



# 团 体 标 准

T/CSCB 0019—2024

## 干细胞标志分子检测 流式细胞测定法

Measurement of stem cell markers—Flow cytometry



中国细胞生物学学会

CHINESE SOCIETY FOR CELL BIOLOGY

2024-10-28 发布

2024-12-31 实施

中国细胞生物学学会 发布  
中国标准出版社 出版

## 目 次

前言 .....	III
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义、缩略语 .....	1
4 方法原理 .....	3
5 试剂或材料 .....	3
6 仪器设备 .....	3
7 样品 .....	3
8 试验步骤 .....	4
9 报告和数据保存 .....	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。

本文件由中国细胞生物学学会标准工作委员会提出。

本文件由中国细胞生物学学会归口。

本文件主要起草单位：中国科学院动物研究所、北京干细胞与再生医学研究院、中国计量科学研究院、北京工商大学、重庆市公共卫生医疗救治中心、中国标准化研究院、深圳华汉基因生命科技有限公司、北京泽辉辰星生物科技有限公司、安徽中盛溯源生物科技有限公司、深圳华大生命科学研究院（国家基因库）、中国科学技术信息研究所、中国食品药品检定研究院、广东省中医院（广州中医药大学第二附属医院）、中国合格评定国家认可中心、苏州大学、中国医学科学院血液病医院（中国医学科学院血液学研究所）、中国医学科学院医学实验动物研究所。

本文件主要起草人：郝捷、牛帅帅、赵同标、胡宝洋、傅博强、马爱进、王磊、李夏、陈叶苗、王长林、张勇、曹佳妮、徐然然、赵红玲、刘晶晶、于晓游、张愚、魏军、俞君英、孙珍珍、李启沅、朱礼军、纳涛、陈曲波、翟培军、胡士军、彭耀进、周家喜、魏强、马士卉。



# 干细胞标志分子检测 流式细胞测定法

## 1 范围

本文件规定了干细胞标志分子流式细胞术测定方法的一般性要求。

本文件适用于体外培养的哺乳动物干细胞标志分子检测,涵盖细胞表面及胞内标志分子。其他类型干细胞标志分子的检测,参照本文件中的相关技术要求和操作规范。

本文件不适用于植物干细胞的标志分子检测。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 39729—2020 细胞纯度测定通用要求 流式细胞测定法

WS/T 360—2024 流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南

YY/T 0588—2017 流式细胞仪

YY/T 1184—2010 流式细胞仪用单克隆抗体试剂

中华人民共和国药典(2020年版 三部)

## 3 术语和定义、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

**干细胞 stem cells**

一类能够自我更新、具有分化成一种或多种功能细胞类型的细胞。

#### 3.1.2

**干细胞标志分子 stem cell markers**

能用于鉴定干细胞类型和功能等特性的特异性分子。

注:包括表面标志分子和胞内标志分子。

#### 3.1.3

**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、特定标志分子)的细胞。

#### 3.1.4

**流式细胞术 flow cytometry**

利用流式细胞仪基于液相中悬浮的单细胞或其他生物粒子的物理性质及化学性质,如细胞大小、内部结构、DNA、RNA 以及抗原等,对目标细胞进行快速、逐一的定量分析及分选的技术。

3.1.5

**单细胞悬液 single cell suspension**

由分散的单个细胞组成、无细胞团块的均匀液体混合物。

3.1.6

**封闭 blocking**

在进行抗体染色之前,使用特定的封闭试剂处理细胞,以减少非特异性结合和背景信号,从而提高实验的特异性和准确性。

3.1.7

**细胞染色 cell staining**

用偶联荧光素的特异性抗体或染料与细胞内的蛋白质、DNA、RNA 等化学物质结合,进行定性、定位、半定量分析的方法。

3.1.8

**前向散射光 forward scatter**

光学检测器在入射光的正前方所收集的低角度散射光信号。

注: FSC 与细胞或颗粒的大小和折射指数有关。

3.1.9

**侧向散射光 side scatter**

光学检测器在入射光的直角处所收集的细胞散射的光信号。

注: SSC 与细胞或颗粒的内部及表面结构复杂程度有关,如细胞质颗粒性、膜不规则性及核型等。

3.1.10

**荧光强度 fluorescence intensity**

荧光染料在一定波长和强度的激发光照射下所产生的发射光的强度。

注: 在一定的条件下,荧光强度与细胞特定物质和荧光染料相结合的量相关。

3.1.11

**荧光微球 fluorescent beads**

一种表面结合特定荧光染料或内部包含一种或多种荧光染料,用于流式细胞检测的人造微球颗粒。

注: 常用的荧光微球包括以下 3 种:1)校准微球:与染色细胞大小和荧光强度相似的微球,用于检测每个荧光通道的线性、灵敏度和检测水平,也能用来检测抗体结合量或抗原密度;2)标准微球:大小一致、荧光强度与染色细胞相似的微球,用于检测通道的电压设置和荧光补偿设置;3)绝对计数微球:已知数量或浓度的荧光微球,与待测单细胞悬液在同一管中进行检测,以准确获得待测细胞的绝对计数。

3.1.12

**设门 gate setting**

一种图形化分析流式细胞数据的方法,通过在流式细胞分布图中选择特定细胞群体,并对其各个参数(如前向散射光/侧向散射光/不同通道的荧光信号等)进行分析。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BSA:牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin)

CV:变异系数(Coefficient of Variation)

FBS:新生牛血清(Fetal Bovine Serum)

FSC:前向散射光(Forward Scatter)

MFI:平均荧光强度(Mean Fluorescence Intensity)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Solution)

SSC:侧向散射光(Side Scatter)

#### 4 方法原理

利用荧光标记的特异性抗体与细胞表面或胞内标志分子结合,使用流式细胞仪,待测干细胞依次通过激光束,分析前向散射光和侧向散射光以评估细胞大小和内部复杂性;激光激发荧光信号,通过检测荧光强度分析干细胞标志分子的表达水平。

#### 5 试剂或材料

除注明外,所用化学试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

- 5.1 荧光染料:应符合 GB/T 39729—2020 的要求。
- 5.2 荧光标记单克隆抗体:应符合 YY/T 1184—2010 的要求。
- 5.3 缓冲溶液:应符合 GB/T 39729—2020 的要求。
- 5.4 封闭试剂:应选择能有效减少抗体非特异性结合的试剂,常用的封闭试剂包括 BSA、鼠源抗 CD16/CD32 抗体以及人源 Fc 受体结合封闭剂等。应根据试验需求合理选择封闭试剂,以降低背景信号并提高检测特异性。
- 5.5 固定液:不应造成待测细胞染色后的光学特性和形态严重改变,如可使用含有 0.1%~2.0% 新鲜配制的多聚甲醛缓冲液(pH7.0~7.4)作为固定液。
- 5.6 多聚甲醛:纯度 $\geq 95\%$ 。
- 5.7 牛血清白蛋白:纯度 $\geq 98\%$ 。
- 5.8 新生牛血清:应符合《中华人民共和国药典(2020 年版 三部)》中“通则 3604 新生牛血清”要求。
- 5.9 细胞过滤器:孔径  $40\ \mu\text{m}\sim 100\ \mu\text{m}$ 。

#### 6 仪器设备

- 6.1 流式细胞仪:应符合 YY/T 0588—2017 要求,经过校准,并定期核查仪器稳定性、准确性、重复性和精密度。
- 6.2 微量移液器:量程为  $2.5\ \mu\text{L}\sim 1\ 000\ \mu\text{L}$ ,经检定合格或校准,并定期核查其移取量的准确度和精密度。
- 6.3 离心机:需满足细胞悬液离心所需离心力的要求,离心力上限 $\geq 1\ 000\times g$ 。

#### 7 样品

- 7.1 应为单细胞悬液。
- 7.2 样品体积应根据所使用流式细胞仪的上样要求调整,通常为  $100\ \mu\text{L}\sim 500\ \mu\text{L}$ ,以保证仪器的灵敏度和重复性。
- 7.3 上样细胞浓度范围宜为  $1\times 10^6\ \text{mL}\sim 1\times 10^7/\text{mL}$ ,细胞浓度过高或过低会影响检测准确性和仪器的稳定性。
- 7.4 所有样本最好在完成染色程序后 1 h 内进行检测。如果无法立即检测,样品应在  $2\ ^\circ\text{C}\sim 8\ ^\circ\text{C}$  避光保存。保存时间应根据标本类型及染色试剂要求进行调整,应在标本稳定性验证结果的允许时限内完成检测,避免因长时间存储而导致细胞特性改变或染色失效。

## 8 试验步骤

### 8.1 单细胞悬液制备

8.1.1 根据不同干细胞类型的培养要求,选择适用于不同体外培养方式(如贴壁培养或悬浮培养等)的细胞解离、收集方法。

8.1.2 收集过程中应在超净工作台中进行,并避免可能的污染,如其他细胞、细菌等;细胞收集后应置于适当的环境中,避免其发生变化。

8.1.3 应使用孔径范围在  $40\ \mu\text{m}\sim 100\ \mu\text{m}$  的细胞过滤器过滤,以去除细胞团块。

8.1.4 细胞悬液浓度范围宜调整在  $1\times 10^6\ \text{mL}\sim 1\times 10^7/\text{mL}$  之间,平行制备 3 份样品。

### 8.2 细胞染色

#### 8.2.1 细胞表面标志分子染色样品制备

8.2.1.1 可选:取 8.1 制备单细胞悬液加入适量封闭试剂,如 BSA(终浓度 2%或其他合适浓度),充分混匀,在  $2\ ^\circ\text{C}\sim 8\ ^\circ\text{C}$  低温环境下预孵育 10 min~20 min。

8.2.1.2 向单细胞悬液加入特异性抗体,充分混匀, $2\ ^\circ\text{C}\sim 8\ ^\circ\text{C}$  或冰上避光孵育至少 30 min;对于未带荧光素标记的抗体,需进行 8.2.1.5~8.2.1.7;对于荧光标记单克隆抗体,则 8.2.1.3、8.2.1.4 洗涤后,进行 8.2.1.8。

8.2.1.3 使用适量缓冲溶液洗涤细胞(可加入 2%FBS 或 BSA)。选择合适的转速,宜在  $2\ ^\circ\text{C}\sim 8\ ^\circ\text{C}$  低温环境下, $150\text{g}\sim 600\text{g}$  离心 5 min,弃上清。

注:对于特殊细胞类型,如需调整离心力参数,根据实际情况优化,并基于验证结果确认其适用性。

8.2.1.4 重复 8.2.1.3。

8.2.1.5 取适量带有荧光染料标记的二抗试剂对细胞悬液进行染色,充分混匀。 $2\ ^\circ\text{C}\sim 8\ ^\circ\text{C}$  或冰上避光孵育至少 30 min。

8.2.1.6 加入适量缓冲溶液(可加入 2%FBS 或 BSA)洗涤细胞。宜在  $2\ ^\circ\text{C}\sim 8\ ^\circ\text{C}$  低温环境下, $150\text{g}\sim 600\text{g}$  离心 5 min,弃上清。

注:对于特殊细胞类型,如需调整离心力参数,根据实际情况优化,并基于验证结果确认其适用性。

8.2.1.7 重复 8.2.1.6。

8.2.1.8 将细胞重悬于适量缓冲溶液(可加入 2%FBS 或 BSA)中。如果无细胞内标志分子染色需要,且细胞无需固定操作,则在 8.2.1.7 后,宜加入适量的细胞死活染料进行染色,对活细胞与死细胞进行区分。

8.2.1.9 制备好的样品,流式细胞仪上机分析前应在  $4\ ^\circ\text{C}$  下避光保存,充分混匀后上机检测。未固定的样品宜尽快完成检测。

注:细胞表面标志分子染色后使用固定液进行固定的样品,上机前避光保存,在 24 h 内或在产品说明书规定时限内或在样品稳定性验证结果的允许时限内完成检测。

#### 8.2.2 细胞内标志分子染色样品制备

8.2.2.1 若在同一样本中同时进行细胞表面及细胞内标志分子染色,建议先进行细胞表面标志分子染色,再进行如下步骤。

8.2.2.2 细胞悬液经最后一次洗涤后,弃上清,使用合适的固定液重悬细胞沉淀。

8.2.2.3 避光孵育(孵育时间参考试剂的商品说明书)。

8.2.2.4 加入清洗缓冲液进行清洗。宜在  $2\ ^\circ\text{C}\sim 8\ ^\circ\text{C}$  低温环境下, $150\text{g}\sim 600\text{g}$  离心 5 min,弃上清。

注：对于特殊细胞类型，如需调整离心力参数，根据实际情况优化，并基于验证结果确认其适用性。

8.2.2.5 重复 8.2.2.4。

8.2.2.6 细胞悬液中加入适量的荧光偶联抗体以检测细胞内标志分子，充分混匀，并避光孵育至少 30 min。

8.2.2.7 加入清洗缓冲液进行清洗。宜在 2℃~8℃ 低温环境下，150g~600g 离心 5 min，弃上清。

注：对于特殊细胞类型，如需调整离心力参数，根据实际情况优化，并基于验证结果确认其适用性。

8.2.2.8 重复 8.2.2.7。

8.2.2.9 将染色细胞重悬于适量体积的缓冲溶液中。

8.2.2.10 制备好的样品，流式细胞仪上机前应避光保存，宜在 24 h 内或在产品说明书规定时限内或在样品稳定性验证结果的允许时限内完成检测。

### 8.2.3 对照样品制备

结合实际检测实验需求，可设置不同对照组，可包括：

- 1) 阴性对照：未经染色操作的空白待测细胞样本；
- 2) 同型对照：使用与单克隆抗体相同种属来源、相同剂量、相同免疫球蛋白亚型的抗体，标记相同荧光染料，作为对照；
- 3) 荧光减一对照：在多色分析中，移除一个通道的荧光标记的抗体，分析剩余通道的荧光标记信号，以评估各通道间的信号重叠和非特异性背景；
- 4) 补偿对照：在多色分析中，宜选择与检测一致的荧光素标记抗体标记的同种细胞或者微球作为荧光单染色对照，以测定荧光信号的重叠并进行适当的调整。

## 8.3 流式细胞仪检测

### 8.3.1 操作顺序

流式细胞仪每次开机时，应先进行仪器光路/液路稳定性及检测通道电压稳定性的验证和调整；验证通过后，采用荧光微球光路质控品验证仪器的光学系统参数，如 FSC、SSC、MFI 和变异系数是否处于厂家或实验室根据特定的试验状态所设定的可接受范围内，完成室内质控检测；质控通过后再进行待测细胞样本检测；每次开机和关机应做好仪器保养维护。需定期进行荧光补偿的验证和调整。所有验证结果、室内质控结果和保养维护日志均应详细记录。

### 8.3.2 仪器稳定性验证

符合 WS/T 360—2024 的相关技术要求。

### 8.3.3 通道的选择

根据待测样本细胞标记的荧光染料的激发与发射光谱，选择合适的激光和对应的检测通道。在多色荧光染色样本的检测中，宜考虑荧光信号的重叠并进行荧光补偿。

### 8.3.4 阈值、电压设定

根据仪器操作说明书和试剂使用说明书设定阈值。根据不同干细胞特性及检测需求，以及 FSC、SSC 和荧光信号的强弱，调整电压大小。

### 8.3.5 荧光补偿(适用时)

#### 8.3.5.1 荧光补偿原则

应符合 WS/T 360—2024 的相关要求。

采用两种及以上抗体组合方案进行干细胞标志分子检测时,需要进行荧光补偿调整,且每次改变通道电压设置后均需重新调整补偿设置。确定电压之后建立荧光补偿矩阵,通过仪器或软件将单阳性细胞群体调整到相应荧光点图的直角坐标系象限中,宜避免补偿不足出现假阳性细胞群,同时避免补偿过度将双阳性细胞错误识别为单阳性细胞。

#### 8.3.5.2 荧光补偿样本

荧光补偿样本为单荧光染色的细胞或者商品化的荧光补偿微球。

#### 8.3.5.3 荧光补偿方法

根据仪器操作软件的指示进行手工方式补偿或软件自动补偿。

#### 8.3.6 设门

在流式细胞仪显示的象限图上基于一组参数(如 FSC/SSC 等)来确定所要分析的目的细胞群,对限定区内的目的细胞群通过其他参数(如荧光参数)进一步分析相关干细胞标志分子表达情况。使用相应的阴性对照和/或同型对照进行对比,通过相应散点图中荧光强度表达,区分出干细胞标志分子表达的阳性信号。根据所使用的荧光染料或相关试剂盒使用说明书设置系列双参数散点图。

#### 8.3.7 信号采集

应符合 GB/T 39729—2020 的要求。

#### 8.3.8 获得干细胞标志分子检测数据

通过仪器分析软件,在仪器分析结果的散点图上进行设门,获得干细胞标志分子表达水平的检测数据。

### 9 报告和数据保存

数据储存和检测数据的方法都应详细记录,以便于检测者对数据进行复核。对所有要分析的样品数据采用列表模式储存起来,以确保对原始数据进行全面分析。

将试验条件、测量结果和计算结果进行记录。报告内容应包括试验对象、采用标准、方法、结果、观察到的异常现象、日期等。

数据的储存方式可为纸质,也可为电子信息形式。每个样本的数据应有唯一的标识。所有数据至少保留 2 年,或根据实验室要求保留较长时间。储存期过后,实验室监督人员有权利决定继续保留或删除数据。

参 考 文 献

- [1] WS/T 360—2024 流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南
- [2] T/CSCB 0001—2020 干细胞通用要求
- [3] Andrews P W, Gokhale P J. A short history of pluripotent stem cells markers [J]. *Stem Cell Reports*, 2024, 19(1):1-10.
- [4] Kavyasudha, C., Joseph, J. P., Jayaraj, R., Pillai, A. A., Devi, A. (2019). Conventional and Emerging Markers in Stem Cell Isolation and Characterization. In: Turksen, K. (eds) *Cell Biology and Translational Medicine, Volume 13. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1341. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/5584\\_2019\\_475](https://doi.org/10.1007/5584_2019_475).
- [5] Donnenberg V S, Ulrich H, Tarnok A. Cytometry in stem cell research and therapy [J]. *Cytometry A*, 2013, 83(1):1-4.
- [6] Tzanoudaki M, Konsta E. Basic Principles of Flow Cytometry [M]. *Intraoperative Flow Cytometry*, 2023:9-31.
- [7] Novakova M, Glier H, Brdickova N, et al. How to make usage of the standardized EuroFlow 8-color protocols possible for instruments of different manufacturers [J]. *J Immunol Methods*, 2019, 475:112388.

