

JJF

中华人民共和国国家计量技术规范

JJF ××××—202×

细胞计数标准物质研制（生产）技术 要求

Technical Requirements for Production of Cell Count Reference Materials

（征求意见稿）

202×-××-×× 发布

202×-××-×× 实施

国家市场监督管理总局 发布

细胞计数标准物质研制 (生产) 技术要求

JJF ××××—202×

Technical Requirements for

Production of Cell Count Reference Materials

归口单位：全国标准物质计量技术委员会

主要起草单位：上海市计量测试技术研究院

中国计量科学研究院

参加起草单位：赛多利斯（上海）贸易有限公司

本规范委托全国标准物质计量技术委员会负责解释

本规范主要起草人：

*** (*****)

参加起草人：

*** (*****)

国家标准物质计量技术委员会规范征求意见稿

目 录

引 言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	2
3.1 细胞浓度	2
3.2 细胞计数	2
3.3 细胞悬液	2
3.4 标准微球	2
3.5 直接细胞计数	2
3.6 细胞染色	2
4 通用要求	2
4.1 研制要求	2
4.2 细胞计数方法选择	2
5 研制策划	3
5.1 需求评估	3
5.2 预期性能要求	3
6 标准物质制备	3
6.1 原料细胞的选择	3
6.2 目的细胞纯化	4
6.3 目的细胞纯度鉴定	4
6.4 细胞计数标准物质制备工艺建立	4
6.5 标准物质的包装	4
6.6 标准物质的使用	4
7 均匀性评估	4
7.1 评估原则	4
7.2 评估方案	4
7.3 最小取样量	5
7.4 稀释倍率	5
8 稳定性评估	5
8.1 评估原则	5
8.2 短期稳定性评估	5
8.3 长期稳定性评估	6
8.4 开盖稳定性	6
8.5 评估方案	6
9 计量溯源性	6
9.1 计量溯源性描述	6
9.2 计量溯源性要求	6
10 定值结果和不确定度合成	7
10.1 基本要求	7
10.2 细胞计数标准物质的特性值	7

10.3 定值方式选择	7
10.4 定值方法选择与误差来源	7
10.5 定值方法的建立	8
10.6 细胞计数要求	8
10.7 数据评估	8
10.8 定值结果及不确定度	8
11 文件编制	9
11.1 研制报告	9
11.2 证书和标签	9
12 保存和运输	9
附录 A	10
附录 B	11

国家标准物质计量技术委员会规范征求意见稿

引 言

以真核细胞为基础开发的细胞计数标准物质是细胞数量测量量值溯源与传递的载体，广泛应用于生物医药、细胞与基因治疗等重点领域中的仪器校准、质量控制、方法开发等方面。

细胞计数结果的准确性高度依赖于量值可靠的细胞计数标准物质，其研制的特殊性主要表现在：1) 细胞类型多样且结构复杂，对保障细胞标准物质的量值准确性和可复制性提出了严苛要求；2) 细胞固有的脆弱性导致其易破裂、易失活，需突破量值保持、长期储存及运输条件等关键技术瓶颈。

本规范依据 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、评估与表达计量技术规范》、JJF 1665《流式细胞仪校准规范》等文件，结合细胞的特性及细胞计数标准物质的特点制定，对细胞计数标准物质研制中的关键技术要素，包括研制策划、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、保存和运输要求等进行了阐述和要求。

本规范为首次发布。

细胞计数标准物质研制（生产）技术要求

1 范围

本规范规定了真核细胞计数标准物质的研制策划、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、保存和运输要求等。

可根据标准物质原料细胞的来源不同，将细胞计数标准物质分为：通过健康人体来源、动物细胞、永生化细胞系、基因修饰/编辑获得细胞等。

本规范适用于采用直接细胞计数法定值的细胞计数标准物质的研制工作。其他细胞计数标准物质可参照执行。

2 规范性引用文件

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/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

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

3 术语和定义

JJF 1005、JJF 1265 中界定的及以下术语和定义适用于本规范：

3.1 细胞浓度 cell concentration

单位体积的细胞数。

注：通常用于悬浮细胞。【GB/T 42076.1-2022，3.6】

3.2 细胞计数 cell counting

确定细胞数的测量过程。【GB/T 42076.1-2022，3.8】

3.3 细胞悬液 cell suspension

细胞分散在液体基质中而形成的悬液。【GB/T 42076.1-2022，3.9】

3.4 标准微球 standard particle

大小一致和（或）标有强度一致、恒定不变荧光素的微球，用于流式细胞仪校准。【YY/T 0588-2017，3.9】

3.5 直接细胞计数 direct cell counting

对单独事件检测到的一个（或几个）信号的计数方法。

注：每个单独事件代表理想测量中的单个细胞。

【GB/T 42076.1-2022，3.12】

3.6 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。【GB/T 39730-2020，3.1.2】

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遵照 JJF 1342 及 JJF 1343 对标准物质研制的相关要求，同时应满足国家生物安全、《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 细胞计数方法选择

应根据细胞计数标准物质的预期用途，选择合适的细胞计数方法，建立溯源链。如应用于流式细胞仪校准用的淋巴细胞计数标准物质可采用流式细胞测定法

中的计数标准微球法、显微镜检计数法等直接细胞计数方法。

5 研制策划

细胞计数标准物质

5.1 需求评估

细胞计数标准物质的研制开始，应从国家需要、市场监管、行业需求、标准需求等方面进行需求分析；根据需求分析确定细胞计数标准物质的预期用途和使用场景；对细胞计数标准物质研制过程中关键节点进行控制，包括：原料细胞种类、计数方法、包装储存等，以确定研制准物质类型。

5.2 预期性能要求

细胞计数标准物质的特性值、不确定度、包装方式、稳定性等应能够满足细胞计数分析的仪器校准与质量控制要求。

5.3 研制可行性评估

5.3.1 应评估细胞计数标准物质的可复制性、安全性、原料可获得性和可持续供应能力。

5.3.2 应评估定值方法的科学性及计量溯源性。

6 标准物质制备

6.1 原料细胞的选择

6.1.1 应根据细胞计数标准物质的预期用途选择合适的原料细胞，原料细胞应满足适用性、代表性、容易获得及可复制要求。

6.1.2 来源于人体的原料细胞应包括无菌性、无支原体、人类免疫缺陷病毒（HIV）、乙型肝炎病毒（HBV）、丙型肝炎病毒（HCV）、梅毒螺旋体等具有传染性病毒检测结果，应具备伦理批件、知情同意书等合规性文件。

6.1.3 若来源于动物源样本，应具有特定动物源型病毒检测结果、无菌性、无支原体等检测结果证明。

6.1.4 若来源于细胞系，原料细胞应来源于专门的细胞保藏机构，溯源信息完整，应具有 STR 鉴定、同工酶分析、染色体核型分析和 PCR 法等证明以确保细胞系的准确性和稳定性，避免原料细胞被其他细胞污染。

6.1.5 若来源于基因修饰/编辑细胞，应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。

6.2 目的细胞纯化

异质性是细胞的固有特性，应根据标准物质的预期用途和特性量值的可复制性要求，确保目的细胞具有可靠的纯度，应采用细胞损伤小，不会影响后续细胞特性量值检测的细胞纯化技术（如流式细胞分选技术、磁性分选技术等），以满足标准物质的研制需求。原料细胞中的非目的细胞组分不应影响目标细胞量值测定产生影响。

6.3 目的细胞纯度鉴定

根据目的细胞的特性，选择合适的方法进行鉴定，鉴定策略应科学合理。通常可根据目的细胞所具备的独特形态、特异性抗原表达情况等，采用适宜的方法评估纯化后目的细胞的纯度。

6.4 细胞计数标准物质制备工艺建立

应根据标准物质的预期用途，采用适当的工艺保证细胞形态、抗原完整性等。制备过程可采取冻干、液体等工艺来保证细胞计数标准物质的稳定性和均匀性。

6.5 标准物质的包装

包装应满足细胞计数标准物质的预期用途，应选用具备免吸附特性、良好密封性，并可长期耐受-80℃至50℃储存条件。

6.6 标准物质的使用

6.6.1 真空冻干形式细胞计数标准物质使用时应注意，储存条件与使用环境温度、气压等差异过大带来的开盖后气流，应小心避免冻干细胞损失引起的量值不准确。

6.6.2 以液体形式制备的细胞计数标准物质应避免冻融造成的细胞破裂，引起量值不准确。

7 均匀性评估

7.1 评估原则

应按照 JJF 1343 评估细胞计数标准物质的均匀性。

7.2 评估方案

7.2.1 一般要求

应根据细胞计数标准物质的类型、细胞种类、预期用途、制备数量等制定均匀性评估方案，一般选择不低于定值方法精密度、具有足够灵敏度的测量方法，在重复性实验条件下做均匀性评估。应做好均匀性评估实验的质量控制、仪器性能确认。

7.2.2 具有多种目标细胞组分，应进行全部组分的均匀性评估。

7.2.3 应充分考虑细胞在缓冲液中的沉降问题，在均匀性评估前应进行充分混匀。

7.2.4 应对均匀性检测数据进行异常值检查。

7.3 最小取样量

7.3.1 细胞计数标准物质单元可多次取样检测时，需要进行最小取样量测试。最小取样量的检测应满足均匀性实验要求。

7.3.2 应根据实验建立不同取样量重复检测结果相对标准偏差与取样量之间的关系，以确定最小取样量。

7.3.3 冻干形式的细胞计数标准物质应将标准物质充分溶解后，根据实验确定最小取样量。

7.4 稀释倍率

细胞浓度对于检测结果影响较大，细胞计数标准物质的研制过程应进行稀释倍率优化实验。应根据实验建立不同稀释倍率重复检测结果相对标准偏差与稀释倍率之间的关系，稀释后的细胞计数标准物质重复测定结果相对标准偏差不应大于 3%。

8 稳定性评估

8.1 评估原则

应按照 JJF 1343 评估细胞计数标准物质的稳定性。

8.2 短期稳定性评估

8.2.1 选择模拟运输条件下，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 周时间中的短期稳定性。

8.2.2 具有多个目标细胞组分的细胞计数标准物质应同时评定所有组分的短期稳定性。宜取稳定性最短的细胞组分的稳定性时间作为短期稳定性时长。

8.3 长期稳定性评估

8.3.1 在规定的细胞计数标准物质长期保存条件下, 应进行至少进行 6 个月时间的长期稳定性评估。

8.3.2 具有多个目标细胞组分的细胞计数标准物质应同时评定所有组分的长期稳定性。宜取稳定性最短的目标细胞组分的稳定性时间作为长期稳定性时长。

8.4 开盖稳定性

8.4.1 对于可多次取样的细胞计数标准物质应明确在首次开封后, 在推荐储存条件下细胞浓度或比例保持稳定的最大时间。

8.4.2 开盖稳定性测试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。

8.4.3 冻干形式的细胞计数标准物质可能由于吸潮等因素对样品形态造成破坏, 不宜多次取样。

8.4.4 溶液形式细胞计数标准物质开盖稳定性验证应考虑溶剂挥发、微生物污染、非目标细胞组分不稳定带来的特性量值变化。

8.5 评估方案

8.5.1 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。稳定性评估一般采用与均匀性评估相同的方法。

8.5.2 具有多种目标细胞组分, 应进行全部组分的稳定性评估。

8.5.3 需要对稳定性评估数据进行异常值检查。

9 计量溯源性

9.1 计量溯源性描述

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 1 和国际单位制长度基本单位 m。

9.2 计量溯源性要求

9.2.1 应依据 JJF 1854 的要求, 对细胞计数标准物质特性量值的计量溯源性进行

评估，应根据不同的定值方法建立测量结果的计量溯源性。

9.2.2 参与量值溯源计算的所有计量器具（容器、仪器、设备、血球计数板等）均应经过计量检定或校准。

9.2.3 细胞计数标准物质定量涉及的计数微球等应采用国家有证标准物质。

10 定值结果和不确定度合成

10.1 基本要求

细胞计数标准物质的定制方法应符合 JJF 1343 对标准物质定值的要求。

10.2 细胞计数标准物质的特性值

细胞计数标准物质的特性值是指细胞浓度、特定细胞比例等。

10.3 定值方式选择

10.3.1 细胞计数标准物质的定值方法应具有清晰的计量溯源性。

10.3.2 细胞计数标准物质定值采用一种方式进行定值，可采用多家定值的方式进行定值，定值参加实验室应在定值研究前，提供独立于候选标准物质测量的、与待定值被测量有关的测量能力证明。能力证明可包括：以往相关能力验证结果、相关方法确认数据等。一家或多家实验室采用两种或以上不同原理进行定值，需进行方法学验证，不确定度应满足预期要求。

10.4 定值方法选择与误差来源

10.4.1 计数标准微球法

计数标准微球法误差来源有试剂质量、抗体特异性，仪器设置（如圈门参数）和数据分析方法。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，向待测细胞悬液中添加已知数量的计数微球。可结合不同细胞的属性差异（细胞死活染色、特定抗原标记、特定细胞形态）对细胞分类计数，获得待测样本中不同类型细胞的实际个数或浓度。

10.4.2 显微计数法

显微计数法的主要误差包括样本稀释误差、填充量不一致、操作人员差异、显微镜聚焦偏向以及细胞聚集体计数误差等。为确保获得准确的细胞的绝对数量（浓度）并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，保证样品充分分散。

10.4.3 选用其他细胞计数方法应与已有方法比对实验后使用，需进行方法学充分验证，包括溯源性、精密度、预期不确定度、误差来源等研究。

10.5 定值方法的建立

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。定值方法建立后，应结合细胞计数标准物质的预期用途设计实验对方法进行考察。一般包括：方法精密度、方法再现性、方法特异性等。

注：

以流式细胞测定法为例，定值方法建立需要考虑以下因素对计数结果的影响：

1. 流式细胞仪荧光通道参数的设置，包括电压、补偿、设门等；
2. 荧光素偶联抗体特异性、荧光染料特异性；
3. 荧光素偶联抗体、荧光染料的染色时间；
4. 荧光素偶联抗体、荧光染料的工作浓度；
5. 流式细胞仪信号采集速率、数目。

10.6 细胞计数要求

8.6.1 应当根据细胞计数标准物质的预期用途确立细胞计数方法；

8.6.2 应建立细胞数量与自然单位 1 或国际单位制长度基本单位 m 的溯源链

8.6.2 直接细胞计数方法（包括总细胞计数和细胞分类计数）要求细胞能够很好地分散从而取得最佳的结果。应尽可能建立细胞计数标准物质的计数程序保证样本能充分分散，没有细胞碎片、细胞聚集体和细胞团。

10.7 数据评估

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。

10.8 定值结果及不确定度

10.8.1 标准物质的定值结果及不确定度应由研制机构按照 JJF 1343、JJF 1059.1 进行评定和表示，不可分包。

10.8.2 数值修约规则按照 GB 8170 进行。

10.8.3 不确定度必须建立在合理的均匀性、稳定性评估及定值测量的基础上，应将均匀性引入的不确定度 u_{bb} ，稳定性引入的不确定度 u_s 均进行评估。

10.8.4 细胞计数标准物质的不确定度应包含 u_{bb} 、 u_s 、数据统计引入的不确定度 u_{char1} 、

以非统计分析的方法评定出的不确定度 u_{char2} 。

10.8.4.1 细胞计数标准物质的多种目标组分应分别进行定值及不确定度评估。

10.8.4.2 计数微球法以非统计分析的方法引入的不确定度评估通常包括：细胞数量、计数微球、微球标准物质、样本体积及稀释过程引入的不确定度。

10.8.4.3 显微镜计数法以非统计分析的方法评定出的不确定度评估通常包括：血球计数板计数池体积误差、移液器吸液体积误差、显微镜测量视野误差、环境温度引入的细胞悬液蒸发导致体积变化、稀释过程引入等。

11 文件编制

11.1 研制报告

研制报告应符合 JJF 1281 的要求。研制报告应描述细胞计数标准物质的研制策划、方法确认及溯源性、细胞原料来源、鉴定、制备过程、质量控制、均匀性评估、稳定性评估、定值、不确定度评定、标物形式、包装和保存等信息；应注明影响标准物质使用的信息，包括生物安全信息等。

11.2 证书和标签

证书和标签应符合 JJF 1186 的要求。证书中应当注有细胞来源、细胞种类，以及使用方法，使用过程中的操作要求、废弃物处置等生物安全信息。标签上应注明细胞计数标准物质全称、批号、储存要求、标准物质编号、生产单位等。

12 保存和运输

细胞计数标准物质的保存及运输应符合 JJF 1342 对标准物质保存及运输的要求。细胞计数标准物质的运输，需要满足稳定性试验中确定的环境条件。此外，涉及到来源于健康人体、病人样本的细胞计数标准物质还应遵守《中华人民共和国人类遗传资源管理条例》，世界卫生组织《感染性物质运输指南》及国际民航组织《危险性物品航空安全运输技术细则》等要求。

附录 A

计数标准微球法 方法原理

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，按照公式（1）计算得到待测样本中目标细胞的实际个数或浓度。用于细胞计数标准物质研制的计数标准微球需采用国家有证标准物质。

计算公式：

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

C_{RS} ：目标细胞浓度，单位个每微升（个/ μL ）；

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体积等添加物体积），单位为微升（ μL ）；

D ：样本稀释倍数。

公式来源：GB/T 39730-2020《细胞计数通用要求 流式细胞测定法》。

附录 B

显微计数法 方法原理

细胞悬液制备：将原料细胞通过离心等方式富集沉淀后，采用无菌 PBS 缓冲液进行重悬制备成细胞悬液，轻柔振荡保证细胞悬液分散均匀。可将细胞悬液进行梯度稀释（如 100 μL 细胞悬液加入 900 μL PBS 缓冲液中 10 倍梯度稀释），选取适宜的稀释倍数（细胞个数宜 10^6 个/mL 左右）进行稀释。

细胞计数：使用血球计数板进行细胞计数操作，应保证血球计数板、盖玻片清洁。将盖玻片置于血球计数板中心计数方格正上方，将稀释好的细胞悬液轻柔混匀，使用微量移液器取适量细胞悬液（一般为 10 μL ，以能够铺满计数方格且不外溢为宜）沿着盖玻片边缘缓慢加入，避免气泡产生，静置 2 至 3 分钟后在显微镜下进行计数，需重复计数 3 次取平均值作为计数结果记录。细胞计数标准物质的研制过程往往需要对原始记录进行核查，因此建议使用显微镜的拍照功能对计数视野进行拍照记录。

当前广泛使用的血球计数板有两种类型，分别是 16 中方格 \times 25 小方格型号（希利格式）和 25 中方格格 \times 16 小方格型号（汤麦式），两种型号均包含 400 个小方格。用于细胞计数标准物质研制的血球计数板需经过计量校准。

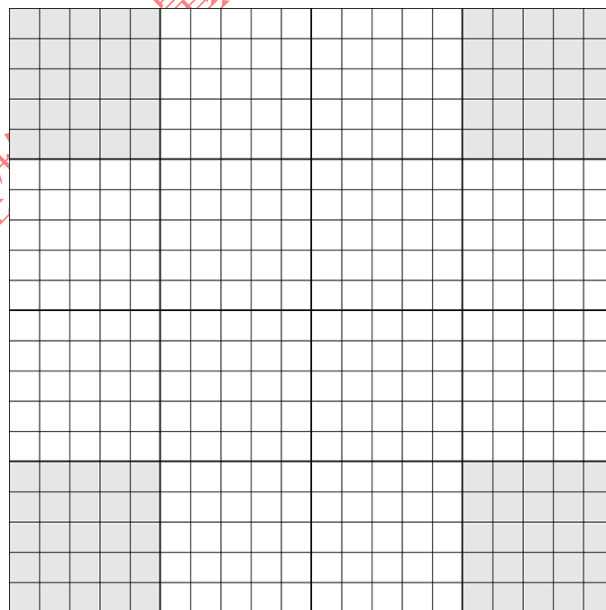


图 1. 希利格式血球计数板计数室形态

使用希利格式血球计数板计数通常选取计数室四角中方格进行计数（图 1），共有 100 个小方格。的计数结果按照公式（2）计算：

$$N = \frac{A \times 10^4 \times d \times 400}{100} \dots\dots\dots (2)$$

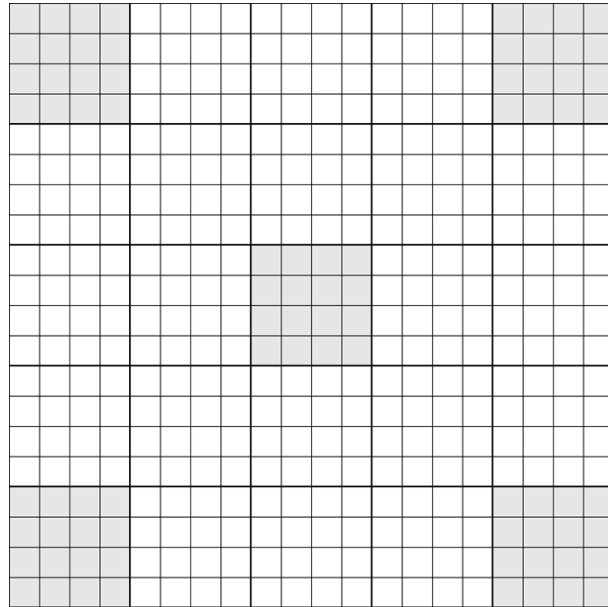


图 2. 汤麦式血球计数板计数室形态

使用汤麦式血球计数板计数通常选取计数室四角中方格加中央中方格进行计数（图 2），共有 80 个小方格。计数结果按照公式（3）计算：

$$N = \frac{A \times 10^4 \times d \times 400}{80} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

N ：每毫升悬浮液中的细胞数，单位为个；

A ：计数板观察到细胞数，单位为个；

d ：细胞溶液的总稀释倍数。

计算结果表示为整数。

公式来源：GB/T 38506-2020《动物细胞培养过程中生化参数的测定方法》。