



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0606.13—2008

组织工程医疗产品 第 13 部分：细胞自动计数法

Tissue engineered medical product—Part 13: Standard test method for
automated enumeration of cell suspensions

2008-04-25 发布

2009-06-01 实施



国家食品药品监督管理局 发布

前 言

YY/T 0606《组织工程医疗产品》分为：

- 第 1 部分：通用要求；
- 第 3 部分：通用分类；
- 第 4 部分：皮肤替代品(物)的术语和分类；
- 第 5 部分：基质及支架的性能和测试；
- 第 6 部分：I 型胶原蛋白；
- 第 7 部分：壳聚糖；
- 第 8 部分：海藻酸钠；
- 第 9 部分：透明质酸钠；
- 第 10 部分：修复或再生关节软骨的植入物的体内评价；
- 第 11 部分：脱钙骨异位骨诱导性组织学评价指南；
- 第 12 部分：细胞、组织、器官的加工处理；
- 第 13 部分：细胞自动计数法。

本部分为 YY/T 0606 的第 13 部分。

本部分由国家食品药品监督管理局提出。

本部分由国家食品药品监督管理局中检所医疗器械质量监督检验中心归口。

本部分国家食品药品监督管理局中检所医疗器械质量监督检验中心起草。

本部分主要起草人：陈亮、奚廷斐、王春仁。

组织工程医疗产品

第 13 部分:细胞自动计数法

1 范围

YY/T 0606 的本部分所述的原理和方法适用于绝大部分类型细胞的自动计数,包括黏附生长细胞和悬浮生长细胞。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于 YY/T 0606 的本部分。

2.1

电解液 electrolyte

用于悬浮细胞的具有轻微传导性的溶液。

2.2

重合 coincidence

一个以上的细胞同时穿过小孔。

2.3

原始计数 raw count

未对重合细胞进行校正的细胞计数。

2.4

校正计数 corrected count

对重合细胞进行校正后的计数。

2.5

阈值 size thresholds

在仪器上设定的特定细胞群体的大小临界值,是可调整的界值。在此界值之外的细胞或碎片将被排除在分析之外。

3 原理

本部分中细胞自动计数的原理方法是电阻抗,即检测由悬浮在传导性溶液中的细胞通过小孔管上的小孔时产生的电阻抗变化来进行细胞计数(如图 1 所示)。当细胞悬浮在传导性溶液中时(例如磷酸盐缓冲液),它们是不连续的绝缘体。当细胞悬浮液通过圆柱形的小孔管时,每一次细胞的通过都将改变小孔两侧电极间的阻抗,由此产生的电脉冲可用于细胞计数。细胞在小孔间通过被检测到的区带称为“电感应区”。这种原理方法允许在非常窄的大小分布范围内通过对电脉冲的分析有选择性的计数细胞。脉冲的数目意味着细胞的数量,脉冲的幅度与细胞的体积相关。

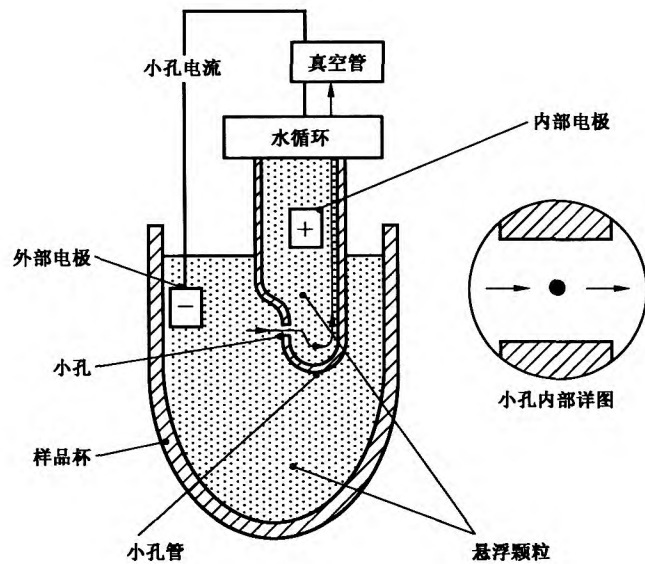


图 1 细胞自动计数法原理示意图

4 意义和用途

4.1 组织工程医疗产品的细胞应进行常规分析,包括细胞数量。传统的人工计数方法,如显微镜下用血细胞计数器计数,已报道会产生 10%~30% 的误差,并且费时。基于电阻抗原理上的细胞自动计数具有更高的准确度、精确性,更加快速,不只限于分析人体细胞和血液细胞,几乎可用于所用种类和类型的细胞。

4.2 电阻抗原理在 20 世纪 50 年代即被发现,目前许多公司都可以制造基于这一原理的细胞自动计数仪器。细胞自动计数仪器有助于消除人工计数时不同操作者带来的误差。

5 检测限的讨论

5.1 重合

当一个以上的细胞同时穿过小孔时,不是产生两个独立的脉冲,而是产生一个更大的脉冲。结果会发生细胞计数结果偏少,测量的细胞体积增大。重合发生的频率可看作是细胞浓度在统计学上可预测的函数,因此可通过仪器校正,这称为重合校正。通过降低细胞悬液浓度,可最大程度的降低重合的发生,确保结果的准确(误差不超过 5%)。

5.2 细胞的尺寸变化

细胞直径变化可达 30 : 1,体积变化可达 27 000 : 1,而这仅是反应了选择的小孔管的测量功能。应用这项技术,可以在大约 0.6 μm ~1 200 μm 的范围内测量。低限以下会受到热和电噪声干扰。

5.3 小孔管的测量范围

小孔管的测量范围与其直径成比例。在 0.02 倍直径到 0.8 倍直径的范围内,小孔管的测量范围与直径成线性相关。但在细胞尺寸大于 0.6 倍小孔管直径时,小孔管容易堵塞。因此,在实际操作中,小孔管的测量范围被规定为其直径的 2%~60%。

5.4 电解质溶液

细胞悬浮溶液应具有传导性,对细胞大小无影响。最常选择的电解质溶液是磷酸缓冲生理盐水。

6 干扰

6.1 碎屑和细胞碎片

修正细胞大小阈值的设置有助于分析时校正计数的碎屑或细胞碎片。

6.2 细胞聚集体

细胞聚集体将被视作单一细胞计数,体积也将大于单个的细胞。市售的酶溶液有助于制备单细胞悬浮液。

6.3 沉淀物

细胞样品可因放置出现沉降导致计数减少,可在检测前多次翻转细胞样品容器,以获得更准确和精确的结果。

6.4 黏附

细胞可能黏附到样品容器壁上,因此影响计数的准确性。

6.5 其他

穿过小孔的大量电流可能会损害细胞膜。通常仪器已经设置了最合适的电流。

7 危害

7.1 警告(化学)

不能使用非水溶剂的电解质溶液。在混合某些电解质溶液时应小心,可能会发生剧烈反应。在酸性溶液中不能使用叠氮化合物。不能使用易燃的电解质溶液和有机溶剂。

7.2 警告(电学)

仪器内存在高压。仪器必须放置在一个稳定、干燥的实验台上,必须正确接地。

7.3 警告(生物学)

应遵守相应的生物安全制度。

8 操作

8.1 不论使用何种品牌的仪器,测试方法的操作程序是相似的。不同制造商的仪器可能在仪器大小、可选择的小孔管直径、数据采集方式(针点式打印机或电脑)等方面不同。另外,某些型号的仪器只提供细胞计数功能,然而,某些型号的仪器可以分析细胞数量和细胞大小分布,也有某些型号的仪器在计数的基础上,通过区别细胞碎片、细胞核、完整的细胞,可分析活细胞数。

8.2 按制造商的使用说明对仪器进行校正。仪器的校正应每月或在每次的操作使用后进行。应使用标准粒子进行校正。

8.3 用电解质溶液(常用磷酸盐缓冲生理盐水)稀释细胞悬液,通过翻转七到八次使之轻轻混合。应在样品制备的 20 min 内进行分析。

8.4 在仪器上设定待分析的特定细胞的大小阈值。选择合适的小孔管。制造商的操作手册中可能会有合适的操作方案。

8.5 设定每次分析时的溶液体积,通常是 0.5 mL。把细胞样品放在样品台上。

8.6 按启动键。为了监测小孔管是否堵塞,可以观察每份细胞样品的分析时间。而且,目前大部分的仪器都有小孔管观察窗,能方便的检查是否堵塞。另外,许多仪器也提供小孔管自动除障功能。

8.7 结果记录。许多仪器能自动记录和分析结果。

8.8 为了确保检测质量,应周期性的测定不同浓度的标准品或参考品。应由每一实验室自行制定质量控制方案。管理机构也可不定期的要求实验室进行标准品或参考品的比较测试。

9 精度和偏倚

国际血液学标准化委员会通过测定红细胞评估本计数方法得出的变异系数是 0.24%~0.72%。某些制造商的使用手册中会列出典型细胞类型的测量精度。随仪器一起提供有合格的仪器安装、使用、性能维护说明书。本计数方法的偏倚尚未有相关报道。国际血液学标准化委员会已将此计数方法作为红细胞和白细胞计数的参考方法。

参 考 文 献

- [1] Picciolo, G. L. , Hellman, K. B. , and Johnson, P. C. , "Meeting Report: Tissue Engineered Medical Products Standards: The Time is Ripe." *Tissue Engineering* , Vol 4(1), 1998, pp. 5-7.
- [2] Lamo, S. , Ronot, X. , and Lechay, P. , "Effects of Sodium Butyrate on Growth and Cell-Cycle Kinetics of Cultured Rabbit Articular Chondrocytes," *J. Cell Physiol.* , Vol 120, 1984, pp. 384-390.
- [3] Ryan, J. M. , Sharf, B. R. , and Cristofalo, V. J. , " The Influence of Culture Medium Volume on Cell Density and Lifespan of Human Diploid Fibroblasts," *Expt'l. Cell Res.* Vol 91, 1975, pp. 389-392.
- [4] Betz, N. A. , Fattaey, H. K. , and Johnson, T. C. , " Growth Inhibition of BALB/c Mouse Keratinocytes by TGF-B1 and CeReS-18 Appears to Act through Distinct Mechanisms," *Expt'l. Cell Res.* , Vol 227, 1996, pp 47-54.
- [5] Lehman, R. , Fernandez, L. A. , Bottino, R. , Szabo, S. , et. Al. , " Evaluation of Islet Isolation by a New Automated Method (Coulter Multisizer 11e) and Manual Counting," *Transp. Proc.* Vol 30, 1998, pp. 373-374.
- [6] Stegemann, Jan P. , MS. , Santosh, Raine, MS. , Nicholson, D. T. , MS. , et. al. , "Comparison of Analytical Methods for Quantitation of Isolated Porcine Hepatocyte Yields," *Tissue Engineering* , Vol 6(3) , 2000, pp. 253-264.
- [7] Li, Rong-hao, Chen, Jian, Hammonds, Glenn, et. al. , " Identification of Gas6 as a Growth Factor for Human Schwann Cells," *The Journal of Neuroscience* , Vol 16(6) , 1996, pp. 2012-2019.
- [8] Coulter, W. H. , " High Speed Automatic Blood Cell Counter and Cell Size Analyses," *Pro. Natl. Electr. Conf.* , Vol 12, 1956, pp. 1034-1040.
- [9] Lewis, S. M. , England, J. M. , and Kubota, F. "Coincidence correction in red blood cell counting," *Phys. Med. Biol.* Vol 34(9) , 1989, pp. 1239-1246.
- [10] Raphael, Stanley, S. *Lynch's Medical Laboratory Technology*. Saunders Co. , Philadelphia. , 1983.
- [11] England, J. M. , Rowan, R. M. , Bins, M. , et. al. , " The assignment of values to fresh blood used for calibrating automated blood cell counters," *Clin. Lab. Haemat.* , Vol 10, 1988, pp. 203-212.

中 华 人 民 共 和 国 医 药
行 业 标 准
组 织 工 程 医 疗 产 品
第 13 部分:细胞自动计数法
YY/T 0606.13—2008

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 11 千字
2008年9月第一版 2008年9月第一次印刷

*

书号: 155066·2-19004 定价 14.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533



YY/T 0606.13—2008