

《细胞计数标准物质研制（生产）技术要求》

规范编写说明

一、任务来源

本规范制定任务由国家市场监督管理总局计量司于 2024 年下达至全国标准物质计量技术委员会（市监计量发【2024】40 号）。

二、编写的必要性和重要性

本项目面向我国中长期科学和技术发展规划的重要需求，紧跟国际细胞计量发展的大趋势，以细胞计数标准物质为研究对象，整合当前细胞纯化、细胞制备与储存、细胞计数、标准物质溯源性建立等前沿技术方法，为细胞计数标准物质研制提供技术依据，让细胞计数标准物质的研制过程有规可循、有范可依。

细胞计数测量为我国生物经济发展提供支撑。《“十四五”生物经济发展规划》提出，我国要加快开展前沿生物技术创新，发展基因诊疗、干细胞治疗、免疫细胞治疗等新技术。细胞计数精准测量在生物医药、细胞与基因治疗等重点领域中的细胞计数、仪器校准、质量控制、方法开发、市场监管等方面的应用非常广泛。细胞计数标准物质是标准物质体系中的重要组成部分，是建立国家细胞数目测量溯源体系的量值载体，是实现全球测量结果可靠、可比与互认的基本保障。细胞计数标准物质可为 CAR-T 等细胞制造过程中提供精确的细胞数目、细胞种类及比例参比，同时也可在抗体发现中作为准确的检测靶标，在临床检验中评估疾病的发生发展和预后。重视细胞计数标准物质的发展无疑将有效保障我国生物经济的快速高质量发展。

细胞计数标准物质的发展现状和需求。全球范围内，细胞标准物质的发展势头已度过萌芽阶段加速发展。2021 年国际物质的量咨询委员会（CCQM）第 26 次会议中提出，细胞分析工作组（CAWG）未来十年的目标是：以细胞计数或浓度为测量对象，支持标准物质的开发、鉴定和分类。国际上，英国国家生物制品检定所（NIBSC）研发出 FITC CD4 Positive Control Cells（SS-319/20），美国国家标准与技术研究院（NIST）开发有 Living Yeast Cell Reference Material（RM 8230），美国药典（USP）有 CD34⁺ Cell Enumeration System Suitability（16-34 CD34⁺

cells/ μ L)(1084292)。国内可检索到的细胞计数标准物质有 CD4⁺细胞占总淋巴细胞计数比例标准物质：GBW(E)090938 和 GBW(E)091240，国家药品标准物质冻干型人 T/B/NK 淋巴细胞国家参考品（流式细胞法）360022 等。

目前急需发展细胞计数标准物质用于细胞测量仪器计量校准，以及细胞计数测量结果的质量控制。一方面，原国家质检总局印发的 JJF 1665-2017《流式细胞仪计量校准规范》中明确规定：流式细胞仪校准需要使用淋巴细胞计数标准物质；另一方面，为解决不同实验室之间细胞计数测量结果一致性较差的问题，卫生部印发 WS/T 360-2011《流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南》，明确要求实验室至少每月应该开展一次室内质控检测，应采用具有特定细胞比例的外周血标本质控样本。综上，细胞计数标准物质的研制发展是未来细胞计量的主要内容，也是保障生物医药产业健康发展的基础。

细胞计数标准物质的研制亟待规范化。建立健全细胞分析检测仪器的检测校准和细胞药物的计量溯源体系的关键在于标准化的细胞标准物质的研究方法。细胞计数标准物质既要具备标准物质的量值溯源性，又要具备稳定性、可靠性、重复性和广泛适用性等特点，而复杂性、异质性及脆弱性是细胞的固有性质。当前，细胞计数标准物质的制备、储存技术没有统一标准要求，细胞计数标准物质的特性量值也没有明确，最重要的细胞计数测量方法和溯源性没有明确。细胞计数标准物质的研制是未来国际细胞计量工作的主要方向，但是当前全球范围内并无一套符合细胞计数标准物质研制需要，能指导技术人员对细胞计数标准物质制备、定值、评定的纲领性规范。

围绕细胞计数标准物质的研制目标，根据市场上的实际需求标准，依据编制团队前期工作积累，提出细胞计数标准物质研制技术规范的研究内容：

(1) 细胞计数标准物质原料制备。细胞计数标准物质研制所需要的原料细胞应当满足国家生物安全、《中华人民共和国人类遗传资源管理条例》等规范的要求，同时应注明原料细胞的物种来源、细胞系、基因修饰情况、是否涉及临床样品等信息。原料细胞的选择应满足标准物质的制备需求：适用性、代表性、容易获得和复制。应根据标准物质的预期用途、特性量值的可复制性，需要保证目的细胞具有可靠的纯度，应采用适宜的细胞纯化技术：流式细胞分选技术、磁性分选技术等。

(2) 细胞计数标准物质保存技术。细胞脆弱，常规条件下难以长久储存，

应建立对应的储存方法以保证细胞计数标准物质的特性量值稳定、准确。保存技术应维持细胞形态、特性量值在 4℃、-20℃短期稳定，在-20℃、-80℃长期稳定（不少于半年）。

（3）细胞计数标准物质的关键量值的选择。根据 GB/T 39730-2020《细胞计数通用要求 流式细胞测定法》、GB/T 42076.1-2022/ISO 20391-1:2018《生物技术 第1部分：细胞计数方法通则》等国家标准文件，结合生物医药产业中的实际需求，细胞计数标准物质的特性量值主要是细胞浓度、特定细胞比例。应根据实际需要确定细胞计数标准物质的特性量值，特性量值可溯源至自然单位 l 和国际单位制长度基本单位 m。

（4）细胞计数标准物质的定值方法和溯源性建立。根据 GB/T 39730-2020《细胞计数通用要求 流式细胞测定法》、GB/T 42076.1-2022/ISO 20391-1:2018《生物技术 第1部分：细胞计数方法通则》等国家标准文件，要求使用直接细胞计数方法建立细胞计数标准物质质量值溯源性。（a）流式细胞测定法：细胞样品悬液中的单个细胞在狭窄的液流中被激光照射后会反射或发射出光信号，流式细胞仪的检测器可接受光信号，获得细胞数目及其他信息。为获得样品中目标细胞的实际个数（浓度），可以采用计数标准微球法得到待测样本中目标细胞的实际个数（浓度），通过与国家有证微球计数标准物质的比较建立细胞总数（浓度）量值的溯源性。可结合细胞分类计数，获得待测样本中不同类型细胞的实际比例建立细胞比例量值的溯源性。（b）显微计数法：显微计数法通常使用细胞计数板（血细胞计数器）进行显微镜下的细胞计数。为获得样品中目标细胞的绝对数量（浓度），建立计数量值的溯源性，显微计数过程中样品不能过度稀释，同时需要使样品分散良好。（c）随着技术的进步，经验证过的细胞绝对数目测量技术、仪器也可用于细胞计数标准物质的定值过程。

（5）不确定度评定需要注意的内容。除均匀性、稳定性引入的不确定度之外，细胞标准物质的定值过程中引入的不确定度也必须考虑在内。如采用冻干技术制备的细胞计数标准物质在复溶过程中体积引入的不确定度，以比较法定值的细胞计数标准物质需要考虑目的细胞获取个数和微球获取个数引入的不确定度等。

综上所述，迫切需要发展细胞计数标准物质的研制计量技术，编撰《细胞计数标准物质的研制计量技术规范》让细胞计数标准物质的研制过程有规可循、有

范可依。《细胞计数标准物质的研制计量技术规范》将保障细胞分析仪器的量值统一，保证检测结果的有效性、可比性及国际国内互认度，提升检测结果的准确性、可靠性，不断提高涉及医疗安全和社会稳定等领域的检测技术和科研能力。

三、编写过程

1. 前期工作基础

本项目提出立项的《细胞计数标准物质的研制计量技术规范》中主要技术已应用于 GBW(E)091240 淋巴细胞 CD4⁺细胞占总淋巴细胞计数比例标准物质的研制。经市场化验证，该标准物质适用于市面上绝大多数流式细胞仪校准，当前已应用于数百台不同厂家流式细胞仪的校准。依托于该细胞标准物质的计量校准服务覆盖国内生物医药领域中多家头部企业，包括复星凯特生物科技有限公司、广州邦德盛生物科技有限公司、深圳市华测计量技术有限公司，中检（河南）计量检测有限公司，华谱（上海）检测技术有限公司等多家生物医药和检测公司。

承担单位具备仪器设备硬件、规范编撰经验、科学研究能力等基础。所在实验室是国家市场监管重点实验室（生物分析计量溯源），实验室具备完善的科研平台和细胞标准物质制备平台，拥有包括超分辨显微镜、流式细胞仪、酶标仪、电化学工作站、超速离心机、光谱分析仪、荧光显微镜、原子力显微镜等在内的先进仪器，配备生物二级实验室，万级无尘细胞培养实验室。

编写组由具有多年细胞分析及细胞计数标准物质研制经验的专家组成，曾研制出 GBW（E）090938、GBW（E）091240 两种 CD4⁺T 淋巴细胞占总淋巴细胞计数比例标准物质，编制组成员包含国家市场监督管理总局标准物质评审专家，参与审定多个标准物质，具有丰富经验。

2. 规范编制时间节点

2024 年 1-2 季度：完成项目中涉及的细胞富集、保存技术的系统性梳理；

2024 年 3-4 季度：完成项目中涉及的细胞计数量值溯源性技术系统性归纳；

2025 年 1-2 季度：完成《细胞计数标准物质的研制计量技术规范》所有内容的撰写，并开展相关内容的意见征询工作；

2025 年 3-4 季度：完成《细胞计数标准物质的研制计量技术规范》的送审答辩工作，保障项目的如期完成。

四、编写依据

本规范主要参考以下已发布的计量技术规范，并在要求方面保持系统协调与一至。

JJF 1001 通用计量术语及定义

JJF 1059.1 测量不确定度评定与表示

JJF 1186 标准物质认定证书和标签内容编写规则

JJF 1218 标准物质研制报告编写规则

JJF 1265 生物计量术语及定义

JJF 1342 标准物质研制（生产）机构通用要求

JJF 1343 标准物质的定值及均匀性、稳定性评估

JJF 1854 标准物质计量溯源性的建立、评估与表达

JJF 1665 流式细胞仪校准规范

GB 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 42076.1 生物技术 细胞计数 第1部分:细胞计数方法通则（ISO 20391-1, IDT）

GB/T 39730 细胞计数通用要求 流式细胞测定法

GB/T 38506 动物细胞培养过程中生化参数的测定方法

WS/T360 流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南

YY/T0588 流式细胞仪

凡是注明日期的引用文件，仅标注日期的版本适用于本规范；凡是不注明日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修订本）适用于本规范。

五、规范的主要内容与技术关键

1. 范围

该部分明确了本规范的应用范围，说明了本规范内容适用于“研制策划、制备、均匀性评估、稳定性评估、定值、不确定度评定、研制报告和证书、保存和运输等要求”。

2. 规范性引用文件

该部分引用了国家现行计量技术规范、国家标准、卫生、医药等相关技术规范。

3. 术语和定义

该部分定义了细胞计数标准物质研制过程中涉及的术语定义、技术名称解释及来源。

4. 通用要求

4.1 研制要求

细胞计数标准物质的研制过程应该遵照 JJF 1342 及 JJF 1343 对标准物质研制的相关要求。且由于其原材料细胞的特殊性,可能会直接或者间接来源于人体,因此应该同时满足国家生物安全、《中华人民共和国人类遗传资源管理条例》等的相关要求。

4.2 标准物质分类

使用不同来源的细胞用于制造细胞计数标准物质,可能面临不同的后续制备、检验过程,因此需要根据制备原料细胞的来源不同来进行分类。

编制组通过对国内、国际范围内的细胞计数标准物质进行调研以及对细胞计数标准物质的制备技术发展进行研究,细胞计数标准物质主要来源有人体细胞、动物细胞、永生化细胞系,基因修饰/编辑细胞等。

4.3 原料细胞的选择

该部分详细就说明不同来源的原料细胞需要进行不同的检测,具备不同的合格性要求:(1) 人体细胞需要注意伦理证明、病人知情同意书等合规性;无人源病毒 HIV、HBV、HCV 等,无菌等要求;应具有适用性、代表性、容易获得和复制,目标细胞可通过生物学、形态学、化学等手段区分。(2) 动物细胞可能需要注意动物福利问题;无动物源性病毒,无菌等要求;同样应具有适用性、代表性、容易获得和复制,目标细胞可通过生物学、形态学、化学等手段区分。

(3) 细胞系需要注意是否被其他细胞系污染,需经过鉴定,包括 STR 鉴定、同工酶分析、染色体核型分析和 PCR 法等以确保细胞系的准确性和稳定性。(4) 基因修饰/编辑细胞需要注明基因修饰的位点、修饰基因信息、所用基因编辑方

法，明确预期用途，可复制性、可获得性。

4.4 细胞计数方法选择

细胞计数标准物质的量值是细胞浓度、特定细胞比例。为确保量值准确性、溯源性，明确了细胞计数标准物质所用计数方法应参照现行国家标准、预期用途选用直接细胞计数方法，如流式细胞计数法、显微镜检计数法及其他等效可溯源方法。

该部分详细说明了流式细胞测定法、显微计数法的方法原理、检测步骤、计算方式。

5. 标准物质制备

5.1 目的细胞纯化

如果目的细胞数量在原料细胞中占比较少，必要时应根据目标细胞的生化、物理等特性选择适宜的细胞纯化技术，提高目的细胞的比例。应选取对细胞损伤较小的纯化技术，如：流式细胞分选、磁性分选技术等。

5.2 目的细胞纯度鉴定

该部分明确了如果目的细胞经过纯化，则需要根据其生化、物理等特性对其纯度进行鉴定，以评估纯化的效果是否满足制备需求，以及评估是否要多次纯化。

5.3 细胞计数标准物质制备工艺建立

该部分明确了细胞计数标准物质的保存工艺要求，需根据实际用途保证细胞的形态、抗原完整性等，以达到与实际样品的一致性。细胞脆弱易碎，传统情况下长期保存需要，根据编制单位的研究基础，建议采取冻干、液体等形式来保证细胞计数标准物质的稳定性和均匀性。

以冻干形式的 T 淋巴细胞为例，在冻干处理后 4 °C 保存条件下，其特性量值 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 细胞比例在 12 个月内不会发生明显变化，极大提升了细胞的稳定性，能满足细胞计数标准物质的研制需求。

长期稳定性

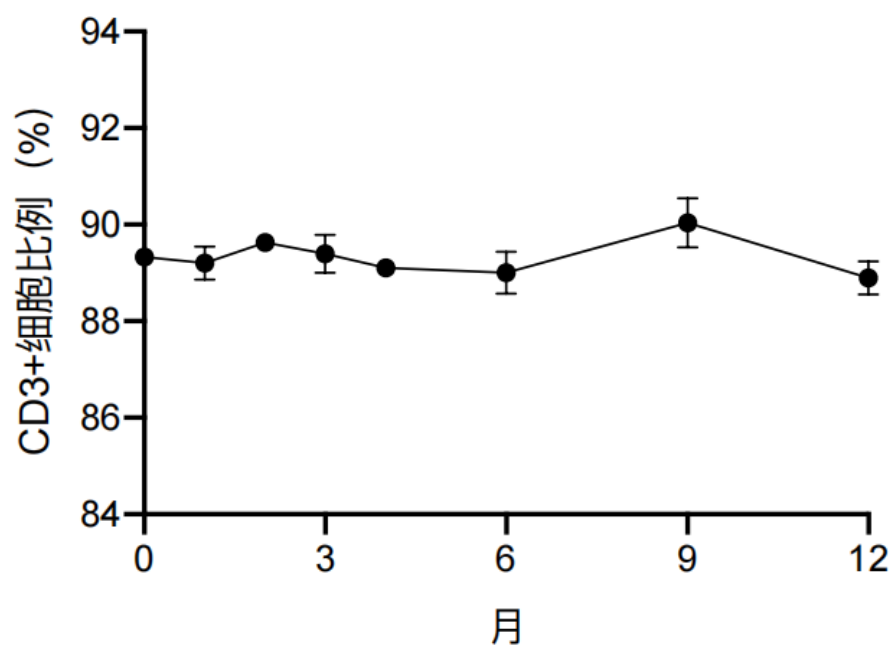


图 1 CD3⁺细胞比例在 4 °C 保存长期稳定性检测结果

长期稳定性

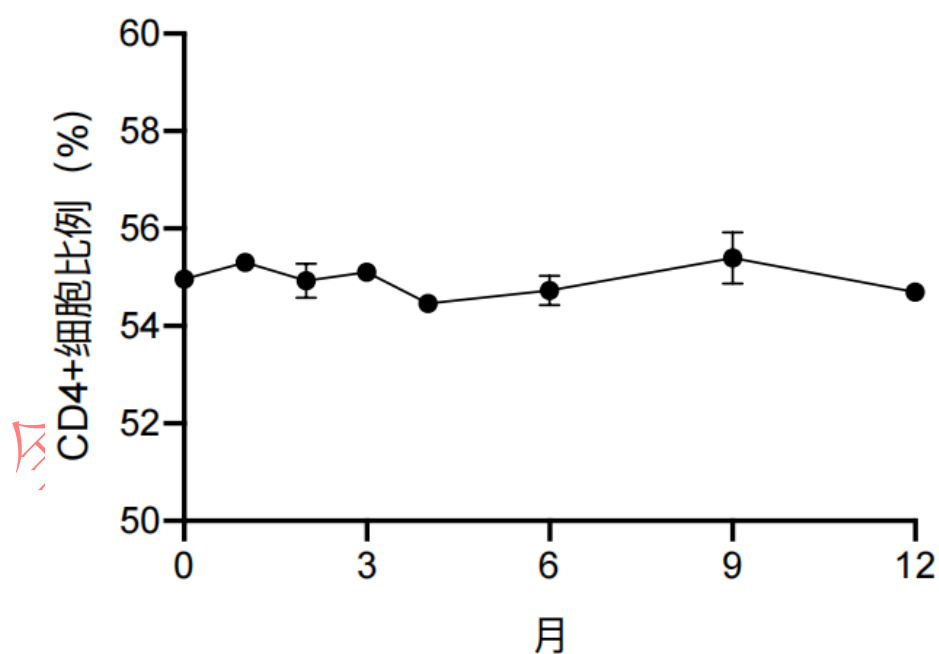


图 2 CD4⁺在 4 °C 保存长期稳定性检测结果

长期稳定性

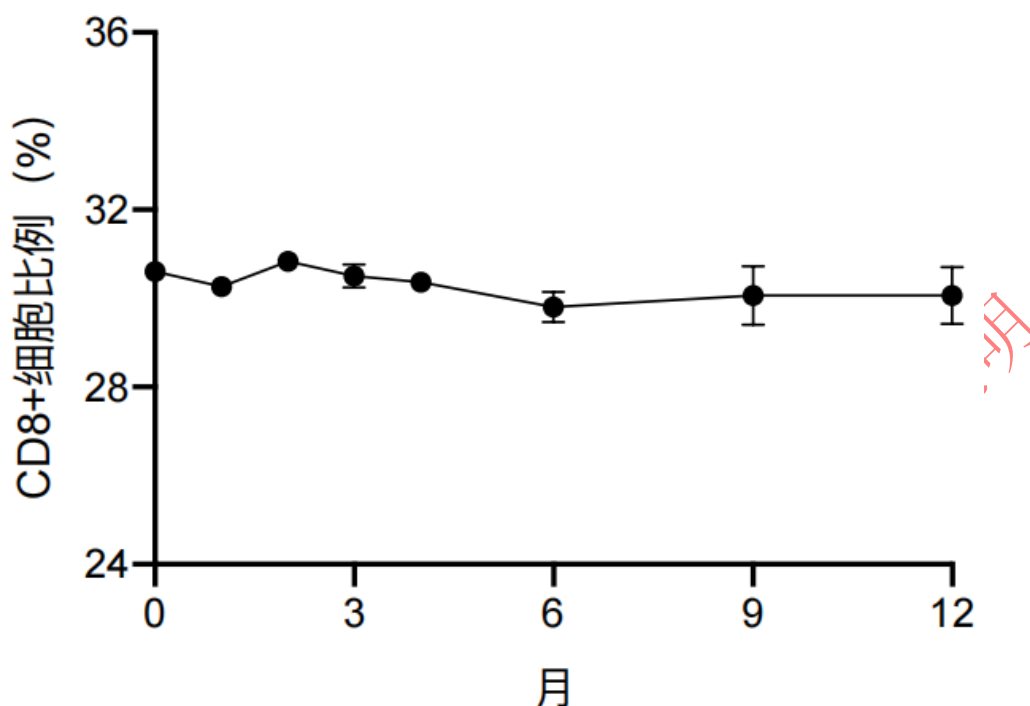


图 3 CD8⁺在 4 °C 保存长期稳定性检测结果

5.4 标准物质的包装

该部分明确了细胞计数标准物质包装材料的要求，细胞计数标准物质的包装材料对细胞、特定细胞及细胞计数标准物质的基质不应具有吸附性，避免影响量值。且能耐受-80 °C至 50 °C条件下的长期储存。

5.5 标准物质的使用

该部分说明了冻干形式、液体形式的细胞计数标准物质在研制使用时应当注意的特定实验操作。

6. 均匀性评估

该部分主要参考 JJF 1343 《标准物质的定值及均匀性、稳定性评估》的要求，对于均匀性评估方案进行详细描述。应根据细胞计数标准物质的类型、细胞种类、预期用途等制定均匀性评估方案，一般选择不低于定值方法精密度、具有足够灵敏度且能够溯源的测量方法，在重复性实验条件下做均匀性评估。

此外，细胞计数标准物质研制也需要对最小取样量、稀释倍率进行研究。在实际制备过程中，细胞计数标准物质可能具有多种目标细胞组分，需要进行全部组分的均匀性评估。

7. 稳定性评估

该部分主要参考 JJF 1343 《标准物质的定值及均匀性、稳定性评估》的要求，对于稳定性评估方案进行详细描述。短期稳定性应充分考虑恶劣运输条件和极限温度的影响，选择多个温度条件，至少评估 1 周时间的稳定性。长期稳定性原则上至少进行 6 个月时间的稳定性评估。针对细胞计数标准物质的特殊要求，需要进行开盖稳定性的研究。

稳定性评估方案应根据细胞计数标准物质的类型、细胞种类、预期用途等制定稳定性评估方案，一般选择不低于定值方法精密度、具有足够灵敏度且能够溯源的测量方法，在重复性实验条件下做稳定性评估。具有多种目标细胞组分，需要进行全部组分的稳定性评估。

8. 定值结果和不确定度合成

8.1 基本要求

该部分主要参考 JJF 1343 《标准物质的定值及均匀性、稳定性评估》的要求，对于定值方案进行详细描述。

8.2 细胞计数标准物质的特性值

该部分对细胞计数标准物质的特性值进行了明确的表述。

根据 GB/T 39730-2020 《细胞计数通用要求 流式细胞测定法》、GB/T 42076.1-2022/ISO 20391-1:2018 《生物技术 第 1 部分：细胞计数方法通则》等国家标准文件，结合生物医药产业中的实际需求，细胞计数标准物质的特性量值主要是细胞浓度、特定细胞比例。

8.3 计量溯源性要求

该部分说明应根据实际需要确定细胞计数标准物质的特性量值，特性量值可溯源至自然单位 1 或者国际单位制长度基本单位 m。参与量值溯源计算的所有计量器具（容器、仪器、设备等）均应经过计量检定或校准。

8.4 定值方法选择

该部分明确了细胞计数标准物质定值采用的具体方式。

8.5 定值方法的建立

该部分对定值方法建立进行了描述。应根据标准物质特性量值的特点建立或选择定值方法，应对方法的影响参数进行充分研究，确保定值方法的可靠性。当

建立参考测量程序进行细胞计数标准物质定值时，应参照相关规范建立方法并进行方法确认。以流式细胞测定法为例列举了定值方法建立过程中应注意的影响因素。

8.6 定值方法的确认

该部分明确了定值方法建立后，应对方法精密度、方法再现性、方法特异性等进行验证。

8.7 数据评估

细胞计数标准物质的定值数据审核、数据评估和统计处理应按 JJF 1343、JJF 1059.1 的要求进行。

8.7 定值结果及不确定度

该部分针对细胞计数标准物质的定值特点，对定值及不确定度评估进行了说明。以当前细胞计数国家有证标准物质所采用的流式测定法、显微计数法为例，详细介绍了以非统计分析的方法引入不确定度的来源、计算方式。

9. 文件编制

针对细胞计数标准物质的特点，该部分对细胞计数标准物质的研制报告、证书和标签的内容、要求进行了说明。

10. 保存和运输

针对细胞计数标准物质的特点，该部分对细胞计数标准物质的保存和运输要求进行了描述。