



# 中华人民共和国国家计量技术规范

JJF-XXXX-XXXX

## 细胞计数仪校准规范

(征求意见稿)

Calibration Specification for Cell Counters

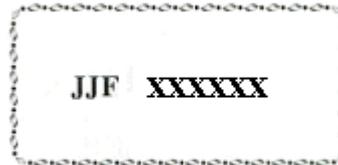
XXXXXXXXXX 发布

XXXXXXXXXX 实施

国家市场监督管理总局 发布

# 细胞计数仪校准规范

Calibration Specification for  
Cell Counters



归口单位：全国生物计量技术委员会

主要起草单位：中国计量科学研究院

参加起草单位：北京市计量检测科学研究院

上海市计量测试科学研究院

上海睿钰生物科技有限公司

本规范委托全国生物计量技术委员会负责解释

**本规范主要起草人：**

刘瑛颖（中国计量科学研究院）

张 玲（中国计量科学研究院）

**参加起草人：**

王晓洋（北京市计量检测科学研究院）

刘 刚（上海市计量测试科学研究院）

李 妍（上海市计量测试科学研究院）

陈 凯（上海睿钰生物科技有限公司）

## 目录

引言.....	II
1 范围.....	3
2 引用文件.....	3
3 术语和计量单位.....	3
4 概述.....	4
5 计量特性.....	5
6 校准条件.....	5
6.1 环境条件.....	5
6.2 标准物质和校准设备.....	6
7 校准项目和校准方法.....	6
7.1 空白值.....	错误！未定义书签。
7.2 示值误差.....	错误！未定义书签。
7.3 重复性.....	错误！未定义书签。
8 校准结果表达.....	6
9 复校时间间隔.....	8
附录 A 校准记录格式.....	9
附录 B 校准证书内页格式.....	11
附录 C 示值误差的不确定度评定示例.....	12

## 引言

《细胞计数仪校准规范》依据 JJF 1071-2010 《国家计量校准规范编写规则》、JJF 1059.1-2012 《测量不确定度评定与表示》等完成规范的制定。在本规范制定过程中，也参考了现行有效的 ISO/DIS 20391-1:2018 Biotechnology - Cell counting - Part 1: General guidance on cell counting methods 和 JJG 714-2012 《血细胞分析仪检定规程》。

本规范为首次发布。

# 细胞计数仪校准规范

## 1 范围

本规范适用于基于显微图象原理、电阻抗原理进行细胞浓度、细胞活率和颗粒直径分析测量的细胞计数仪的校准,其他类型的细胞计数仪可参照本规范进行校准。

## 2 引用文件

本规范引用了下列文件:

JJF 1001-1998 通用计量术语及定义

GZJLYZ00-002 校准操作规范编写规定

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(包括所有的修改单)适用于本规范。

## 3 术语

### 3.1 细胞计数 cell counting

确定细胞数量的测量过程。

[ ISO/DIS 20391-1:2018, 定义 3.8 ]

注:包括任何状态(死/活)、类型(基因型或表型)和功能(例如活性)的细胞。

### 3.2 细胞浓度 cell concentration

单位体积的细胞悬浮液中某种类型或总体细胞的数量值，一般表示为 / $\mu\text{L}$ 、/mL 或 /L。

### 3.3 细胞活率 cell viability

总细胞群体中活细胞所占的百分比。

### 3.4 台盼蓝 trypan Blue

细胞活性染料，常用于检测细胞膜的完整性，检测细胞是否存活。活细胞不会被染成蓝色，而死细胞会被染成淡蓝色。

### 3.5 吖啶橙 acridine orange

可以通过完整的细胞膜，嵌入所有细胞（活细胞和死细胞）的细胞核与双链DNA结合发出绿色荧光的染料。

### 3.6 碘化丙啶 propidium iodide

只能通过破损的细胞膜，即死细胞的细胞膜，嵌入死细胞的细胞核与双链DNA结合发出红色荧光的染料。

## 4 概述

细胞计数仪是一种快速简便的自动化细胞数量和活率测量装置，目前主要通过基于显微图像的图像识别法和基于阻抗的电阻抗计数法。

基于显微图像的图像识别法，通常通过台盼蓝染色或AO/PI等荧光染料染色，整合先进的光学成像技术和智能图像识别技术，进行自动细胞计数检测。台盼蓝是细胞活性染料，常用于检测细胞膜的完整性，以检测细胞是否存活。活细胞的细胞膜完整，能排斥台盼蓝，不会被染成蓝色；而死细胞由于细胞膜破损或不完整，会被台盼蓝染成蓝色，因此可借助台盼蓝染色进行细胞计数，区分死活细胞。吖啶橙（AO）和碘化丙啶（PI）是可以与细胞核内双链DNA结合的荧光染料。AO可以自由穿透细胞膜，嵌入所有细胞（活细胞和死细胞）的细胞核中发出绿色荧光；PI只能通过破损的细胞膜，即死细胞的细胞膜，嵌入死细胞的细胞核中发出红色荧光。当两种染料同时存在于死细胞核中时，会发生荧光共振能量转移，从而导致死细胞发出红色荧光。因此可通过AO/PI准确区分死活细胞，进行准确细胞计数。

电阻抗计数法采用电阻抗原理，即库尔特原理。悬浮在导电溶液中的细胞是不良的导体，当细胞一个一个通过两侧有导电电极的小孔时，会导致小孔两端电阻改变，仪器产生并记录电阻信号，并将其转化成电脉冲信号，通过检测脉冲的数量与大小，即可得到细胞数量与体积。活细胞由于其完整的细胞膜结构可产生高阻抗信号，即得到整个细胞的大小信号；而死细胞由于细胞膜破损或膜的通透性增加会产生较低的阻抗信号，即得到细胞核的大小信号。因此可通过不同大小范围来区分死活细胞，得到细胞活率。

## 5 计量特性

计量特性见表 1

表 1 细胞计数仪的校准项目

特性量值	校准项目		
	空白值	示值误差	重复性
总细胞浓度	+	+	+
活细胞浓度	+	+	+
死细胞浓度	+	+	+
细胞活率	-	+	+
颗粒直径	-	+	+

注：+为校准项目，-为非校准项目，。

## 6 校准条件

### 6.1 环境条件

6.1.1 实验室环境应当满足仪器安装的要求，不得存在强烈的机械振动和电磁干扰。

6.1.2 环境温度：按照细胞计数仪说明书规定的温度条件进行；

6.1.3 相对湿度：按照细胞计数仪说明书规定的湿度条件进行；

6.1.4 光照：避免阳光直射；

6.1.5 电源电压：AC220 V $\pm$ 22 V，50 Hz/60 Hz 或相应的直流电源；

6.1.6 大气压力：76 kPa $\sim$ 106 kPa。

## 6.2 标准物质和校准设备

应采用国内外有证标准物质进行仪器校准，标准物质的技术指标见表 2。

表 2 校准用标准物质技术指标

标准物质特性量	量值范围	相对不确定度 ( $k=2$ )
总细胞浓度	$5\times 10^5\sim 5\times 10^6/\text{mL}$	$\leq 10\%$
活细胞浓度	$5\times 10^5\sim 5\times 10^6/\text{mL}$	$\leq 10\%$
死细胞浓度	$5\times 10^5\sim 5\times 10^6/\text{mL}$	$\leq 10\%$
细胞活率	0% $\sim$ 100%	$\leq 10\%$
颗粒直径	5 $\sim$ 50 $\mu\text{m}$	$\leq 10\%$

## 7 校准项目和校准方法

以下校准项目应在细胞计数仪经过开机预热、仪器达到正常工作条件后进行，校准前应当确保仪器工作状态正常，参照附录 A 进行校准原始数据记录。

### 7.1 外观要求

用目视并配合手动操作进行检查。仪器外表应光滑平整，不应有影响工作性能的机械损伤；显示屏表面应平整洁净无划痕，读数清晰；开关及按键功能良好。仪器应有以下标识：名称、型号、编号、生产厂家、出厂日期。

### 7.2 测试前准备

开启仪器，参照仪器使用说明书，使仪器达到最佳工作条件。根据客户要求、被校准仪器的日常工作模式和选取的标准物质类型选取合适的细胞测量模式。

### 7.3 空白值

取空白稀释液、纯水或蒸馏水进行上样计数，测量 4 次，记录测量值并取其中的最高值作为空白值。

#### 7.4 示值误差

仪器的示值误差以细胞浓度（总细胞浓度、活细胞浓度和死细胞浓度）标准物质、细胞活率标准物质、颗粒直径标准物质测量值与标准值的误差表示。根据被校准仪器的日常工作模式选取合适浓度、比例和颗粒直径的标准物质，使用标准物质前上下颠倒 30-50 次左右从而保证充分混匀（瓶底无沉积物）。用移液器从充分混匀的标准物质样本液体中间层吸取液体进行上样计数，测量 5 次，记录测量值，并按照公式（1）进行示值误差计算。

$$\Delta = \bar{C}_i - C_s \quad (1)$$

式中：  $\Delta$ —细胞计数器示值误差，/mL、% 或  $\mu\text{m}$ ；

$\bar{C}_i$ —5 次测量值的平均值，/mL、% 或  $\mu\text{m}$ ；

$C_s$ —标准值，/mL、% 或  $\mu\text{m}$ 。

#### 7.5 测量重复性

仪器重复性以细胞浓度（总细胞浓度、活细胞浓度和死细胞浓度）标准物质、细胞活率标准物质、颗粒直径标准物质 10 次测量值的实验标准偏差表示。根据被校准仪器的日常工作模式选取合适浓度、比例和颗粒直径的标准物质，使用标准物质前上下颠倒 30-50 次左右从而保证充分混匀（瓶底无沉积物）。用移液器从充分混匀的标准物质样本液体中间层吸取液体进行上样计数，测量 10 次，记录测量值，并按照公式（1）进行示值误差计算。

$$STD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C}_i)^2}{n-1}} \quad (2)$$

式中：  $STD$ —测量值的标准偏差，/mL、% 或  $\mu\text{m}$ ；

$n$ —测量次数；

$C_i$ —第  $i$  次测量值, /mL、% 或  $\mu\text{m}$ ;

$\bar{C}_i$  —测量平均值, /mL、% 或  $\mu\text{m}$ 。

## 8 校准结果表达

经校准后的细胞计数仪应填发校准证书, 校准证书应符合 JJF1071-2010 中 5.12 的要求, 参照附录 C 给出校准项目名称、测量值以及扩展不确定度。

## 9 复校时间间隔

送校单位可根据实际情况自主决定细胞计数仪的复校时间间隔, 建议不超过 1 年。

## 附录 A

## 校准记录格式

仪器名称			型号	
制造厂商			出厂编号	
委托单位	名称		联系人	
	地址		电话	
检测地点			环境温度	
环境湿度			校准日期	
记录编号			证书编号	
校准员			核验员	

## B.1 外观检查:

仪器配件齐全 外观完好。

## B.2 空白值测试:

项 目	示 值				最高值
总细胞 (/ mL)					
活细胞 (/ mL)					
死细胞 (/ mL)					

## B.3 示值误差:

项 目	示 值				平均值	标称值	示值误差
总细胞浓度 ( $10^6$ / mL)							
活细胞浓度 ( $10^6$ /mL)							
死细胞浓度 ( $10^6$ / mL)							
细胞活率 (%)							
颗粒直径 ( $\mu\text{m}$ )							

## B.4 重复性

测量次数	总细胞浓度 ( $10^6$ /mL)	活细胞浓度 ( $10^6$ /mL)	死细胞浓度 ( $10^6$ /mL)	细胞活率 (%)	颗粒直径 ( $\mu\text{m}$ )
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
重复性					

## 附录 C

## 校准证书内页格式

表 C 校准证书内页格式

证书编号：

校准环境条件	温度：_____ °C 相对湿度：_____ %	地点： 其它：
参照国家计量校准规范《细胞计数仪》JJF XXXX-XXXX 对该仪器进行校准，结果如下：		
序号	校准项目	校准结果
1	空白值	总细胞浓度测量值：_____ 活细胞浓度测量值：_____ 死细胞浓度测量值：_____
2	示值误差	总细胞浓度测量值：____ 不确定度：____ ( $k=2$ ) 活细胞浓度测量值：____ 不确定度：____ ( $k=2$ ) 死细胞浓度测量值：____ 不确定度：____ ( $k=2$ ) 细胞活率测量值：____ 不确定度：____ ( $k=2$ ) 颗粒直径测量值：____ 不确定度：____ ( $k=2$ )
3	重复性	总细胞数量测量值：_____ 活细胞数量测量值：_____ 死细胞数量测量值：_____ 细胞活率测量值：_____ 颗粒直径测量值：_____

校准员：

核验员：

## 附录 C

### 细胞计数仪示值误差的不确定度评定示例

#### C.1 测量方法

采用可溯源至显微镜检方法的细胞浓度标准物质进行测试，测量结果并与标准物质定值结果进行比较。

#### C.2 测量模型

校准结果相对示值误差计算公式可由公式 (C.1) 给出：

$$\Delta C_r = \frac{\bar{C} - C_s}{C_s} \times 100\% \quad (\text{C.1})$$

式中：

$\Delta C_r$  —— 细胞计数相对示值误差；

$\bar{C}$  —— 5 次测量值的平均值；

$C_s$  —— 标准物质的标准值。

#### C.3 不确定度来源

不确定度来源包括：

- a) 细胞计数仪测量重复性引入的标准不确定度  $u(\bar{C}_i)$ ；
- b) 标准物质引入的标准不确定度  $u(C_s)$ 。

#### C.4 标准不确定度分量评定

##### C.4.1 测量重复性引入的标准不确定度分量 $u(\bar{C}_i)$

在校准中总细胞浓度 5 次测定值分别为  $1.01 \times 10^6/\text{mL}$ 、 $1.10 \times 10^6/\text{mL}$ 、 $1.00 \times 10^6/\text{mL}$ 、 $0.988 \times 10^6/\text{mL}$ 、 $1.03 \times 10^6/\text{mL}$ 、，可由公式 (C.2) 评估此次测量的实验标准差  $s(x_i)$ ：

$$s(x_i) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}_i)^2}{n(n-1)}} = 0.04 \times 10^6/\text{mL} \quad (\text{C.2})$$

则测量结果平均值的标准不确定度为：

$$u(\bar{C}_i) = s(x_i) / \sqrt{n} = 0.02 \times 10^6/\text{mL}$$

#### C.4.2 标准物质引入的标准不确定度分量 $u(C_s)$

由标准物质引入的不确定度  $u(C_s)$  可以根据标准物质证书提供的扩展不确定度  $U_r$  和包含因子  $k$  根据公式 (C.3) 计算：

$$u(C_s) = \frac{U}{k} \quad (\text{C.3})$$

式中：

$u(C_s)$  ——标准物质引入的标准不确定度；

$U$  ——标准物质证书提供的扩展不确定度；

$k$  ——标准物质证书提供的包含因子，通常为 2。

在校准过程中标准物质总细胞浓度特性量值的标准值为  $1.00 \times 10^6/\text{mL}$  ( $U=0.054 \times 10^6/\text{mL}$ ,  $k=2$ )，则由标准物质引入的标准不确定度分量：

$$u(C_s) = \frac{U_r}{k} = 0.027 \times 10^6/\text{mL}$$

## C.5 标准不确定度一览表

标准不确定度一览表见表 C.1。

表 C.1 细胞计数仪相对示值误差测量的标准不确定度一览表

不确定度来源	标准不确定度分量 $u_i$	标准不确定度值
测量重复性	$u(\bar{C}_i)$	$0.02 \times 10^6/\text{mL}$
细胞浓度标准物质	$u(C_s)$	$0.027 \times 10^6/\text{mL}$

C.6 合成标准不确定度  $u(\Delta C)$ 

由于没有任何输入量具有值得考虑的相关性，示值误差的相对不确定度为：

$$u_c(\Delta C) = \sqrt{u(\bar{C}_i)^2 + u(C_s)^2} = \sqrt{(0.02 \times 10^6)^2 + (0.027 \times 10^6)^2} = 0.03 \times 10^6/\text{mL}$$

C.7 扩展不确定度  $U$ 

取  $k=2$ ，则

$$U = u_c(\Delta C) \times k = 0.06 \times 10^6/\text{mL}$$