



中华人民共和国国家标准

GB/T 42076.1—2022/ISO 20391-1:2018

生物技术 细胞计数 第 1 部分：细胞计数方法通则

Biotechnology—Cell counting—
Part 1: General guidance on cell counting methods

(ISO 20391-1:2018, IDT)

2022-12-30 发布

2022-12-30 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

目 次

前言	I
引言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 细胞计数的一般原则	4
4.1 概述	4
4.2 总细胞计数	4
4.3 细胞分类计数	4
4.4 直接细胞计数	4
4.5 间接细胞计数	4
5 细胞计数的注意事项	4
5.1 细胞计数方法的选择	4
5.2 选择细胞计数方法的注意事项	5
5.3 取样	5
5.4 细胞计数的样本制备	6
5.4.1 环境因素	6
5.4.2 程序	6
5.4.3 试剂和质量稳定性	6
5.5 测量	7
6 确认和验证	7
6.1 仪器确认	7
6.2 方法确认和验证	7
6.3 标准物质	7
6.3.1 有证标准物质	7
6.3.2 内部标准物质	8
6.3.3 标准物质的使用	8
7 数据处理、分析和报告	8
7.1 数据处理和分析	8
7.1.1 通则	8
7.1.2 图像处理与分析	8
7.1.3 圈门设定	8
7.1.4 重合校正	8
7.2 报告	8
附录 A (资料性) 常用细胞计数方法	10
附录 B (资料性) 不同测量目的的常用细胞计数方法	12
参考文献	13

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。

本文件是 GB/T 42076《生物技术 细胞计数》的第 1 部分。GB/T 42076 已经发布了以下部分：
——第 1 部分：细胞计数方法通则。

本文件等同采用 ISO 20391-1:2018《生物技术 细胞计数 第 1 部分：细胞计数方法通则》。

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。

本文件由全国生化检测标准化技术委员会(SAC/TC 387)提出并归口。

本文件起草单位：中国测试技术研究院、四川大学华西口腔医院、中国计量科学研究院、信达生物制药(苏州)有限公司、上海市计量测试技术研究院、四川省干细胞技术与细胞治疗协会、青岛瑞思德生物科技有限公司、通用生物(安徽)股份有限公司、四川新生命干细胞科技股份有限公司、上海交通大学、复旦大学、中国科学院动物研究所、深检集团(深圳)医学检验实验室。

本文件主要起草人：杨杰斌、周李华、叶德萍、田卫东、王晶、唐祥凯、乔倩、王董明、傅博强、肖伟敏、冉丹、孙登峰、赵同标、刘刚、蒋子敬、郭燕红、姜展樾、李妍、王越、马丽侠、孙洁林、多佳、李雪莲、陈梦梦、喻明军、樊春海、钱峰、杨国武。

引 言

细胞计数是一种基本的测量方法,它广泛地影响生物技术的许多方面,从生物制造到先进医疗。细胞数(或离散细胞数)通常表示为悬浮液中的细胞浓度(即单位体积细胞数)和黏附在一定表面的细胞面积密度(即单位面积细胞数)。细胞计数在评估基于细胞治疗的功效和疗效方面至关重要。生物反应器中的细胞浓度可以作为一个基于细胞制造过程中的质量保证的指标。许多基于细胞的生物分析都需要对各自的细胞计数结果进行归一化处理,以确保数据之间的相互可比。

GB/T 42076 拟由两个部分构成。

- 第1部分:细胞计数方法通则。第1部分为第2部分提供了理论基础,目的在于提供细胞计数需要遵守的一般原则和注意事项。
- 第2部分:量化计数方法性能的实验设计和统计分析。第2部分是第1部分的展开和具体操作及实施细节。

生物技术 细胞计数

第 1 部分:细胞计数方法通则

1 范围

本文件定义了生物技术领域细胞计数相关术语,描述了悬液中的细胞计数(通常是细胞浓度)和黏附在基质上的细胞计数(通常是细胞面积密度),提供了细胞计数方法(包括总数和分类计数,直接计数和间接计数)的一般原则,以及方法的选择和测量过程的关键注意事项,规定了数据处理、分析和报告的要求。

本文件适用于所有细胞类型的计数,包括哺乳动物和非哺乳动物(如细菌、酵母)细胞计数。

本文件不适用于组织切片或生物材料基质中的细胞计数。

现有不同领域/特定应用场景的细胞计数相关国际和国家标准。如适用,使用者操作时可以在其范围(特定的测量技术和/或应用场景)内参考现有标准。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

准确度 accuracy

被测量的测得值与其真值间的一致程度。

注 1:“测量准确度”不是一个量的概念,也不是量化的数值。当测量给出较小的测量误差时,表明该测量更准确。

注 2:“测量准确度”有时被理解为赋予待测量的测得值之间的一致程度。

[来源:ISO/IEC 指南 99:2007,2.13,有修改]

3.2

细胞团 agglomerate

两个或多个细胞微弱地团簇在一起,而被检测为一个较大的物体。

注:细胞团通常可以分离为单个细胞而不会对细胞产生显著的损害。

3.3

细胞聚集体 aggregate

两个或多个细胞(紧密或松散地)聚集在一起,并被检测为较大的物体。

注:细胞聚集体一般较难分离成单个细胞。

3.4

面积密度 area density

单位表面的贴壁细胞数,通常表示为单位面积的细胞数。

3.5

属性 attribute

物理、化学、生物学或微生物特性或特征。

3.6

细胞浓度 cell concentration

单位体积的细胞数。

注：通常用于悬浮细胞。

3.7

细胞数 cell count

离散细胞的数量。

注：细胞数通常表示为细胞浓度(3.6)或面积密度(3.4)。

3.8

细胞计数 cell counting

确定细胞数的测量过程。

3.9

细胞悬液 cell suspension

细胞分散在液体基质中而形成的悬液。

3.10

碎片 debris

〈细胞悬液中〉细胞片段和/或生物或非生物来源的颗粒。

3.11

细胞分类计数 differential cell count

细胞亚群的数量,通过测量至少一个不同的细胞属性来与其他细胞亚群区分开。

注：一个细胞亚群的浓度可以表示为绝对浓度或相对于总细胞数或另一个预定群的相对数量(即百分比)。

3.12

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。

3.13

间接细胞计数 indirect cell counting

通过测量细胞群得到的一个(或一组)与细胞数相关联的信号,再根据特定的数学测量模型(如校准曲线)换算得到细胞数的计数方法。

3.14

定量限 limit of quantitation; LOQ

用特定的具有合适的精密度和准确度的分析方法,定量检测到的样品中分析物的最低量。

注：定量限描述了样品基质中低细胞含量水平的定量分析。

3.15

线性 linearity

在指定范围内,通过直接或间接的数学转换,证明测量结果与细胞计数成正比的能力。

3.16

被测量 measurand

拟测量的量。

[来源:ISO/IEC 指南 99:2007,2.3,有修改]

3.17

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重复测量所得示值或测得值间的一致程度。

[来源:ISO/IEC 指南 99:2007,2.15,有修改]

3.18

成比例性 proportionality

对一组测量,当某输入测量参数发生变化(所有其他输入量和测量条件保持不变),测量的期望值与输入测量参数之比保持不变的特性。

注:当一组测量值在给定输入范围内显示出成比例性时,这些测量值的期望值可以表示为输入参数乘以一个固定常数,而没有偏差项。

3.19

试剂 reagent

用于化学/生化分析或其他反应的物质。

3.20

标准物质 reference material**参考物质**

具有足够均匀和稳定的特定特性的物质,其特性适用于测量或标称特性检查中的预期用途。

注:赋值或未赋值的标准物质都可用于测量精密度控制,只有赋值的标准物质才可用于校准或测量正确度控制。

[来源:ISO/IEC 指南 99:2007,5.13,有修改]

3.21

参考方法 reference method

经过全面分析研究的测量程序,其所产生的值具有与其预期用途相称的测量不确定度,尤其用于评价测量同一量的其他测量程序的正确度和描述参考物质的特性时。

[来源:ISO 17511:2003,3.29,有修改]

3.22

重复性 repeatability

在一组重复性测量条件下的测量精密度。

[来源:ISO/IEC 指南 99:2007,2.21,有修改]

3.23

稳健度 ruggedness

衡量方法保持不受微小的变化影响的能力的指标参数,并指示其在正常使用期间的可靠性。

[来源:ICH 协调三方指南,1994年]

3.24

选择性 selectivity

测量系统按规定的测量程序使用并提供一个或多个被测量的测得值时,使每个被测量的值与其他被测量或所研究的现象、物体或物质中的其他量无关的特性。

[来源:ISO/IEC 指南 99:2007,4.13,有修改]

3.25

总细胞计数 total cell count

所有细胞的计数,与细胞的属性无关。

3.26

不确定度 uncertainty

利用可获得的信息,表征赋予被测量量值分散性的非负参数。

[来源:ISO/IEC 指南 99:2007,2.26,有修改]

3.27

确认 validation

通过提供客观证据,对特定的预期用途或应用要求已得到满足的认定。

[来源:ISO 9000:2015,3.8.13,修订]

3.28

验证 verification

通过提供客观证据,对规定要求已得到满足的认定。

[来源:ISO 9000:2015,3.8.12,有修改]

3.29

活细胞 viable cells

根据预期用途定义的样品中具有存活属性的细胞(如,代谢活性、复制能力、拥有完整的细胞膜或具有恢复这些功能的能力)。

4 细胞计数的一般原则

4.1 概述

细胞计数有多种方法(见附录 A),大致分为总细胞计数、细胞分类计数、直接细胞计数和间接细胞计数。

4.2 总细胞计数

总细胞计数包含所有细胞的测量,而与细胞的属性无关。宜采用标准来区分细胞和碎片(细胞和非细胞来源)。

4.3 细胞分类计数

细胞分类计数指通过至少一种属性差异来区分细胞亚群的计数方法。

示例:细胞分类计数包括活细胞计数、表达特定表面标记或显示特定细胞形态的细胞计数。

4.4 直接细胞计数

直接细胞计数方法指通过采集来自每个细胞的单个或一组信号(见 3.12)实现细胞计数。该信号可以是电信号(如阻抗)、光信号(如荧光或者色度)或者机械力信号。信号可以通过手动记录或者通过仪器自动记录。由于一般样本中细胞数量巨大,因此直接细胞计数方法通常需要进行样本稀释。然后根据稀释因子换算成实际的细胞数量。

4.5 间接细胞计数

间接细胞计数方法通过采集样本中所有细胞或某一亚群细胞的一个信号或一组信号,根据信号与细胞数量相关的特定的数学模型换算得到细胞数量(如校准曲线)(见 3.13)。

示例:间接细胞计数包括总细胞质量、总 DNA 和代谢活性的测量。

注:从间接细胞计数得出的细胞计数的不确定度可能来自数学模型(如校正曲线),以及其他测量误差。

5 细胞计数的注意事项

5.1 细胞计数方法的选择

目前有多种细胞计数方法(见附录 A),这些方法可被广泛用于总细胞计数、细胞分类计数、直接或

间接细胞计数(见图 1 和附录 B)。

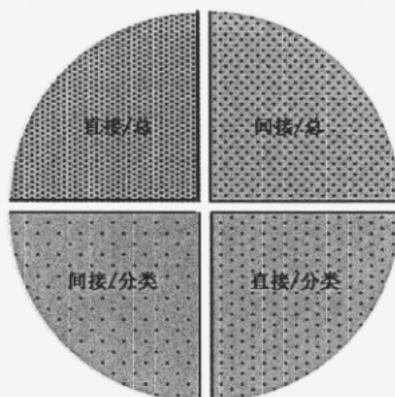


图 1 细胞计数分类

根据测量物的预期用途,有些方法还可以用于多个类别的细胞计数。

示例 1:当测量细胞总数时可以使用自动显微技术进行直接/总细胞计数,当细胞被标记了目标表面标志物时,自动显微技术也可用于直接/总细胞分类计数。如果测量指标是汇合率,它也可用于间接/总细胞计数。

某些仪器和/或方法可以通过检测不同的测量物既可以确定总细胞数量也可以同时进行细胞分类计数。

示例 2:总细胞数和活细胞数可根据光学属性、标记、形态的差异等同时确定。

每种方法都有其固有的噪声和误差,会影响准确度和精确度。使用者应根据知识和经验选择适合于被测细胞类型、应用和/或样本制备步骤的一种或多种方法(预期目的)。

注:细胞计数的要求可能会因预期用途而异,例如预期用途可以是产品放行或生产过程中的细胞计数。

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。细胞碎片、细胞聚集体或细胞团的存在会导致直接细胞计数的细胞数量偏高或偏低。只要有可能,宜建立一个制备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。

间接细胞计数方法使用替代性的测量来评估细胞数。这些方法取决于测量的准确度以及校准曲线的准确度。例如,当使用总 DNA 量来估算细胞数时,准确测量样本中总 DNA 并在 DNA 和细胞数量之间建立准确关系的能力很重要。如有必要,宜使用合适的标准物质建立校准曲线。

5.2 选择细胞计数方法的注意事项

细胞计数方法的选择取决于预期目的以及样本和处理因素,包括:

- 细胞计数的预期目的;
- 计数种类;
- 适当的方法;
- 用于评估指定被测量[包括定量限(LOQ)]的仪器的适用性;
- 样品特征,包括细胞属性和样品异质性的潜在影响;
- 由于存在细胞碎片、细胞聚集体和/或细胞团,可能对测量产生潜在影响;
- 由于生物处理和预测量对测量产生的潜在影响:包括储存、转移、冷冻保存(包括冷冻和解冻过程);
- 细胞样本中的辅助材料和其他成分可能会对测量产生潜在影响(如培养基、微球)。

5.3 取样

细胞计数的样本通常是通过从较大的整体中获取的一个或多个样本确定的。

宜使用适当的采样程序来尽可能减少与测量细胞样品相关的取样误差,而不是测量整个批量或批次(如主细胞库、整个细胞群体)。

较小抽样比例可能会产生较大的取样误差。在某些情况下,应取较大的抽样比例或多个样本来减少取样误差,尤其是测量单位面积的细胞数量时。

从悬浮液的细胞中取出一部分试样时,悬浮液宜足够均匀,以使部分试样具有悬浮液的代表性。细胞悬液的非均一性可能造成样本不具代表性。

5.4 细胞计数的样本制备

细胞计数流程可能需要在计数之前准备好(如混匀、裂解、染色)细胞样品。

样品制备过程的各个要素,如环境因素、程序和试剂,可能会导致细胞计数结果的波动。

样品制备过程可能会系统或随机地改变细胞样品,从而降低其在较大整体中的代表性,或更改与计数被测量物相关的细胞属性,从而导致对测量结果的偏差。

碎片的存在会导致高估细胞数量。宜考虑碎片对细胞计数的影响,必要时,宜在计数之前或期间清除碎片。

细胞聚集体或细胞团的存在会导致细胞计数结果偏低。宜建立样本制备程序,以在取一部分试样之前制备分散良好的样品。

5.4.1 环境因素

宜将样品环境因素的改变可能影响细胞计数的方式降至最低。环境因素可以包括温度、湿度、光照、无菌条件和气流。

示例:细胞样本存放的温度可能会改变细胞属性,因此需要选择适宜的温度。

5.4.2 程序

宜考虑设备和耗材对细胞计数的影响。宜选择适当的容器和转移设备,尽可能地减少与样本转移相关的细胞损失。转移过程(如移液)的样品损失应可接受。

过程之间的混合方法(如模式、速度、持续时间)以及等待/保持时间可能改变与计数被测量值关联的细胞属性。细胞混合程序的设计宜尽量减少对被测量计数的影响。

稀释细胞时,宜将细胞悬浮液或稀释液体积的测量误差降至最低。

宜对染色、裂解、分解、分散或以其他方式处理细胞计数的程序进行评估,以评估它们对被测细胞数的影响。对细胞计数的潜在影响宜降至最低。

示例:剪切力过大会使一些细胞破裂。

5.4.3 试剂和质量稳定性

如有可能,宜确认样本制备中使用的试剂以确保质量和一致性。试剂的质量宜使用合适的方法或标准物质进行验证。

某些试剂(如荧光染料、缓冲液)可能会过期或在某些环境条件下不稳定。细胞计数宜在试剂可接受的稳定性范围内进行。

某些试剂的配制错误可能会导致细胞计数过高或过低,宜确定可接受的试剂浓度范围。

批次之间或不同供应商处的某些试剂(如抗体)可能不一致。用户在使用这些试剂之前宜确定可接受的质量标准。

宜考虑用于细胞计数的试剂的结合效率(如染料的吸附),并在适当时建立质量规范。

5.5 测量

细胞计数应在维护良好的仪器上进行。

仪器宜在适当的时间间隔内进行校准或确认。

细胞计数应使用经过验证的程序进行。宜为预期的细胞计数建立适当的仪器参数设置。

注 1：一台仪器的参数设置可能不能直接转移到另一台仪器。

注 2：可能需要在每个细胞计数过程中优化仪器设置(当样品或目的改变时)。

被测物浓度应在满足预期用途的方法确认范围内,验证范围的下限宜大于定量限。

如果同时检测到多个被测信号,则应将干扰和/或重叠最小化和/或进行补偿(例如,多通道流式细胞仪测量中的补偿校正)。

如已验证了细胞样本的稳定性,细胞计数应在规定的时限内进行。宜考虑样本在测量过程中的稳定性。信号强度的损失或细胞属性的改变会影响测量结果。

操作人员偏差和不精确性相关的误差宜降至最低。培训方案、能力验证、自动化系统的实施以及样本的随机选取可以减少操作人员倚和不精确性对细胞计数不确定度的影响。

6 确认和验证

6.1 仪器确认

测量仪器应符合预定义的规范。在进行仪器确认之前,应记录确认方案并记录结果。

宜执行安装确认(IQ)和运行确认(OQ)。

可使用仪器制造商规定的安装确认(IQ)和运行确认(OQ)。

常规性能确认(PQ)应按预先规定的时间间隔按记录的程序进行。

注:仪器确认可以是验证的一部分。

6.2 方法确认和验证

细胞计数方法应经过验证。应提供方法性能参数,以证明该方法产生的结果适合预期目的。方法性能参数可能包括准确度、精密度、工作范围的规范(定量限、线性等)、选择性/特异性、稳健度和中间精密度。例如操作员之间,设备间和日间变异性。

理想情况下,通过评估分析结果的平均值与参考值之间的差异(通过认证的标准物质获得)来确认准确性。也可以使用具有统计分析的多组实验设计的方法或其他已建立的方法。

注:实验室间的研究和/或其他评估活动可用于评估方法的重复性和重现性。

ISO 20391-2 提供了有关实验设计和统计分析的其他信息。

确认计划应形成文件并加以维护,确认计划应包括预期用途的方法性能参数,确认结果应形成文件。

为保证经验证的方法在标准范围内执行可进行方法确认。为此可以确定一组简化的方法性能参数。验证计划和结果应形成文件并加以维护。

6.3 标准物质

宜使用标准物质来确保测量的可追溯性,使得测量结果具有可比性或确认测量方法。如果可用,宜将使用基于细胞的标准物质达到预期目的。

6.3.1 有证标准物质

可用时,宜使用合适的经过认证的标准物质。宜根据其认证或参考值将标准物质用于预期目的。

6.3.2 内部标准物质

在计数过程中应评估内部标准物质的用途。在可能的情况下,应建立有相关不确定度的内部标准品。

6.3.3 标准物质的使用

宜使用适当的标准物质进行细胞计数仪的确认和验证。

示例 1:微球可以用作仪器确认的标准物质,或作为直接计数仪器的安装确认和运行确认的标准物质。

注:微球一般不能代表细胞的特性;微球的结果可能无法代表细胞样本的预期结果。

示例 2:已知荧光基因浓度的溶液可用于确认基于荧光的细胞计数方法。

适当的标准物质可用于间接细胞计数方法的校准。

标准物质也可用于培训或能力测试。

7 数据处理、分析和报告

7.1 数据处理和分析

7.1.1 通则

对于所选的细胞计数方法,宜使用合理的数据处理和分析方法。数据处理注意事项可以包括但不限于 7.1.2~7.1.4 中所述。

7.1.2 图像处理与分析

数字图像处理技术通常用于处理、分析和呈现从显微镜中获得的图像。在细胞计数中,图像分析可用于识别细胞对象并从分析中排除碎片。图像分析还可以用于识别样本中特定的细胞亚群。基本图像处理可以包括图像的亮度和对比度的校正以及照明不均匀性的校正。图像分析用于得出细胞数。图像分析参数和算法宜得到验证。

7.1.3 圈门设定

圈门是一组数值限制(边界),用于从大型集或总细胞群体中分离出一个细胞亚群,通常以密度图或直方图的形式显示。圈门可以通过辨别分析来定义,也可以简单地手动围绕给定的一组数据点进行绘制。可以以逐步的方式设定圈门(例如,在流式细胞仪测量中,可以首先根据前向散射角以相对大小来区分细胞与碎片对细胞进行圈门,然后根据特定表面标记的荧光强度进行圈门)。

7.1.4 重合校正

细胞计数中的重合是指在基于流式的测量中,来自细胞信号的时间重叠或基于显微镜的图像中的空间重叠,从而导致计数损失。宜使用适当的重合校正方法来避免细胞计数不足。基于流式测量的特定影响可以通过稀释系列实验设计和外推测量样品中的细胞零积分分数得出。一些基于流式的工具提供了数据分析选项,以解决重合损失。

7.2 报告

数据报告应包含足够的细节,以允许对细胞计数结果进行独立评估。报告元素包括:

- a) 样本,包括 ID、细胞描述(类型、批号、来源);

- b) 试剂,包括名称、来源、批号;
- c) 样品制备程序和条件;
- d) 使用的仪器,包括仪器设置;
- e) 确认和验证计划;
- f) 具有适当单位和不确定度的测量结果;
- g) 数据分析程序;
- h) 异常情况。

附 录 A
(资料性)
常用细胞计数方法

A.1 概述

本附录介绍了常规使用的细胞计数方法。

A.2 细胞压积

细胞压积,也称为填充细胞高度,是给定样本中细胞的体积分数(%)。操作步骤通常包括离心含有样本的毛细管。在底部收集的细胞高度用于估计细胞的体积分数。此方法更适用于不含有会随细胞一起沉降的其他成分或细胞碎片的样本。此方法不适用于填充体积受聚集体大小、结构、空隙空间等影响的细胞聚集体。

A.3 细胞重量

可以通过测量单位体积的干细胞或新鲜细胞的重量来估算细胞数量。从肉汤培养基中分离细胞,新鲜称量,或者完全干燥后进行称量。一般来说,干重的数据一致性更好。细菌计数时宜考虑细胞外基质的贡献。

A.4 细胞计数板

细胞计数板(也称为血细胞计数器)是一种显微镜载玻片,专门设计用于直接进行显微镜下的细胞计数。这个载玻片的中间有一个凹槽,在该区域上放置了一个特殊的盖玻片。凹槽处标有网格。一滴细胞悬浮液沉积在凹槽中,以使其以限定的体积填充在盖玻片和载玻片栅格之间的空间。凹槽的深度是预先定义的;因此,可以计算计数的细胞悬液的体积和浓度。通常需要稀释样本以进行手动计数;每个稀释步骤都会导致测量结果不准确;因此,重要的是要使细胞浓度达到可计数水平以进行计数,但又不能稀释得太小而影响数据准确性。常见的错误来源包括填充量不一致和操作员带来的误差。使用这种方法,非黏附细胞(包括运动细菌细胞)或多个焦平面上的细胞将使计数变得困难。

A.5 CFU 平板计数

细胞接种在培养基上进行培养直到形成克隆从而进行计数。如果细胞悬液稀释且细胞分离并稀疏分布在平板上,通常可以假定每个细胞将产生单个克隆形成单位(CFU)。计数克隆数,然后根据分散在培养基上的细胞培养液体积,可计算细胞浓度。通常需要稀释样品以使细胞分散良好。每个稀释步骤可能会导致测量结果不准确。此过程的准确性和有效性将取决于目标细胞类型。克隆的大小和高度可能会有所不同,并可能导致不准确。

A.6 分光光度法

分光光度计测量透过样本的光的强度。混浊的细胞悬浮液吸收或散射光并减少透射光的量。细胞浓度越高,浊度越高。光密度(OD)与细胞悬浮液中的生物量成正比。将培养物置于透明比色皿中,将比色皿置于分光光度计中,可以立即测量光密度。这是一种间接计数方法,需要使用相同的待测细胞类型生成标准曲线。

A.7 阻抗法计数器

基于阻抗的细胞计数器,也称为基于库尔特原理的计数器,是一种用于对悬浮细胞进行计数和确定

大小的仪器。基于这样的理论,当细胞悬浮在导电液体中时,它们充当离散的绝缘体。在库尔特计数器中,悬浮在导电溶液中的细胞通过一个小孔被一个接一个地吸引。在孔的侧面是两个导电的电极。当孔中没有细胞时,电流将不减弱,但是当孔中的细胞被拉出时,电流将在短时间内被阻止。通过孔的路径(在其中检测到细胞)被称为“电感应区”。基于阻抗的细胞计数器会枚举此类事件的数量,并测量电流(和阻抗),该电流和阻抗与通过细胞的体积直接相关。通过指定目标细胞群的大小范围来控制细胞计数。常见的误差来源包括巧合(偶尔有多个细胞同时通过孔径)和圈门。适用于该直接计数方法的通用标准是 ASTM 2149-01(2007)。

A.8 流式细胞术

悬浮液中的单个细胞流经狭窄的液流,液流前设置有激光或 LED 光束。光束一个接一个地撞击它们,峰值光检测器拾取从细胞反射或发射的光。流式细胞仪具有许多其他功能,例如分析细胞的形状及其内部和外部的结构,以及测量细胞中特定蛋白质和其他生物化学物质的量。可能的误差来源很多,包括试剂质量和特异性,仪器设置(如圈门参数)和数据分析方法。可以使用基于细胞的标准物质(如 CD4+ 细胞)来提高准确性。

A.9 自动图像分析

最近的方法涉及使用高质量显微图像和统计分类算法来进行自动细胞检测和计数。一系列图像分类技术可以用于此目的。常见的误差来源包括使用不当的成像操作,例如聚焦,以及细胞聚集计数不当,这对图像分析算法进行正确分割造成困难,误差的另一个主要来源是图像分析计数设置,以避免计数碎片并能正确捕获所有细胞。

A.10 通过总 DNA 量来计算细胞数量

通过非选择性的 DNA 荧光标记的强度来确定总 DNA 量,该方法有时被用作确定总细胞数量的替代方法。DNA 定量的准确性会受到标记物选择性和标记有效性以及制备过程中裂解物 DNA 提取效率比例的影响。

A.11 代谢活性检测和其他检测方法

通过测量生物活性来检测细胞数量的代替方法有很多种,包括葡萄糖/乳糖产生、乳糖脱氢酶释放,和 ATP 水平。重要的是需要注意只有具有代谢活性的细胞会被计算在内。

其他不太常用的细胞计数检测方法包括酶联免疫法(ELISA)和酶联免疫印记(ELISpot)检测。产生细胞因子或者表面具有特异性标记的细胞可使用该类间接方法进行计数。也可使用多重粒子系统从而确定细胞活素和细胞特异性标记,并且计数单个微孔板微孔里的多个标记。

附录 B

(资料性)

不同测量目的的常用细胞计数方法

不同测量目的的常用细胞计数方法分类见表 B.1。

表 B.1 常用细胞计数方法分类^{a,b,c}

	直接细胞计数方法	间接细胞计数方法
总细胞计数	<ul style="list-style-type: none"> ——自动显微技术 ——阻抗法计数器 ——流式细胞计数 ——人工计数 	<ul style="list-style-type: none"> ——自动显微技术 ——细胞干/鲜重 ——NIR(近红外光谱) ——细胞压积 ——分光光度法 ——总 DNA 定量 ——浊度仪
细胞分类计数	<ul style="list-style-type: none"> ——自动显微技术 ——克隆形成单位(CFU) ——酶联免疫印记法 ——流式细胞计数 ——人工计数 	<ul style="list-style-type: none"> ——ELISA 检测 ——阻抗原理的生物量监控器 ——代谢活性检测 ——NIR(近红外光谱)
<p>^a 表 B.1 提供的清单不是所有计数方法的详尽清单。</p> <p>^b 根据实验设计,某些列出的方法可能会放在其他类别中。在某些情况下,只介绍了主要用途。</p> <p>^c 可用于生产过程的细胞计数方法,即使用传感器的原位测量生物反应器内部和/或异位测量,该异位测量使用生物反应器外部的传感器来测量循环来自生物反应器的样品。</p>		

参 考 文 献

- [1] ISO Guide 33, Reference materials—Good practice in using reference materials.
- [2] ISO Guide 98-3, Uncertainty of measurement, Guide to the expression of uncertainty measurement (GUM;1995).
- [3] ISO/IEC Guide 99:2007, International vocabulary of metrology—Basic and general concepts and associated terms (VIM).
- [4] ISO 5725-1:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 1: General principles and definitions.
- [5] ISO 5725-2:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.
- [6] ISO 5725-3:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method.
- [7] ISO 5725-6:1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 6: Use in practice of accuracy values.
- [8] ISO 8196-3:2009¹⁾, Milk—Definition and evaluation of the overall accuracy of alternative methods of milk analysis—Part 3: Protocol for the evaluation and validation of alternative quantitative methods of milk analysis.
- [9] ISO 10718:2002, Cork stoppers—Enumeration of colony-forming units of yeasts, moulds and bacteria capable of growth in an alcoholic medium.
- [10] ISO 11843-1:1997, Capability of detection—Part 1: Terms and definitions.
- [11] ISO 13366-1:2008, Milk—Enumeration of somatic cells—Part 1: Microscopic method (Reference method).
- [12] ISO 13528:2015, Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison
- [13] ISO 17511:2003, In vitro diagnostic medical devices—Measurement of quantities in biological samples—Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials.
- [14] ISO 20391-2, Biotechnology—Cell counting—Part 2: Experimental design and statistical analysis to quantify counting method performance.
- [15] ASTM F 2149-01 (Reapproved 2007), Standard Test Method for Automated Analyses of Cells—the Electrical Sensing Zone Method of Enumerating and Sizing Single Cell Suspensions.
- [16] ASTM F2944-12, Standard Test Method for Automated Colony Forming Unit (CFU) Assays—Image Acquisition and Analysis Method for Enumerating and Characterizing Cells and Colonies in Culture.
- [17] ASTM D4455-85 (2014), Standard Test Method for Enumeration of Aquatic Bacteria by Epifluorescence Microscopy Counting Procedure.
- [18] ASTM F 2739-08, Standard Guide for Quantitating Cell Viability within Biomaterial Scaffolds.
- [19] H20-A2. Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (Proportional) and Evaluation of

1) 等同于 IDF 128-3:2009.

[20] DIN 58932-1, Haematology—Determination of the concentration of blood corpuscles in blood—Part 1; Blood collection, sample preparation, biological influence factors, interference factors.

[21] DIN 58932-2, Haematology—Determination of the concentration of blood corpuscles in blood—Part 2; Characteristic quantities for erythrocytes (erythrocyte indices).

[22] DIN 58932-3, Haematology—Determination of the concentration of blood corpuscles in blood—Part 3; Reference method for the determination of the concentration of erythrocytes; Text in German and English.

[23] DIN 58932-4, Haematology—Determination of the concentration of blood corpuscles in blood—Part 4; Reference procedure for the determination of the concentration of leucocytes.

[24] DIN 58932-5, Haematology—Determination of the concentration of blood corpuscles in blood—Part 5; Reference method for the determination of the concentration of thrombocytes; Text in German and English.

[25] Reference method for the enumeration of erythrocytes and leucocytes, International Council for Standardization in Haematology; Prepared by the Expert Panel on Cytometry. Clin. Lab. Haematol. 1994, 16 pp. 131-138.

[26] Platelet Counting by the RBC/ Platelet Ratio Method-A Reference Method, International Council for Standardization in Haematology Expert Panel on Cytometry and International Society of Laboratory Hematology Task Force on Platelet Counting-American Journal Clinical Pathologists 115; 460-464 (2001).

[27] CLSI H44-A2, Methods for Reticulocyte Counting (Automated Blood Cell Counters, Flow Cytometry, and Supravital Dyes); Approved Guidance-Second Edition.
