



中华人民共和国国家标准

GB/T 39730—2020

细胞计数通用要求 流式细胞测定法

General requirements for cell counting—Flow cytometry

2020-12-14 发布

2021-07-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言	I
引言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语、定义和缩略语	1
4 方法原理	2
5 通用要求	2
5.1 试剂或材料	2
5.2 仪器设备	3
5.3 样本制备	3
5.4 试验步骤	4
5.5 数据分析	6
5.6 方法确认	6
5.7 报告	6
参考文献	7

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由国家标准物质研究中心提出并归口。

本文件起草单位：中国计量科学研究院。

本文件主要起草人：刘瑛颖、王晶、傅博强、袁宝珠、牛春艳、隋志伟、陈川。



引 言

流式细胞术是对液体中悬浮单颗粒或细胞进行高速、多参数分析的技术。通过流式细胞术可对生物制备样本中的细胞进行直接计数,既可以实现样本中总细胞计数,还可以根据细胞特性进行分型计数。为了实现不同实验室、平台、操作人员等测量系统条件之间的数据一致性,需要对通过流式细胞术进行细胞计数试验的技术环节标准化。



细胞计数通用要求

流式细胞测定法

1 范围

本文件描述了流式细胞仪测定细胞数量的术语、定义和缩略语、方法原理,以及包括试剂或材料、仪器设备、样本制备、试验步骤、数据分析、方法确认和报告的通用要求。

本文件适用于研究、生产与检验中使用流式细胞仪进行的细胞计数。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

细胞计数 cell counting

细胞数量的测量。

[来源:ISO 20391-1:2018,3.8]

3.1.2

细胞染色 cell staining

细胞特定成分与荧光染料或标记了荧光染料的特异性抗体结合后进行检测的一种技术。

注:特定成分为蛋白质、DNA、RNA等。

3.1.3

有证标准物质 certified reference material; CRM

附有由权威机构发布的文件,提供使用有效程序获得的具有不确定度和溯源性的一个或多个特性量值的标准物质。

[来源:JJF 1001—2018,8.15]

3.1.4

准确度 accuracy

测量准确度 measurement accuracy

被测量的测得值与其真值之间的一致程度。

[来源:JJF 1001—2018,5.8,有修改]

3.1.5

精密度 precision

测量精密度 measurement precision

在规定条件下,对同一或类似被测对象测量所得示值或测得值间的一致程度。

[来源:JJF 1001—2018,5.10,有修改]

3.1.6

特异性 selectivity

测量系统的一种特性,通过特定的测量程序得到一个或多个被测对象的量值,每一被测对象的量值与被测系统中的其他被测对象或其他量值不相关。

[来源:ISO 20391-1:2018,3.24]

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

FSC:前向角散射光(Forward Scatter)

SSC:侧向角散射光(Side Scatter)

4 方法原理



计数标准微球法:使用流式细胞仪,通过目标细胞及计数标准微球的光学(散射光和荧光)特性,对待测样本中的目标细胞和计数标准微球进行区分和计数。根据目标细胞和计数标准微球数量间的比例关系,计算得到待测样本中目标细胞的实际个数或浓度。

体积法:流式细胞仪通过目标细胞光学(散射光和荧光)特性和样本体积测量,直接得到待测样本中目标细胞的实际个数或浓度。

5 通用要求

5.1 试剂或材料

5.1.1 荧光染料

选择的荧光染料应能被试验所用流式细胞仪的激光器激发,其激发光信号能被流式细胞仪的检测器接收。

5.1.2 荧光染料标记的抗体

确保选择的荧光染料标记的抗体对目标细胞具有特异性。

5.1.3 鞘液

鞘液应为无荧光本底的平衡电解质溶液,其洁净度、吸光度、pH 值、渗透压应满足流式细胞仪的要求。

5.1.4 缓冲溶液

缓冲溶液不应造成待测细胞的破裂、形态严重改变或者聚团,不应对待测细胞的光学特性产生显著影响,不应含钙离子和镁离子的磷酸盐缓冲液,根据具体细胞类型确定配制要求和方法。

5.1.5 固定剂

固定剂不应造成待测细胞染色后的光学特性和形态严重改变。

5.1.6 计数标准微球

计数标准微球应大小均一,负载荧光物质并且荧光强度一致,具有准确的数量量值和不确定度,自

发聚集度低。应考虑为保证细胞计数的准确和可溯源,计数标准微球的数量量值应溯源至有证标准物质。

5.1.7 荧光补偿样品

荧光补偿样品为单荧光染色细胞或者荧光补偿微球。荧光补偿样品的荧光染料应与待测细胞所用的荧光染料一致。荧光补偿样品的荧光强度至少要与待测细胞一致,或者超过待测细胞的荧光强度。

5.1.8 其他材料

样本保存管、微量移液器吸头、进样管等其他材料,宜选择低吸附性材料制成的。

5.2 仪器设备

5.2.1 流式细胞仪

应具有荧光检测通道和散射光检测通道,荧光通道能够检测选择的荧光染料,散射光检测通道包括FSC和SSC。

流式细胞仪应经过校准,并定期核查准确度和精密度。

5.2.2 微量移液器

微量移液器量程为 $10\ \mu\text{L}\sim 1\ 000\ \mu\text{L}$ 。微量移液器应经过检定或校准,并定期核查其移取量的准确度和精密度。

5.2.3 涡旋振荡器

涡旋振荡器使用的涡旋转速不应大于 $3\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 。使用者应监测并记录涡旋振荡器的使用转速、时长等条件。

5.2.4 温度控制装置

用于细胞染色的孵育温度控制或试剂、样本的保存,例如冰箱。使用者应监测并记录温度控制装置的温度准确度和稳定性。

5.3 样本制备

5.3.1 细胞制备

根据原始样本的类型选择合适的待测样本制备方式。待测样本应是单分散细胞悬液,即待测样本中的细胞以单个细胞存在,没有细胞团或细胞碎片。

5.3.2 样本运送

运送条件应不影响待测细胞的生物特性和检测结果。

5.3.3 标识

待测样本应具有标签,标签上注明样本类型、样本采集和制备的时间和地点。

5.3.4 样本处理

5.3.4.1 细胞染色

细胞染色前,应根据流式细胞仪的性能参数、待测细胞的黏附、自然沉降等特性来调整样本中的细

胞浓度。

如果细胞浓度过高,可用缓冲溶液对待测样本进行稀释,并记录稀释倍数。

根据荧光染料或特异性的荧光染料标记抗体质量参数确定样本量及染料、抗体浓度、孵育条件。

保证待测样本和荧光染料或特异性的荧光染料标记抗体充分混合,应选择合适的涡旋转速和时长,转速过高或时间过长会造成细胞破损。

待测样本完成细胞染色后,尽快进行上机检测。如果无法尽快上机检测,可通过固定剂进行固定并适当条件保存,宜 4℃~8℃避光保存。

5.3.4.2 计数标准微球添加

对满足溯源至有证标准物质条件的计数标准微球进行准确添加,应采用反向抽吸法,向装有待测样本的进样管中加入充分混匀的计数标准微球溶液,或者在计数标准微球干粉中加入待测样本。

添加计数标准微球后应避免样本的离心洗涤导致的计数标准微球丢失。

样本处理完成后应尽快上机试验,上机前进行充分混匀,避免放置导致的细胞和计数标准微球沉降。应选择合适的涡旋转速和时间,转速过高或时间过长会造成细胞破碎或计数标准微球吸附管壁。

可对被测样本和计数标准微球的移取量进行精确称量,提高测量准确度和精密度。

5.4 试验步骤

5.4.1 工作条件

根据流式细胞仪的仪器说明书设置仪器的工作条件,包括环境温度、湿度、电源电压、大气压力、环境光照等。

5.4.2 开机校验

每次开机后,对流式细胞仪的光路系统进行校验,可参考流式细胞仪的校验参数检测 FSC、SSC 和各荧光通道的平均荧光强度、变异系数和荧光分辨率。

5.4.3 细胞计数测量

5.4.3.1 对照设置

应设置阴性对照、阳性对照、同型对照、荧光扣除对照,用于识别目标细胞并确认目标细胞的染色方案是否正确。

使用不含任何荧光染料及计数标准微球的待测细胞样本作为阴性对照。

使用已经证明可有效地与待测荧光染料结合的细胞样本作为阳性对照。

使用与荧光染料标记的抗体相同种属来源、同种免疫球蛋白的相同亚型的相同剂量抗体染色的细胞样品作为同型对照。

使用两个和两个以上的荧光染料或荧光染料标记抗体组合标记细胞样本时,在完整的染色基础上使用减少一种荧光染料或荧光染料标记抗体进行细胞染色的待测细胞样本作为荧光扣除对照。

5.4.3.2 清洗

进样间隔期间,应使用清洗液对仪器管道进行清洗。

5.4.3.3 设定阈值、电压

选择合适的检测通道后,根据使用的荧光染料或相关试剂盒提供的质量参数设置系列双参数散点图或单参数直方图和阈值。

根据阴性对照、阳性对照的 FSC、SSC 和荧光信号的强弱调整电压大小。通过调整电压使阴性对照、阳性对照的细胞 FSC、SSC 信号与细胞碎片或杂质分开处于对应散点图中部,见图 1。

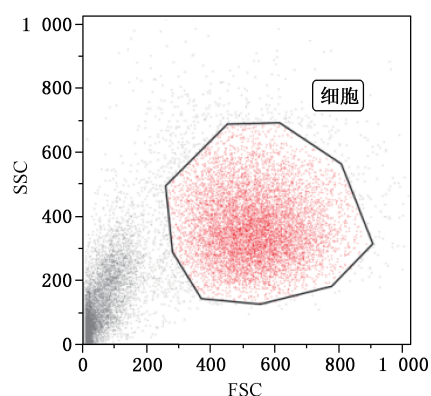
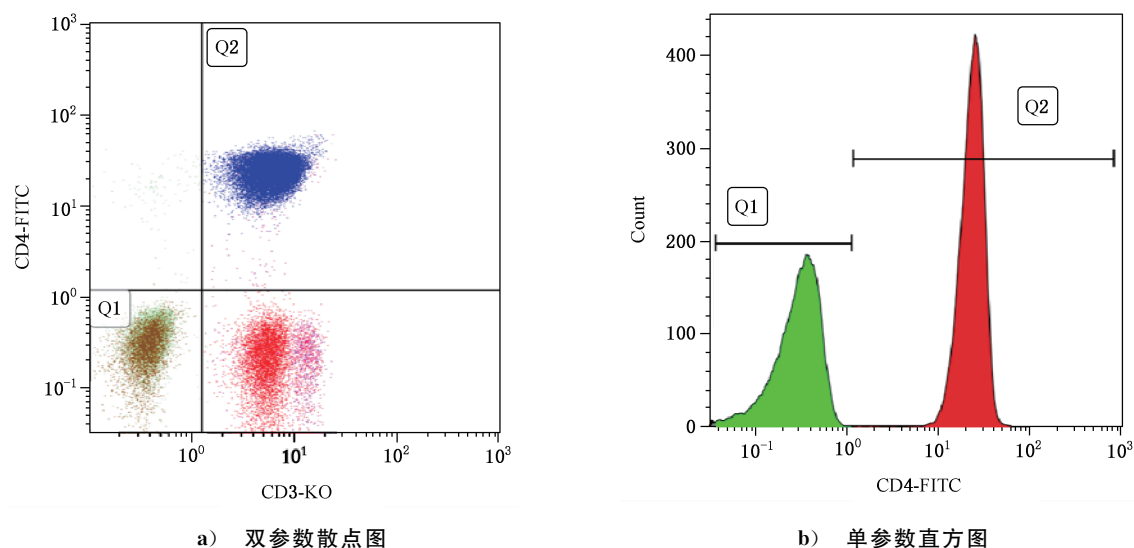


图 1 流式分析图谱中细胞 FSC/SSC 信号示意图

通过调整电压使阳性对照的荧光信号处于双参数散点图[见图 2a)]中对应荧光通道强度轴阈值的上方,或单参数直方图[见图 2b)]中对应荧光强度轴阈值的右方;阴性对照的荧光信号处于双参数散点图中对应荧光通道强度轴阈值的下方,或单参数直方图中对应荧光强度轴阈值的左方,见图 2。



标引序号说明:

Q1——阴性对照;

Q2——阳性对照。

图 2 流式分析图谱中阴性/阳性对照的荧光通道信号类群区分示意图

5.4.3.4 荧光补偿

采用两种及以上染料组合方案进行细胞计数时或光学检测通道的电压及增益发生变动时,需要进行荧光补偿。

荧光补偿样品进样完成后,根据仪器操作软件的指示进行手工方式补偿或自动补偿。

5.4.3.5 目标细胞设门

使用同型对照和荧光扣除对照进行对比,通过相应散点图中的荧光强度表达,从阳性对照的荧光信

号中区分出目标细胞的阳性信号并进行设门。

5.4.3.6 信号采集

应在进样稳定后开始采集信号。

总细胞信号采集数量不应小于 10 000 个,计数标准微球信号采集数量不应小于 1 000 个。若总细胞信号采集数量为 10 000 个时,不能获取 1 000 个计数标准微球采集数量,则应加大总细胞信号采集数量。

信号采集时间应保持在合理范围内,过长时间可能导致细胞发生聚集或细胞、计数标准微球的沉降。

5.5 数据分析

5.5.1 计数标准微球法

按照公式(1)计算目标细胞的浓度值:

$$C_{RS} = \frac{N_{cell}}{N_{ball}} \times \frac{Q_{ball}}{V} \times D \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

C_{RS} ——目标细胞浓度,单位为个每微升(个/ μ L);

N_{cell} ——获取目标细胞数量,单位为个;

N_{ball} ——获取计数标准微球数量,单位为个;

Q_{ball} ——样本中添加的计数标准微球数量,单位为个;

V ——待测样本加样体积(不含荧光染料或特异性的荧光染料标记单克隆抗体溶液,计数标准微球悬浮液等添加物体积),单位为微升(μ L);

D ——样本稀释倍数。

5.5.2 体积法

计数直接来源于流式细胞仪数据,由专用软件直接计算生成。

5.6 方法确认

应对具体测量方法进行方法性能确认。方法性能参数包括准确度、精密度、工作范围(检出限、线性范围等)、特异性、方法稳健性和组间精密度(如操作者间、仪器间和日间变化)等。

应建立评估方法性能参数的方案和标准,制定并保存相应的文件。

5.7 报告

报告提供的信息应至少包括:

- a) 使用仪器信息,包括仪器的参数设定;
- b) 试剂名称、来源、批号;
- c) 测量结果;
- d) 数据分析程序;
- e) 意外情况。



参 考 文 献

- [1] JJF 1001—2018 通用计量术语及定义
 - [2] JJF 1665—2017 流式细胞仪校准规范
 - [3] WS/T 360—2011 流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南
 - [4] YY/T 0588 流式细胞仪
 - [5] ISO 20391-1:2018 Biotechnology—Cell counting—Part 1:General guidance on cell counting methods
 - [6] 杜立颖,冯仁青. 流式细胞术(第二版)[M]. 北京大学出版社,2008.
 - [7] 9101 药品质量标准分析方法验证指导原则-中国药典 [M]. 中国医药科技出版社,2015.
-