



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 39729—2020

---

## 细胞纯度测定通用要求 流式细胞测定法

General requirements for measurement of cell purity—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 ..... 1

5 通用要求 ..... 2

    5.1 试剂或材料 ..... 2

    5.2 仪器设备 ..... 2

    5.3 样本制备 ..... 3

    5.4 试验步骤 ..... 3

    5.5 数据分析 ..... 5

    5.6 方法确认 ..... 5

    5.7 报告 ..... 5

参考文献..... 6



## 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、陈川、傅博强、袁宝珠、牛春艳、隋志伟。

## 引 言

细胞纯度是评价和分析细胞样本特性与细胞产品质量的基本参数,因此医学检验、生物医药研发、生产和质量检验等领域需要广泛开展细胞纯度的测量。流式细胞术可对液体中悬浮单颗粒或细胞进行高速、多参数分析,是一种常用的细胞纯度测量方法。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纯度试验的技术环节标准化。



# 细胞纯度测定通用要求

## 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纯度的术语、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、生产与检验中通过流式细胞仪进行的细胞纯度的测定。

### 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

**目标细胞** **cell of testing target**

与检测目标相一致,具有流式细胞仪可检测特征(如大小、数量、特定标志物)的细胞。

##### 3.1.2

**细胞纯度** **cell purity**

目标细胞占样本总细胞数量的百分率。

##### 3.1.3

**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。

#### 3.2 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

使用流式细胞仪,通过总细胞和目标细胞不同的光学(散射光和荧光)特性,对待测样本中的总细胞和目标细胞进行区分和计数。根据总细胞和目标细胞的测量数量,计算得到目标细胞纯度。

## 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,一般为不含钙离子和镁离子的磷酸盐缓冲液,配制要求和方法应根据具体细胞类型确定。

#### 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 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。

### 5.2 仪器设备

#### 5.2.1 流式细胞仪

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,并定期核查准确性和精密度。

#### 5.2.2 微量移液器

微量移液器量程为  $10\ \mu\text{L}$ ~ $1\ 000\ \mu\text{L}$ 。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  $3\ 000\ \text{r/min}$ 。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

的温度准确性和稳定性。

### 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

运送条件不应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 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,应尽快进行上机检测。如果无法尽快上机检测,应通过固定剂进行固定并适当条件保存,宜 4℃~8℃避光保存。

### 5.4 试验步骤

#### 5.4.1 工作条件

应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 细胞纯度的测量

##### 5.4.3.1 设置对照

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 仪器条件的设定

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。

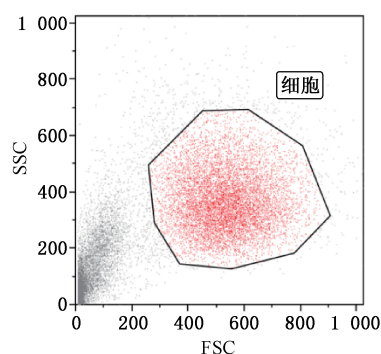
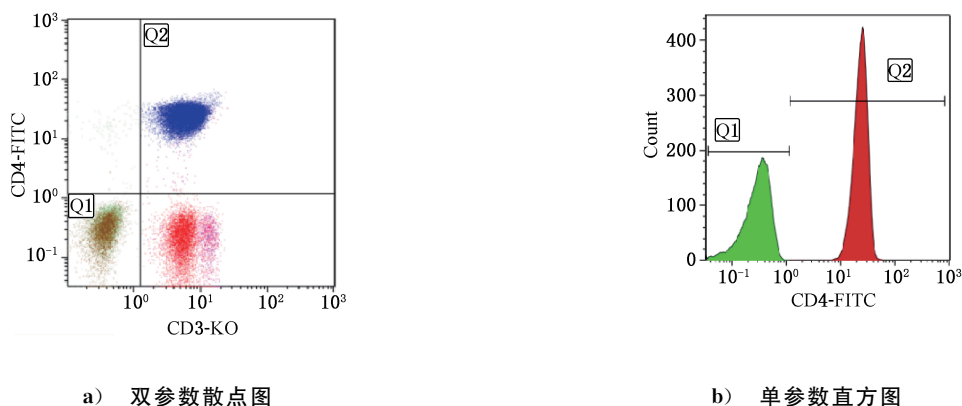


图 1 流式分析图谱中细胞 FSC/SSC 信号示意图

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,应进行荧光补偿。

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,目标细胞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 时,不能获取 1 000 个目标细胞采集数量,可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沉降。

5.5 数据分析

按照公式(1)计算目标细胞纯度:

$$P = \frac{N_g}{N_t} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- P —— 目标细胞纯度;
- N<sub>g</sub> —— 目标细胞数量,单位为个;
- N<sub>t</sub> —— 总细胞数量,单位为个。



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。

可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 1665—2017 流式细胞仪校准规范
  - [2] WS/T 360—2011 流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南
  - [3] YY/T 0588 流式细胞仪
  - [4] 杜立颖,冯仁青. 流式细胞术(第二版)[M]. 北京大学出版社,2008.
  - [5] 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.
- 

