度与同型对照数据，同型对照数据中包括同型对照的荧光强度，同型对照的荧光强度可以是设备中预存的值，也可以是同型对照样本液的荧光强度。例如，将试验样本分成两

份，一份用于制备试验样本液，另一份用于制备同型对照样本液，即将荧光检测试剂的同型对照试剂和另一份试验样本混合处理后得到该试验样本液的同型对照样本液，采用流式细胞仪检测同型对照样本液得到同型对照样本液的各细胞的第一荧光强度值，根据同型对照样本液中感兴趣细胞的第一荧光强度值，计算同型对照的荧光强度。计算试验样本液的荧光强度与同型对照的荧光强度的差值作为该试验样本液的差值。

比值的计算步骤包括：

步骤 133，生成同型对照散点图。获取同型对照数据，同型对照数据中包括同型对照样本液中感兴趣细胞第一荧光强度值和第二荧光强度值，根据同型对照样本液中感兴趣细胞的第一荧光强度值和第二荧光强度值形成二维的同型对照散点图。该散点图为多个由第一荧光强度值和第二荧光强度值形成的二维数组的数据集合，或根据第一荧光强度值和第二荧光强度值形成的一个二维图，例如以第一荧光强度值为横坐标，第二荧光强度值为纵坐标，反之亦可，图中的每个点代表一个细胞。

步骤 134，在同型对照散点图中设门。设门是指设定一些条件，将符合某种条件的细胞归为一类，从而将细胞分类。本步骤中，通过比较第一荧光强度值的大小和第二荧光强度值的大小，使得预定比例的细胞分布在门限的指定区域。例如设定一个第一阈值和一个第二阈值，指定区域为第一荧光强度值小于第一阈值和第二荧光强度值小于第二阈值的区域，则第一阈值和一个第二阈值构成门限，该门限使落入该指定区域的细胞占散点图中全部细胞数的比例应满足预定比例，即该门限使落入该指定区域的细胞占散点图中全部细胞数的比例应是一个预定比例，或在该预定比例可接受的误差范围内，预定比例可以是一个根据实际要求预设的一个值，例如使落入该指定区域的细胞占散点图中全部细胞数的比例为 95% 或 98% 或 $98\% \pm 0.5\%$ 等。

步骤 135，生成试验样本散点图。获取试验样本液中感兴趣细胞的第一荧光强度值和第二荧光强度值，根据试验样本液中感兴趣细胞的第一荧光强度值和第二荧光强度值形成试验样本散点图。

步骤 137，在试验样本散点图中采用同样门限划分细胞群体，计算落入指定

区域的对照区域的细胞数占试验样本散点图中全部细胞数的比值。对照区域为在沿第一荧光强度值正向上不同于指定区域的区域，例如指定区域为第一荧光强度值小于第一阈值和第二荧光强度值小于第二阈值的区域，则对照区域为第一荧光强度值大于第一阈值和第二荧光强度值小于第二阈值的区域。当设定门限为十字门时，指定区域为十字门的左下象限，对照区域为十字门的右下象限。

步骤 14，将所有的试验样本的阴阳性以及各样本的差值和比值进行统计，根据试验样本的已知的阴阳性以及可接受的灵敏度和特异性标准，从多个试验样本中确定出一个样本的差值和比值作为判断未知样本阴阳性的荧光临界值和比值临界值。其中，可接受的灵敏度和特异性标准根据用户的要求和具体设备而确定。

在优选的具体实例中，在采用流式细胞仪检测试验样本液之前，先对流式细胞仪进行荧光值校准，调节流式细胞仪荧光检测通道的电压，将校准荧光微球在荧光检测通道显示的荧光值调整到校准值。

下面以一个实例进一步说明如何确定未知样本的 HLA-B27 阴阳性判断标准。

1、收集血液样本 348 例，其中阳性样本 182 例，阴性样本 166 例，检测数据如表 1 所示。将 HLA-B27 检测试剂（即用于检测 HLA-B27 抗原的荧光检测试剂）和血液样本混合，在室温下反应一段时间，对样本进行染色。

2、将染色后样本通过流式细胞仪检测。在检测样本之前对流式细胞仪进行校准，调节流式细胞仪第一通道 FL1 和第二通道 FL2 的通道电压，根据采用的第一荧光物质 FITC 和第二荧光物质 PE 的参数，将校准荧光微球在 FITC/PE 通道显示的荧光值调整到校准值。通过流式细胞仪检测样本时，通过前向散射光信号和侧向散射光信号，可以识别出样本中的淋巴细胞，收集该淋巴细胞 FL1 及 FL2 通道的荧光值信号。

3、根据各淋巴细胞 FL1 通道的荧光值信号，计算其中位值或平均值，得到该样本 FL1 通道的荧光强度。

4、计算各样本的差值 MFI(差值)，计算公式为：

$$\text{MFI(差值)} = \text{MFI(FITC-HLA-B27)} - \text{MFI(FITC-IgG2a)}$$

其中，MFI(FITC-HLA-B27) 为各样本液 FL1 通道的荧光强度，MFI(FITC-IgG2a) 为同型对照样本液的 FL1 通道的荧光强度。

5、通过同型对照设门，得到 FITC-HLA-B27/PE-HLA-B7 散点图十字门右下象限细胞占淋巴细胞的百分比 Q4。

6、统计以上结果，请参考表 1，表中，MFI_IgG2 为同型对照的荧光强度，MFI_B27 为样本的荧光强度，MFI(差值)为 MFI_B27 与 MFI_IgG2 的差值，Q4 为 FITC-HLA-B27/PE-HLA-B7 散点图十字门右下象限细胞占淋巴细胞的百分比。经过分析得知，当 MFI(差值) ≥ 540 且 Q4 $\geq 80\%$ 时，检测结果的假阳性和假阴性样本总数最低，检测结果如表 2 所示，敏感性=180/182=98.9%，特异性=166/166=100%，得到的 MFI(差值)和 Q4 值即为阴阳性判定的荧光临界值和比值临界值。

表 1

MFI_IgG	MFI_B27	Q4 %	MFI(差值)	样本的 阴阳性
17	2486	92.9	2469	阳性
19	2230	90	2211	阳性
19	1549	93.9	1530	阳性
17	1374	94.8	1357	阳性
19	1375	97	1356	阳性
17	1320	89.9	1303	阳性
15	1315	89.4	1300	阳性
18	1302	91.8	1284	阳性
19	1274	93.2	1255	阳性
14	1269	15.1	1255	阳性
17	1267	90.6	1250	阳性
17	1267	92.2	1250	阳性
17	1254	90.6	1237	阳性
17	1241	96.3	1224	阳性
18	1231	92.8	1213	阳性
16	1227	92	1211	阳性

17	1226	95.3	1209	阳性
19	1223	97.4	1204	阳性
17	1211	91.6	1194	阳性
17	1200	91.9	1183	阳性
19	1201	95.6	1182	阳性
16	1191	17.4	1175	阳性
19	1192	90.2	1173	阳性
17	1182	93.3	1165	阳性
19	1182	93.5	1163	阳性
18	1164	95.6	1146	阳性
16	1148	97	1132	阳性
19	1137	90.8	1118	阳性
16	1131	91.7	1115	阳性
19	1126	93.6	1107	阳性
19	1124	95.8	1105	阳性
20	1119	96	1099	阳性
17	1113	93.3	1096	阳性
21	1112	94.2	1091	阳性
15	1105	98.3	1090	阳性
15	1105	88.6	1090	阳性
19	1102	96.3	1083	阳性
17	1097	93.7	1080	阳性
15	1090	92.1	1075	阳性
16	1091	90.7	1075	阳性
14	1086	90.3	1072	阳性
19	1070	98.2	1051	阳性
17	1064	92.7	1047	阳性
17	1057	91.6	1040	阳性

17	1053	93.7	1036	阳性
18	1051	96.7	1033	阳性
18	1048	91.9	1030	阳性
16	1045	94	1029	阳性
17	1043	95	1026	阳性
18	1041	95.1	1023	阳性
17	1039	92	1022	阳性
17	1038	95.9	1021	阳性
18	1036	91	1018	阳性
16	1029	91.6	1013	阳性
14	1026	94.1	1012	阳性
16	1026	94.5	1010	阳性
16	1022	94	1006	阳性
15	1019	90.7	1004	阳性
16	1020	90.8	1004	阳性
15	1016	98.3	1001	阳性
18	1019	80	1001	阳性
16	1016	89.5	1000	阳性
16	1014	90.7	998	阳性
20	1016	94.9	996	阳性
18	1013	93.2	995	阳性
18	1007	97	989	阳性
15	1004	92.4	989	阳性
17	1005	97.9	988	阳性
21	1007	96	986	阳性
16	999	90.7	983	阳性
16	988	96.3	972	阳性
17	980	95	963	阳性

15	978	94.2	963	阳性
16	978	93.8	962	阳性
16	978	95.8	962	阳性
17	978	87.3	961	阳性
16	973	95.6	957	阳性
16	970	98.4	954	阳性
16	969	95.1	953	阳性
17	967	93.7	950	阳性
17	958	92.9	941	阳性
17	948	93.4	931	阳性
17	945	96.2	928	阳性
17	941	92.1	924	阳性
16	940	96	924	阳性
18	942	94.5	924	阳性
19	943	92.3	924	阳性
16	938	98.3	922	阳性
16	938	93.5	922	阳性
16	934	92.2	918	阳性
20	936	96	916	阳性
17	932	94.7	915	阳性
19	931	93.6	912	阳性
20	931	97.3	911	阳性
17	926	92.5	909	阳性
15	917	91.1	902	阳性
15	916	95.1	901	阳性
16	914	96.8	898	阳性
19	916	96.7	897	阳性
14	909	94.8	895	阳性

20	913	93.9	893	阳性
17	909	94.7	892	阳性
15	906	90.5	891	阳性
18	908	96.8	890	阳性
15	905	95.5	890	阳性
16	903	95	887	阳性
18	903	90.9	885	阳性
21	901	98.7	880	阳性
19	893	96.9	874	阳性
16	888	91.1	872	阳性
16	888	96.7	872	阳性
19	886	96.5	867	阳性
15	881	93.4	866	阳性
14	879	93	865	阳性
17	877	95.6	860	阳性
15	865	0.6	850	阴性
19	868	91.3	849	阳性
17	862	95.8	845	阳性
14	859	92.7	845	阳性
18	861	95.8	843	阳性
16	857	90	841	阳性
14	853	93.6	839	阳性
33	870	97.7	837	阳性
19	853	95	834	阳性
17	844	90.1	827	阳性
17	843	95.8	826	阳性
14	832	92.2	818	阳性
19	837	89.7	818	阳性

18	836	90	818	阳性
17	834	94.5	817	阳性
17	833	98.3	816	阳性
17	832	91.5	815	阳性
36	850	98.6	814	阳性
14	825	89.7	811	阳性
17	827	93.5	810	阳性
14	820	92.6	806	阳性
16	821	95.7	805	阳性
17	814	90.7	797	阳性
16	809	96.3	793	阳性
19	812	96	793	阳性
14	806	88.6	792	阳性
20	810	96.7	790	阳性
15	805	97.1	790	阳性
15	803	98.1	788	阳性
17	804	96.5	787	阳性
14	801	91	787	阳性
16	802	92.8	786	阳性
18	803	97.1	785	阳性
15	797	94.8	782	阳性
16	795	95.1	779	阳性
15	786	94.3	771	阳性
14	779	93.6	765	阳性
19	780	96.3	761	阳性
19	777	93.6	758	阳性
17	772	95.1	755	阳性
22	769	98.2	747	阳性

19	759	96.1	740	阳性
15	747	92.9	732	阳性
16	745	96.1	729	阳性
18	744	92.1	726	阳性
17	741	89.8	724	阳性
18	741	90.9	723	阳性
15	733	94.1	718	阳性
17	734	91.8	717	阳性
18	734	97.3	716	阳性
17	730	94	713	阳性
14	727	90.6	713	阳性
15	723	93.5	708	阳性
43	748	99.1	705	阳性
15	714	95.7	699	阳性
17	712	97.3	695	阳性
14	708	95.3	694	阳性
21	705	98.1	684	阳性
16	689	92.5	673	阳性
15	680	89.1	665	阳性
17	680	96.5	663	阳性
15	678	90.3	663	阳性
17	645	95.6	628	阳性
16	627	95	611	阳性
14	622	92.7	608	阳性
18	620	97.8	602	阳性
18	617	0.3	599	阴性
17	597	93.4	580	阳性
20	560	95	540	阳性

20	549	90.6	529	阴性
23	509	0.2	486	阴性
20	475	87.7	455	阴性
17	448	89.7	431	阴性
18	418	92.1	400	阴性
21	405	3.1	384	阴性
17	367	1.8	350	阴性
16	364	0.7	348	阴性
19	355	0.2	336	阴性
18	348	4.8	330	阴性
17	342	74.9	325	阴性
16	314	2	298	阴性
18	307	88.9	289	阴性
18	307	75.7	289	阴性
17	278	0.6	261	阴性
16	264	0	248	阴性
20	264	3.4	244	阴性
17	252	0.8	235	阴性
16	248	79.7	232	阴性
21	240	78.7	219	阴性
18	234	12.6	216	阴性
17	232	5.5	215	阴性
15	226	0.8	211	阴性
16	218	3	202	阴性
25	227	77.5	202	阴性
20	216	76.9	196	阴性
19	212	3.3	193	阴性
18	211	0.4	193	阴性

19	207	77.9	188	阴性
17	202	78.4	185	阴性
16	199	5.9	183	阴性
19	199	0.1	180	阴性
15	190	4	175	阴性
20	187	4.3	167	阴性
17	170	15.2	153	阴性
19	172	73.1	153	阴性
16	150	0.1	134	阴性
17	143	68.6	126	阴性
20	122	67.4	102	阴性
19	115	3.1	96	阴性
17	111	53.9	94	阴性
18	96	38	78	阴性
19	96	38.5	77	阴性
18	93	40.5	75	阴性
15	81	34.4	66	阴性
18	83	35.6	65	阴性
17	82	38.9	65	阴性
21	83	34.3	62	阴性
18	80	34.6	62	阴性
18	79	30.5	61	阴性
18	77	34.3	59	阴性
20	75	32.2	55	阴性
20	74	33.7	54	阴性
18	71	27.5	53	阴性
18	70	22.5	52	阴性
17	66	24.1	49	阴性

18	67	22.7	49	阴性
20	68	19.4	48	阴性
20	67	22.6	47	阴性
18	64	25	46	阴性
17	61	18.9	44	阴性
17	60	13.7	43	阴性
15	56	14.1	41	阴性
19	60	15.2	41	阴性
17	58	73.3	41	阴性
20	58	11.2	38	阴性
19	56	24.7	37	阴性
18	55	13.6	37	阴性
15	52	15.8	37	阴性
22	59	12	37	阴性
18	53	23.3	35	阴性
19	52	6.8	33	阴性
18	51	11.3	33	阴性
17	49	13.4	32	阴性
18	50	10	32	阴性
17	46	9.6	29	阴性
19	47	9.5	28	阴性
19	47	15.7	28	阴性
21	49	6.6	28	阴性
16	43	9.1	27	阴性
18	45	8.5	27	阴性
16	43	12	27	阴性
19	45	11.1	26	阴性
18	44	8	26	阴性

16	42	6.2	26	阴性
16	42	9	26	阴性
17	42	6	25	阴性
17	42	6.9	25	阴性
21	46	5.5	25	阴性
17	42	8	25	阴性
20	44	6.1	24	阴性
17	41	6	24	阴性
16	39	11.3	23	阴性
21	44	9.3	23	阴性
15	38	7.4	23	阴性
17	40	5.5	23	阴性
21	44	5.2	23	阴性
17	40	7.1	23	阴性
20	42	5	22	阴性
17	39	4.3	22	阴性
17	39	4.4	22	阴性
16	38	5.2	22	阴性
18	40	4.7	22	阴性
21	43	4.6	22	阴性
22	44	4.1	22	阴性
16	37	8.4	21	阴性
17	38	10	21	阴性
16	36	4.1	20	阴性
19	39	2.9	20	阴性
20	39	6.1	19	阴性
17	36	5.5	19	阴性
17	35	3.1	18	阴性

16	34	4.8	18	阴性
21	39	5.2	18	阴性
19	36	4.8	17	阴性
17	34	4.2	17	阴性
17	34	1.7	17	阴性
20	37	3.9	17	阴性
16	33	2.7	17	阴性
16	32	3	16	阴性
19	35	3.5	16	阴性
18	34	2.7	16	阴性
15	31	2.5	16	阴性
17	33	1.5	16	阴性
19	34	5.5	15	阴性
18	32	2.3	14	阴性
20	34	3.6	14	阴性
15	28	2.7	13	阴性
18	31	4	13	阴性
19	30	2.7	11	阴性
17	28	1.4	11	阴性
19	30	3.4	11	阴性
19	29	2.2	10	阴性
15	25	2	10	阴性
17	26	1.9	9	阴性
16	25	1.6	9	阴性
14	23	0.6	9	阴性
20	29	0.8	9	阴性
17	26	0.7	9	阴性
18	27	1	9	阴性

20	29	1.9	9	阴性
19	27	2.2	8	阴性
18	25	1.5	7	阴性
17	24	0.7	7	阴性
20	26	2.1	6	阴性
14	20	1.4	6	阴性
21	27	1.2	6	阴性
19	24	0.9	5	阴性
21	26	1	5	阴性
18	23	2	5	阴性
17	22	1.6	5	阴性
18	23	1.4	5	阴性
19	24	0.9	5	阴性
17	22	1	5	阴性
19	24	0.6	5	阴性
17	21	0.3	4	阴性
20	23	0.9	3	阴性
20	23	0.9	3	阴性
18	20	1.7	2	阴性
35	37	0.9	2	阴性
17	19	0.3	2	阴性
20	22	0.5	2	阴性
21	22	0.7	1	阴性
14	15	0.5	1	阴性

表 2

HLA-B27 检测试剂检测结果	样本的阴阳性		总计
	阳性	阴性	

阳性	180	0	180
阴性	2	166	168
总计	182	166	348

在一实施方式中，当采用上述实施例确定的荧光临界值和比值临界值标准判断未知样本的阴阳性时，其判断流程如图 3 所示，包括以下步骤：

步骤 21，采用样本液制备系统将被测血液样本和荧光检测试剂混合处理，制成需要的被测样本液。荧光检测试剂中包括采用第一荧光物质标记的 HLA-B27 抗体和采用第二荧光物质标记的干扰抗体。HLA-B27 抗体例如可以是单克隆抗体，第二荧光物质与第一荧光物质为不同发光波长的荧光物质。当将荧光检测试剂和被测样本混合后，被荧光标记的 HLA-B27 抗体和 HLA-B27 抗原结合，被荧光标记的干扰抗体和干扰抗原（例如 HLA-B7 抗原）结合，因此携带有 HLA-B27 抗原和干扰抗原的白细胞被荧光物质染色，同时被荧光标记的 HLA-B27 抗体也与干扰抗原（例如 HLA-B7 抗原）发生交叉反应。通过清洗分离，将未与白细胞结合的标记物清除，得到染色后的被测样本液。

步骤 22，采用流式细胞仪检测被测样本液。具体检测步骤可与实施例一中的检测步骤相同。经过检测得到被测样本液中被标记细胞的第一荧光强度值和第二荧光强度值，根据需要还可检测得到细胞因被光束照射而发出的散射光。流式细胞仪将检测的各种光信号转换为电信号传输给数据处理系统。

步骤 23，数据处理系统对流式细胞仪检测的各种数据进行处理，计算被测样本液的差值和比值。

差值的计算步骤包括：

步骤 231，根据第一荧光强度值计算该被测样本液的荧光强度。在计算样本液的荧光强度时，可根据该被测样本液中感兴趣细胞的第一荧光强度值来计算。感兴趣细胞可以是全部白细胞，也可以仅是淋巴细胞。淋巴细胞的识别步骤包括：利用步骤 22 收集的散射光，对白细胞进行分类统计，识别出淋巴细胞，获取淋巴细胞的第一荧光强度值，根据这些淋巴细胞的第一荧光强度值计算该被测样本液的荧光强度。在优选的实施例中，本步骤中的感兴趣细胞应与判断标准确定过

程中采用的感兴趣细胞群体一致。荧光强度可以是这些第一荧光强度值的平均值，也可以是这些第一荧光强度值的中位值。在优选的实施例 中，本步骤中的荧光强度也应与判断标准确定过程中荧光强度的算法一致。

步骤 232，计算被测样本液的差值。获取被测样本液的荧光强度与同型对照数据，同型对照数据中包括同型对照的荧光强度，同型对照的荧光强度可以是设备中预存的值，也可以是同型对照样本液的荧光强度。例如，将被测样本分成两份，一份用于制备被测样本液，另一份用于制备同型对照样本液，即将荧光检测试剂的同型对照试剂和另一份被测样本混合处理后得到该被测样本液的同型对照样本液，采用与被测样本液同样的方法用流式细胞仪对同型对照样本液进行检测，得到同型对照样本液的荧光强度。将被测样本液的荧光强度与同型对照的荧光强度的差值作为该被测样本液的差值。

比值的计算步骤包括：

步骤 233，生成同型对照散点图。获取被测样本的同型对照数据，同型对照数据中包括同型对照样本液中感兴趣细胞第一荧光强度值和第二荧光强度值，根据同型对照样本液中感兴趣细胞的第一荧光强度值和第二荧光强度值形成二维的同型对照散点图。

步骤 234，在同型对照散点图中设定门限，该门限使落入指定区域的细胞占散点图中全部细胞数的比例应满足预定比例，即该门限使落入该指定区域的细胞占散点图中全部细胞数的比例应是一个预定比例，或在该预定比例可接受的误差范围内，预定比例可以是一个根据实际要求预设的一个值，例如使落入该指定区域的细胞占散点图中全部细胞数的比例等于 95%、98%或其附近的一个值。判断时采用的预定比例值应与判定标准确定时采用的预定比例一致。

步骤 235，生成被测样本散点图。获取被测样本液中感兴趣细胞的第一荧光强度值和第二荧光强度值，根据被测样本液中感兴趣细胞的第一荧光强度值和第二荧光强度值形成被测样本散点图。

步骤 237，在被测样本散点图中采用同样门限划分细胞群体，计算落入指定区域的对照区域的细胞数占被测样本散点图中全部细胞数的比值。当设定门限为十字门时，指定区域为十字门的左下象限，对照区域为十字门的右下象限。

步骤 24, 将差值和比值分别和荧光临界值和比值临界值比较, 根据比较结果判断被测样本针对于 HLA-B27 抗原的阴阳性。该判断可以是操作者根据数据处理系统输出的差值和比值自行与荧光临界值和比值临界值比较, 也可以是将荧光临界值和比值临界值预先输入数据处理系统中, 由数据处理系统在计算得到被测样本的差值和比值后自动将差值和比值分别和荧光临界值和比值临界值比较。判断规则例如可以是: 当被测样本的差值大于或等于荧光临界值, 且该被测样本的比值大于或等于比值临界值时, 被测样本液为阳性, 否则为阴性。当然, 本领域技术人员应该理解, 判断规则中的任一个“大于或等于”也可以改为“大于”。

根据上述实施例的判断标准的建立方法和未知样本阴阳性的判断方法, 一方面由于采用同型对照的荧光强度作为底数, 减少了非特异性结合的影响, 确定了合理的荧光临界值, 所以减少了非特异性结合对检测结果的干扰, 提高了对 HLA-B27 抗原表达检测结果的准确性。另一方面, 根据设定的比值临界值, B27 的荧光强度大于该临界值, 而 B7 的荧光强度小于该临界值, 荧光强度大于该临界值的应该是真实表达 B27 抗原的细胞。因此根据被测未知样本的 Q4 的结果, 可准确的判断出 HLA-B27 抗原的表达, 从而排除了 HLA-B7 抗原对检测结果的影响, 显著的减低了检测结果的假阳性。

上述实施例中, 通过对流式细胞仪进行荧光校准, 可以很好的实现不同机器以及不同流式机型之间的相互移植, 检测结果在不同的实验室之间具有很好的可比性。

下面以两个实例进一步说明利用上述实施例确定的荧光临界值和比值临界值标准判断样本针对于 HLA-B27 抗原的阴阳性。

被测样本 1:

将已知的 HLA-B27 阴性的新鲜抗凝血作为被测样本 1 和 HLA-B27 检测双色试剂反应, 制备好的样本通过流式细胞法检测, 通过前向散射光(FSC)和侧向散射光(SSC)选定淋巴细胞, 如图 4 所示, 在前向散射光(FSC)和侧向散射光(SSC)形成的散点图中, 左下角 P1 区域中为淋巴细胞。根据同型对照(检测中使用的一种对照试剂, 具体为 FITC-IgG2a/PE-IgG1 双色同型对照)的第一 FL1 和第二 FL2 的荧光强度值, 设置 FL1/FL2 散点图十字门, 如图 5 所示, 假设十字门左下

象限为指定区域，要求有 98% 的细胞落入左下象限。当使 99% 的细胞的第一荧光强度值分布在第一阈值分界线左边，且 99% 的细胞的第二荧光强度值分布在第二阈值分界线下边，第一阈值分界线和第二阈值分界线形成一十字门，该十字门左下象限中分布的细胞数占散点图中全部细胞数的 98%。如图 6 所示为被测样本 1 的第一 FL1 和第二通道 FL2 的荧光强度值形成的散点图，在被测样本 1 的散点图中，采用与同型对照散点图中相同的十字门，计算被测样本 1 的 MFI(差值)值及 Q4 值，Q4 值为落入十字门第四象限的细胞数占散点图中全部细胞数的百分比，第四象限为第三象限的对照象限。检测结果 MFI(差值) 值 < 540 且 Q4 < 80%，检测结果为阴性。

被测样本 2:

将已知的 HLA-B27 阳性的新鲜抗凝血作为被测样本 2 和 HLA-B27 检测双色试剂反应，通过前向散射光(FSC)和侧向散射光(SSC)选定淋巴细胞，如图 7 所示，在前向散射光(FSC)和侧向散射光(SSC)形成的散点图中，左下角 P1 区域中为淋巴细胞。根据同型对照(检测中使用的一种对照试剂，具体为 FITC-IgG2a/PE-IgG1 双色同型对照)的第一通道 FL1 和第二通道 FL2 的荧光强度值，设置 FL1/FL2 散点图十字门，如图 8 所示，假设十字门左下象限为指定区域，同样要求有 98% 的细胞落入左下象限。则分布在第一阈值分界线左边的细胞数和分布在第二阈值分界线下边的细胞数仍然都为 99%，第一阈值分界线和第二阈值分界线形成一十字门，该十字门左下象限中分布的细胞数占散点图中全部细胞数的 98%。如图 9 所示为被测样本 2 的第一 FL1 和第二 FL2 的荧光强度值形成的散点图，在被测样本 2 的散点图中，采用与同型对照散点图中相同的十字门，计算被测样本 2 的 MFI(差值)值及 Q4 值，检测结果为 MFI(差值) 值 > 540 且 Q4 > 80%，检测结果为阳性。

在一实施方式中，判断标准包括荧光临界值和比值临界值，在其它的实施例中，判断标准也可以只包括荧光临界值和比值临界值中的任一个，相应的，在对未知样本进行 HLA-B27 抗原表达的检测中，也只须与一个判断标准比较。

上述实施例中，感兴趣抗原为 HLA-B27 抗原，干扰抗原为 HLA-B7 抗原。在其他的实施例中，感兴趣抗原也可以为其它细胞表面抗原，相应的干扰抗原为

该细胞表面抗原有交叉反应的抗原。上述实施例中，使用的抗体为单克隆抗体，在其他实施例中，也可以使用多克隆抗体。

本领域技术人员可以理解，上述实施方式中各种方法的全部或部分步骤可以通过程序来指令相关硬件完成，该程序可以存储于一计算机可读存储介质中，存储介质可以包括：只读存储器、随机存储器、磁盘或光盘等。

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

权利要求书

1、一种用于判断未知样本阴阳性的判断标准的确定方法，其特征在于，包括：

将多个试验样本分别和荧光检测试剂混合处理，得到各自对应的试验样本液，所述多个试验样本针对于感兴趣抗原已知被确定为阴性或阳性，所述荧光检测试剂中包括采用第一荧光物质标记的与感兴趣抗原对应的抗体；

采用流式细胞仪检测各试验样本液中各细胞发出的第一荧光物质的荧光信号，获得第一荧光强度值；

根据所述试验样本液中感兴趣细胞的第一荧光强度值，计算该试验样本液的荧光强度；

计算所述试验样本液的荧光强度与同型对照的荧光强度的差值；及

根据所述试验样本的已知的阴阳性，从多个试验样本的差值中确定出一个最合适值作为判断未知样本阴阳性的荧光临界值。

2、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述荧光检测试剂中还包括采用第二荧光物质标记的与感兴趣抗原的干扰抗原对应的抗体，所述第二荧光物质的发光波长与所述第一荧光物质的发光波长不同，所述方法还包括：

在采用流式细胞仪检测各试验样本液的过程中，还检测试验样本液中各细胞发出的第二荧光物质的荧光信号，获得第二荧光强度值；

在由同型对照样本液的感兴趣细胞的第一荧光强度值和第二荧光强度值形成的同型对照散点图中，设定门限，使预定比例的细胞分布在所述门限的指定区域；

在由所述试验样本液中感兴趣细胞的第一荧光强度值和第二荧光强度值形成的试验样本散点图中，计算落入指定区域的对照区域的细胞数占试验样本散点图中全部细胞数的比值；及

根据试验样本的已知的阴阳性，从多个试验样本的比值中确定出一个最合适值作为判断未知样本阴阳性的比值临界值。

3、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述同型对照为荧光检测试剂的同型对照试剂与试验样本混合处理后所得的样本液，所述同型对照样本液和试

验样本液采用同一试验样本制得，采用流式细胞仪检测同型对照样本液得到同型对照样本液的各细胞的第一荧光强度值，根据同型对照样本液中感兴趣细胞的第一荧光强度值，计算同型对照的荧光强度。

4、如权利要求 2 所述方法，其特征在于，所述同型对照为荧光检测试剂的同型对照试剂与试验样本混合处理后所得的样本液，所述同型对照样本液和试验样本液采用同一试验样本制得，采用流式细胞仪检测同型对照样本液得到同型对照样本液的各细胞的第一荧光强度值和第二荧光强度值。

5、一种提高细胞表面抗原表达检测准确性的方法，其特征在于包括：

将被测样本与荧光检测试剂混合处理，得到染色后的被测样本液，荧光检测试剂中包括采用第一荧光物质标记的与感兴趣抗原对应的抗体；

采用流式细胞仪检测被测样本液，检测被测样本液中各细胞发出的第一荧光物质的荧光信号，获得第一荧光强度值；

根据被测样本液中感兴趣细胞的第一荧光强度值计算被测样本液的荧光强度；及

计算被测样本液的荧光强度与同型对照的荧光强度的差值，所述差值用于与预设的荧光临界值进行比较。

6、如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述荧光临界值通过权利要求 1 所述的方法获得。

7、如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，还包括：

将所述差值与荧光临界值进行比较，根据比较结果输出被测样本液阴阳性的判断结果；当所述差值大于或等于荧光临界值，被测样本液为阳性，否则为阴性。

8、如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述荧光检测试剂中还包括采用第二荧光物质标记的抗体，所述抗体为与感兴趣抗原的干扰抗原对应的抗体，第二荧光物质的发光波长与第一荧光物质的发光波长不同，所述方法还包括：

在采用流式细胞仪检测被测样本液的过程中，还检测被测样本液中各细胞发出的第二荧光强度值；

在由同型对照样本液的感兴趣细胞的第一荧光强度值和第二荧光强度值形成的同型对照散点图中，设定门限，使预定比例的细胞分布在门限的指定区域；

及

在由被测样本液中感兴趣细胞的第一荧光强度值和第二荧光强度值形成的被测样本散点图中，计算落入指定区域的对照区域的细胞数占被测样本散点图中全部细胞数的比值；所述比值用于与预设的比值临界值进行比较。

9、如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述比值临界值通过权利要求 2 所述的方法获得。

10、如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，还包括：

将所述差值与荧光临界值进行比较，将所述比值与比值临界值进行比较；及根据比较结果输出被测样本液阴阳性的判断结果；当所述差值大于或等于荧光临界值，且所述比值大于或等于比值临界值时，被测样本液为阳性，否则为阴性。

11、如权利要求 1 或 5 所述的方法，其特征在于，在采用流式细胞仪检测各试验样本液之前对流式细胞仪进行荧光值校准。

12、如权利要求 1 或 5 所述的方法，其特征在于，所述感兴趣抗原为 HLA-B27。

13、如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，第一荧光标记的抗体为 HLA-B27 单克隆抗体，和/或干扰抗原为 HLA-B7，和/或第二荧光标记的抗体为 HLA-B7 单克隆抗体。

14、如权利要求 1 或 5 所述的方法，其特征在于，在采用流式细胞仪检测各样本液的过程中，还检测样本液中细胞被光束照射后发出的散射光，根据散射光统计样本液中的淋巴细胞，在计算样本液的荧光强度时将淋巴细胞作为感兴趣细胞，根据统计出的样本液中淋巴细胞的第一荧光强度值计算荧光强度。

15、如权利要求 2 或 8 所述的方法，其特征在于，所述门限为十字门，所述指定区域为十字门的左下象限，对照区域为十字门的右下象限。

16、一种用于检测细胞表面抗原表达的设备，其特征在于，包括：

样本液制备系统，用于将被测体液样本与荧光检测试剂混合处理，得到染色后的被测样本液，荧光检测试剂中包括采用第一荧光物质标记的与感兴趣抗原对应的抗体；

流式细胞仪，用于检测被测样本液，所述流式细胞仪检测被测样本液中各细

胞发出的第一荧光物质的荧光信号，获得第一荧光强度值；及

数据处理系统，用于接收流式细胞仪输出的数据，根据被测样本液中感兴趣细胞的第一荧光强度值计算被测样本液的荧光强度，计算被测样本液的荧光强度与同型对照的荧光强度的差值，所述差值用于与预设的荧光临界值进行比较。

17、如权利要求 16 所述的设备，其特征在于，所述荧光临界值通过权利要求 1 所述的方法获得。

18、如权利要求 16 所述的设备，其特征在于，所述流式细胞仪在采用流式细胞仪检测各被测样本液的过程中，还检测样本液中细胞被光束照射后发出的散射光，数据处理系统根据流式细胞仪检测的散射光统计样本液中的淋巴细胞，计算被测样本液的荧光强度时将淋巴细胞作为感兴趣细胞，根据统计出的样本液中淋巴细胞的第一荧光强度值计算荧光强度。

19、如权利要求 16 所述的设备，其特征在于，所述荧光检测试剂中还包括采用第二荧光物质标记的与感兴趣抗原的干扰抗原对应的抗体，第二荧光物质发光波长与第一荧光物质的发光波长不同，所述流式细胞仪在检测被测样本液的过程中，还检测被测样本液中各细胞发出的第二荧光物质的荧光信号，获得第二荧光强度值；所述数据处理系统根据同型对照样本液中感兴趣细胞的第一荧光强度值和第二荧光强度值形成二维的同型对照散点图，在同型对照散点图中设定门限，使预定比例的细胞分布在门限的指定区域；根据被测样本液中感兴趣细胞的第一荧光强度值和第二荧光强度值形成被测样本散点图，计算落入指定区域的对照区域的细胞数占被测样本散点图中全部细胞数的比值；所述比值用于与预设的比值临界值进行比较。

20、如权利要求 19 所述的设备，其特征在于，所述比值临界值通过权利要求 2 所述的方法获得。

21、如权利要求 19 所述的设备，其特征在于，所述门限为十字门，所述指定区域为十字门的左下象限，对照区域为十字门的右下象限。

22、如权利要求 19 所述的设备，其特征在于，

数据处理系统将所述差值与荧光临界值进行比较，将所述比值与比值临界值进行比较，并根据比较结果输出被测样本液阴阳性的判断结果。

23、如权利要求 22 所述的设备，其特征在于，当所述差值大于或等于荧光临界值，且所述比值大于或等于比值临界值时，被测样本液为阳性，否则为阴性。

24、如权利要求 16 所述的设备，其特征在于，所述感兴趣抗原为 HLA-B27。

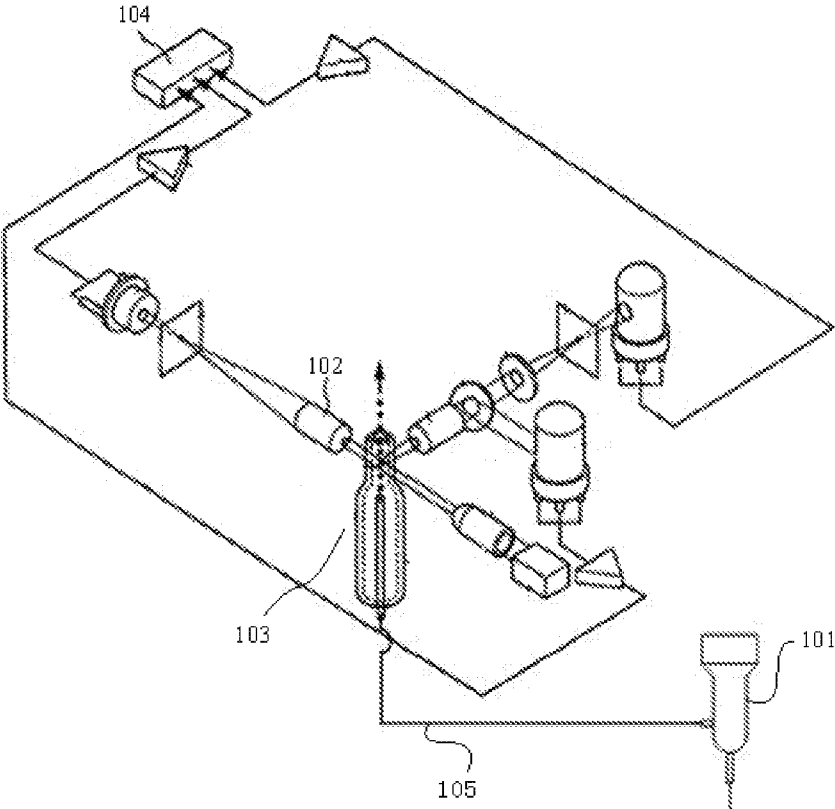


图 1

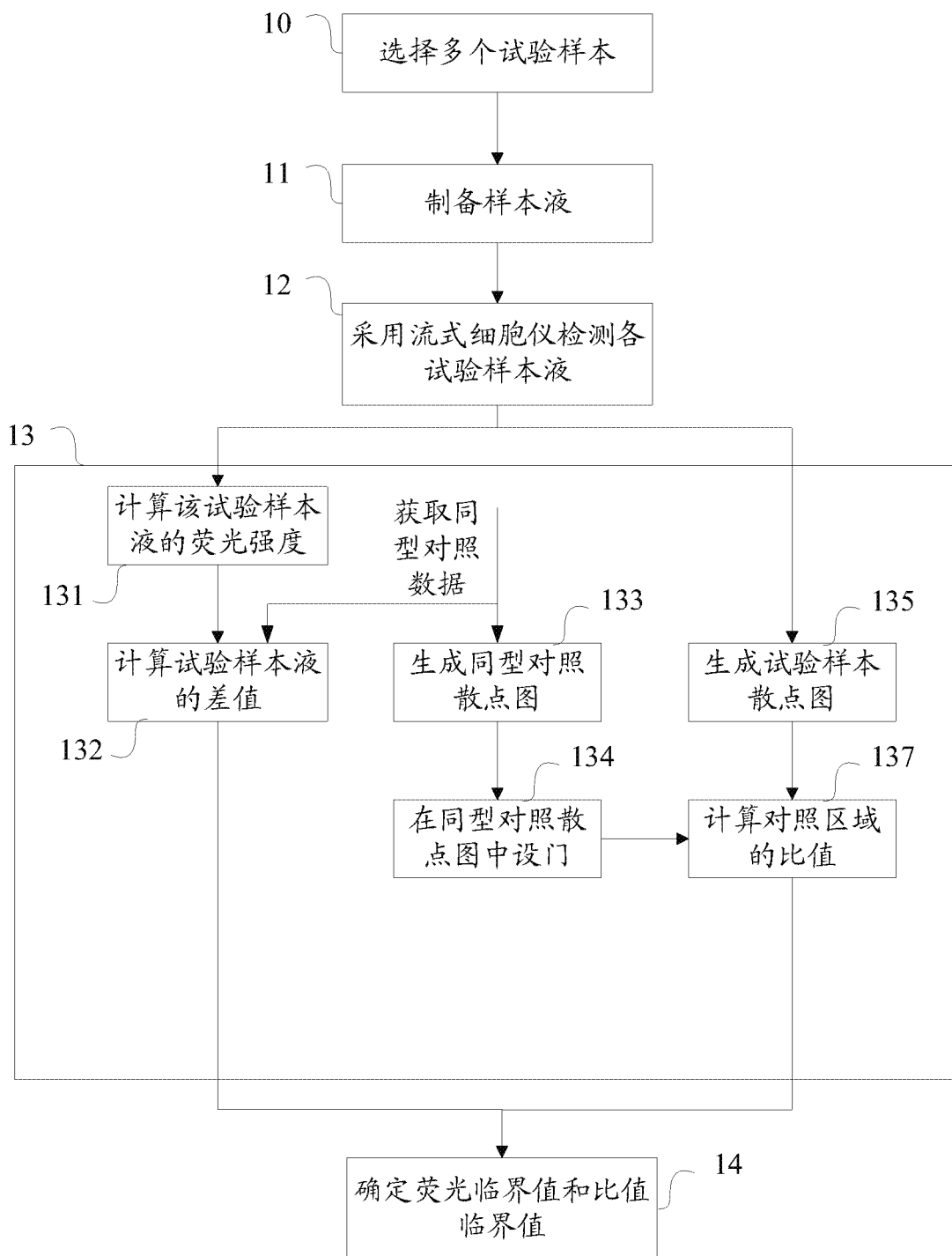


图 2

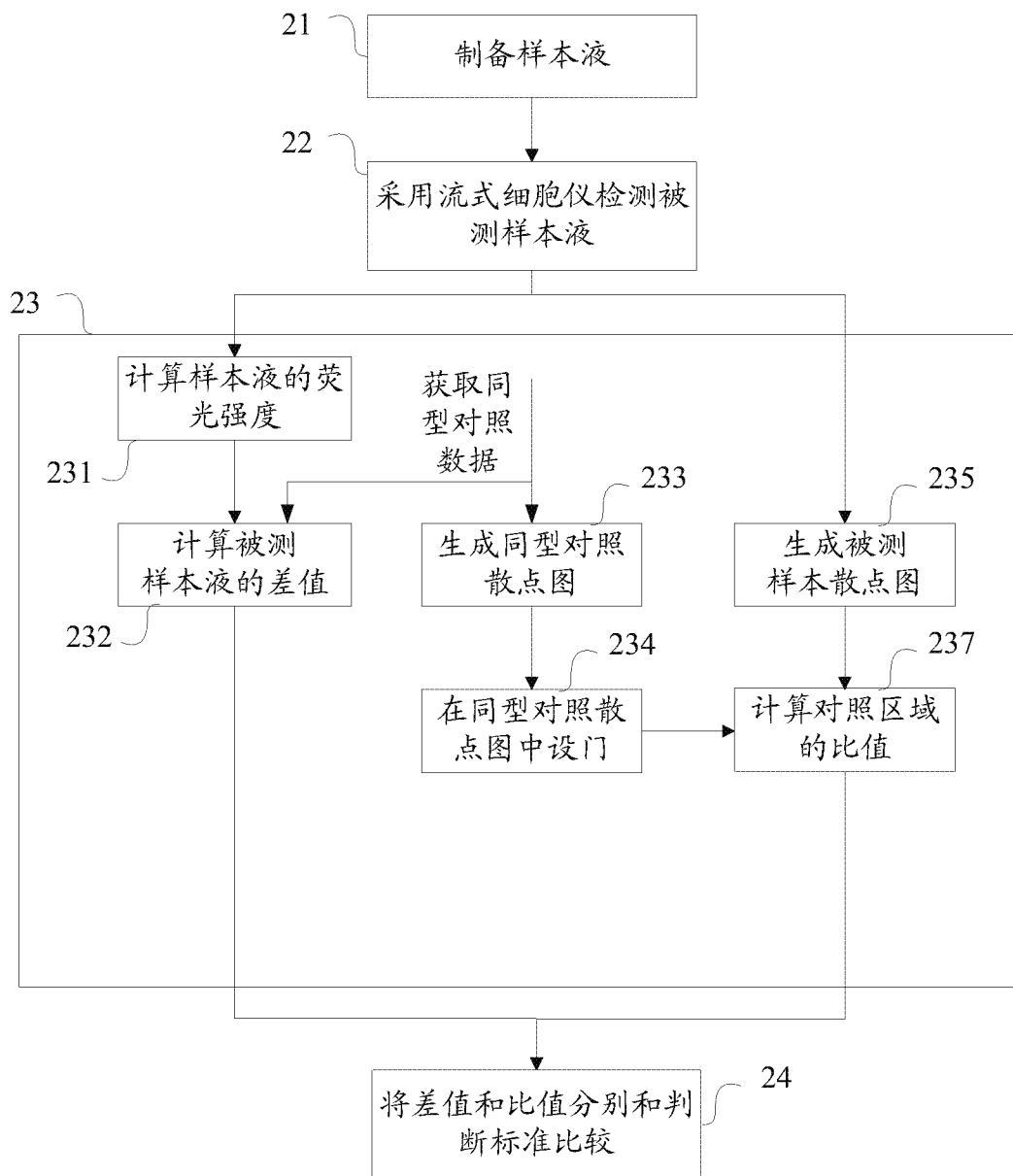


图 3

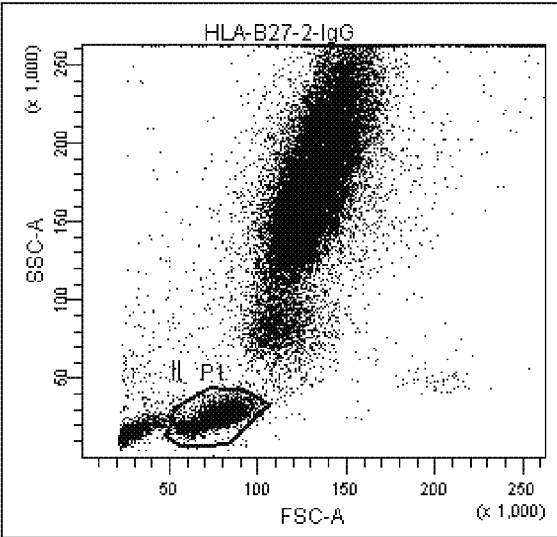


图 4

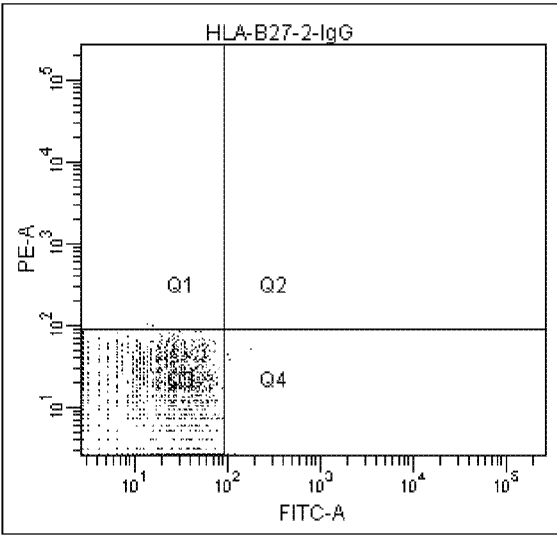


图 5

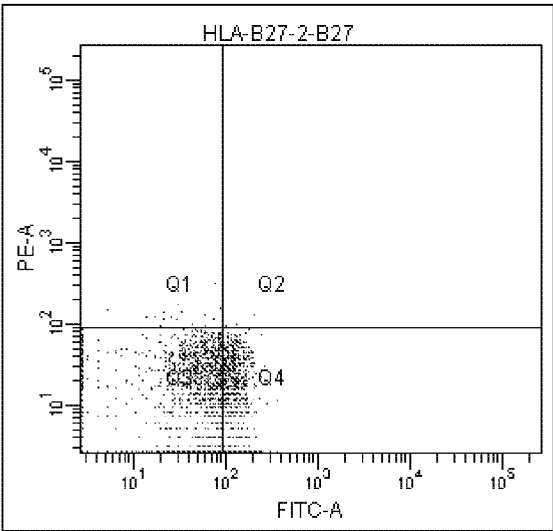


图 6

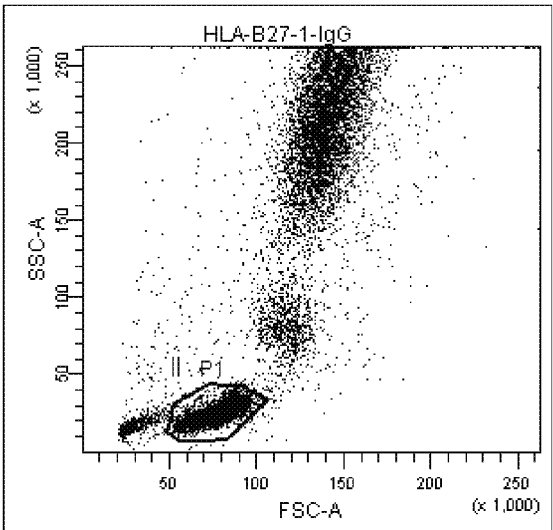


图 7

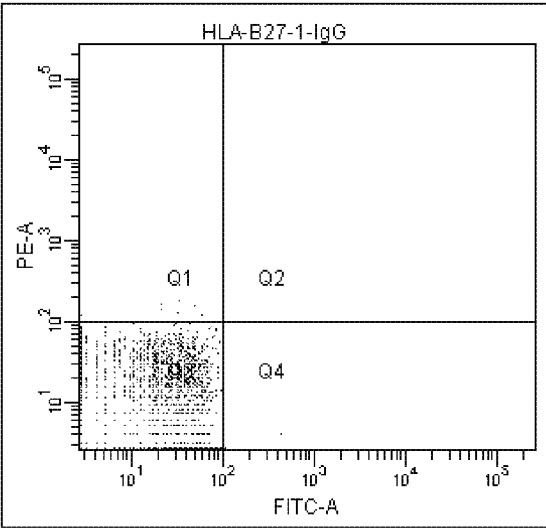


图 8

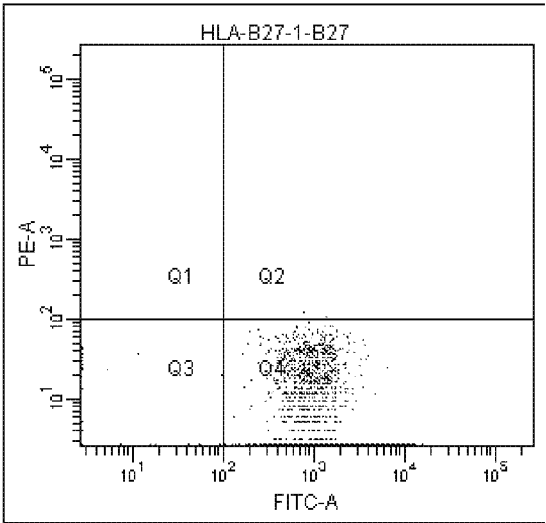


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/074474

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 15/14 (2006.01) i; G01N 33/48 (2006.01) n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 15/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNXTX; CNABS; VEN; ISI; GOOGLESCHOLAR; CNKI: fluorescence, isotype control, critical value, cell-surface antigen, MHC, gating, GATING, gate, two; SHENZHEN MINDRAY BIO MED ELECT; fcm, double, flow cytometry, gate?, critical, threshold+, CD, cut off?, second, HLA, isotype

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102998241 A (THE FIRST AFFILIATED HOSPITAL WITH NANJING MEDICAL UNIVERSITY), 27 March 2013 (27.03.2013), see claims 1-8, and embodiments 1-2	1-15
Y	CN 102998241 A (THE FIRST AFFILIATED HOSPITAL WITH NANJING MEDICAL UNIVERSITY), 27 March 2013 (27.03.2013), see claims 1-8, and embodiments 1-2	17, 19-23
X	CN 1993610 A (HORIBA ABX SAS), 04 July 2007 (04.07.2007), see claims 21-24, description, pages 10-11, and figure 1	16, 18, 24
Y	CN 1993610 A (HORIBA ABX SAS), 04 July 2007 (04.07.2007), see claims 21-24, description, pages 10-11, and figure 1	17, 19-23
A	CN 103119441 A (GPB SCIENTIFIC, LLC), 22 May 2013 (22.05.2013), the whole document	1-24
A	EP 0608987 A1 (BECTON DICKINSON CO.), 03 August 1994 (03.08.1994), the whole document	1-24
A	US 2010132488 A1 (SHENZHEN MINDRAY BIO MED ELECT CO., LTD.), 03 June 2010 (03.06.2010), the whole document	1-24

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 27 June 2014 (27.06.2014)	Date of mailing of the international search report 09 July 2014 (09.07.2014)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer WANG, Xiaoyuan Telephone No.: (86-10) 62085241

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/074474**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007/010236 A1 (MATHSHOP LTD.), 25 January 2007 (25.01.2007), the whole document	1-24
A	MOBARREZ, F et al., "A Multicolor Flow Cytometric Assay for Measurement of Platelet-derived Microparticles", THROMBOSIS RESEARCH, vol. 125, no. 3, March 2010 (03.2010), pages E110-E116	1-24
A	HUANG, He et al., "Comparison of Results of Detection of HLA-B27 Antigen by Cytometry and SSP-PCR", CHINA TROPICAL MEDICINE, vol. 7, no. 9, September 2007 (09.2007), pages 1662-1663	1-24
A	Wilfried H. B. M. leveraging et al., "Flow Cytometric Screening for the HLA-B27 Antigen on Peripheral Blood Lymphocytes", CURRENT PROTOCOLS IN CYTOMETRY, chapter 6, August 2005 (08.2005), unit 6.22	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2014/074474

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2007/010236 A1	25 January 2007	None	
CN 1993610 A	04 July 2007	JP 2008507966 A	21 March 2008
		JP 5281286 B2	04 September 2013
		FR 2873813 B1	17 November 2006
		US 2008124745 A1	29 May 2008
		CA 2576753 A1	09 March 2006
		EP 1771718 A1	11 April 2007
		WO 2006024716 A1	09 March 2006
		FR 2873813 A1	03 February 2006
		CN 1993610 B	30 January 2013
		US 8008029 B2	30 August 2011
		JP 2008507966 A	21 March 2008
		JP 5281286 B2	04 September 2013
		FR 2873813 B1	17 November 2006
		US 2008124745 A1	29 May 2008
		CA 2576753 A1	09 March 2006
		EP 1771718 A1	11 April 2007
		WO 2006024716 A1	09 March 2006
		FR 2873813 A1	03 February 2006
		CN 1993610 B	30 January 2013
		US 8008029 B2	30 August 2011
CN 103119441 A	22 May 2013	US 2013143197 A1	06 June 2013
		WO 2012024194 A3	07 June 2012
		WO 2012024194 A2	23 February 2012
		EP 2603793 A4	19 March 2014
		MX 2013001750 A	05 June 2013
		EP 2603793 A2	19 June 2013
		CA 2807719 A1	23 February 2012
		AU 2011292239 A1	21 March 2013
EP 0608987 A1	03 August 1994	DE 69428552 T2	11 April 2002
		EP 0608987 B1	10 October 2001
		DE 69428552 D1	15 November 2001
US 2010132488 A1	03 June 2010	US 2008250876 A1	16 October 2008
		US 8342044 B2	01 January 2013
		US 7658121 B2	09 February 2010
		CN 101290313 B	17 April 2013
		CN 101290313 A	22 October 2008
CN 102998241 A	27 March 2013	None	

A. 主题的分类		
G01N 15/14(2006.01)i; G01N 33/48(2006.01)n		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
G01N15		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNTXT;CNABS;VEN;ISI;GOOGLESCHOLAR;CNKI:荧光, 第二, 双, 两, 同型对照, 设门, 临界值, 阈值, 细胞表面抗原, MHC, gating, GATING, gate, two, SHENZHEN MINDRAY BIO MED ELECT, fcm, double, flow cytometry, gate?, critical, threshold+, CD, cut off?, second, HLA, isotype		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 102998241A (南京医科大学第一附属医院) 2013年 3月 27日 (2013 - 03 - 27) 参见权利要求1-8, 实施例1-2	1-15
Y	CN 102998241A (南京医科大学第一附属医院) 2013年 3月 27日 (2013 - 03 - 27) 参见权利要求1-8, 实施例1-2	17, 19-23
X	CN 1993610A (奥里巴ABX股份有限公司) 2007年 7月 04日 (2007 - 07 - 04) 参见权利要求21-24, 说明书第10-11页, 附图1	16, 18, 24
Y	CN 1993610A (奥里巴ABX股份有限公司) 2007年 7月 04日 (2007 - 07 - 04) 参见权利要求21-24, 说明书第10-11页, 附图1	17, 19-23
A	CN 103119441A (GPB科学有限责任公司) 2013年 5月 22日 (2013 - 05 - 22) 全文	1-24
A	EP 0608987A1 (BECTON DICKINSON CO) 1994年 8月 03日 (1994 - 08 - 03) 全文	1-24
A	US 2010132488A1 (SHENZHEN MINDRAY BIO MED ELECT CO.LTD) 2010年 6月 03日 (2010 - 06 - 03) 全文	24
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2014年 6月 27日		2014年 7月 09日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国		王晓媛
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (86-10)62085241

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2007/010236A1 (MATHSHOP LTD) 2007年 1月 25日 (2007 - 01 - 25) 全文	1-24
A	Faribora Mobarrez et al. "A multicolor flow cytometric assay for measurement of platelet-derived microparticles" Thrombosis Research., 第125卷, 卷, 第3期, 期, 010)年31月 (010) - 31), 第E110-E116页.	1-24
A	黄河 等. . "流式细胞术和SSP-PCR法检测HLA-B27抗原的比较。" 中国热带医学., 第7卷, 卷, 第9期, 期, 007)年90月 (007) - 90), 第1662-1663页。	1-24
A	Wilfried H.B.M.levering et al. "Flow cytometric screening for the HLA-B27 antigen on peripheral blood lymphocytes" Current Protocols in Cytometry., 第chapter 6, 卷, 005)年81月 (005) - 81), unit 6.22.	1-24

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/074474

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
WO 2007/010236A1	2007年 1月 25日	无	
CN 1993610A	2007年 7月 04日	JP 2008507966A	2008年 3月 21日
		JP 5281286B2	2013年 9月 04日
		FR 2873813B1	2006年 11月 17日
		US 2008124745A1	2008年 5月 29日
		CA 2576753A1	2006年 3月 09日
		EP 1771718A1	2007年 4月 11日
		WO 2006024716A1	2006年 3月 09日
		FR 2873813A1	2006年 2月 03日
		CN 1993610B	2013年 1月 30日
		US 8008029B2	2011年 8月 30日
		JP 2008507966A	2008年 3月 21日
		JP 5281286B2	2013年 9月 04日
		FR 2873813B1	2006年 11月 17日
		US 2008124745A1	2008年 5月 29日
		CA 2576753A1	2006年 3月 09日
		EP 1771718A1	2007年 4月 11日
		WO 2006024716A1	2006年 3月 09日
		FR 2873813A1	2006年 2月 03日
		CN 1993610B	2013年 1月 30日
		US 8008029B2	2011年 8月 30日
CN 103119441A	2013年 5月 22日	US 2013143197A1	2013年 6月 06日
		WO 2012024194A3	2012年 6月 07日
		WO 2012024194A2	2012年 2月 23日
		EP 2603793A4	2014年 3月 19日
		MX 2013001750A	2013年 6月 05日
		EP 2603793A2	2013年 6月 19日
		CA 2807719A1	2012年 2月 23日
		AU 2011292239A1	2013年 3月 21日
EP 0608987A1	1994年 8月 03日	DE 69428552T2	2002年 4月 11日
		EP 0608987B1	2001年 10月 10日
		DE 69428552D1	2001年 11月 15日
US 2010132488A1	2010年 6月 03日	US 2008250876A1	2008年 10月 16日
		US 8342044B2	2013年 1月 01日
		US 7658121B2	2010年 2月 09日
		CN 101290313B	2013年 4月 17日
		CN 101290313A	2008年 10月 22日
CN 102998241A	2013年 3月 27日	无	

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)