

ICS 67.100  
CCS X 04

# T/XMSA

## 厦门市医疗器械协会团体标准

T/XMSA001-2026

### 人源性益生菌流式细胞术定量检测方法

Quantitative flow cytometry assay for human-derived probiotics

2026-05-27 发布

2026-06-06 实施

厦门市医疗器械协会 发布

## 目 次

前 言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 缩略语 .....	1
5 方法提要 .....	2
6 试剂和材料 .....	2
6.1 一般要求 .....	2
6.2 染色试剂 .....	2
6.3 微球 .....	2
6.4 稀释液 .....	2
6.5 无菌容器 .....	2
7 仪器和设备 .....	2
8 实验条件 .....	3
8.1 环境条件 .....	3
8.2 洁净要求 .....	3
8.3 仪器状态 .....	3
9 检测步骤 .....	3
9.1 样品制备 .....	3
9.2 样品荧光信号标记及内标法相对计数 .....	3
9.3 样品检测 .....	4
10 结果计算 .....	4
11 结果表述 .....	5
12 试验报告 .....	5
附 录 A (资料性) 试剂配制 .....	6
附 录 B (资料性) 流式细胞术设门 .....	7
附 录 C (资料性) 流式细胞仪试验参数 .....	10

## 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。

本文件由厦门市医疗器械协会提出并归口。

本文件起草单位：厦门承葛生物科技有限公司、台湾义守大学、台湾海洋大学、厦门市标准化研究院、中国计量科学研究院、香港理工大学、马歇尔茈诺研究院（香港）、福建农林大学、福建师范大学生命科学学院、集美大学、厦门市九体医学与治未病大数据研究院、芳略（厦门）生物科技有限公司、丹尼斯克（中国）投资有限公司（IFF）、上海承葛生物科技有限公司、上海承葛健康科技有限公司、上海益集爱斯生物科技有限公司

本文件主要起草人：何剑全、张帮周、肖传兴、廖健森、马聪、张金梅、陈瑀、许艳稚、梁银龙、徐炜、杨璐溪、林昊、曹曼、林檀、林爱强、张丽珊、朱笑蝶、邱和松、隋志伟、郭湘平、鹭强、姜泽东、林宇菡、陈玉新、柴明亮、李季武、罗亮。

# 人源性益生菌流式细胞术定量检测方法

## 1 范围

本文件规定了采用流式细胞术测定人源性益生菌产品中总菌浓度、活菌浓度及活菌率的快速定量检测方法。

本文件适用于粉剂、片剂、胶囊、口服液等人源性益生菌产品及半成品的定量。

本方法不适用于含孢子型益生菌、包埋型益生菌和含复杂成分（如高浓度金属离子、盐离子、强酸、强碱等）的样品、环境样品和非益生菌样品。

## 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 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定

《中华人民共和国药典》

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**人源性益生菌** human-derived probiotics

源自人体肠道等人体原生微生态环境，经筛选、分离、纯化获得，对宿主产生有益生理调节作用、无致病性的活性微生物菌株。如乳酸菌、双歧杆菌等益生菌。

### 3.2

**流式细胞术** flow cytometry

一种对悬液中的细胞/颗粒进行高速、多参数的单颗粒定量分析/分选技术。

### 3.3

**微球** microspheres

粒径均一、荧光特征稳定、浓度已知、生物惰性的标准化聚合物微球，作为参考物质用于计算待测样品浓度。

### 3.4

**内标法** internal standard method

在待测样品中定量加入已知颗粒浓度的标准微球，通过检测样品中目标微生物与标准微球的事件计数比值，计算得到样品中微生物浓度的定量分析方法。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

FSC: 前向散射光 (forward scatter)

SSC: 侧向散射光 (side scatter)

PI: 碘化丙啶 (propidium iodide)

SYTO9: 绿色荧光核酸染料SYTO9 (SYTO9 green fluorescent nucleic acid stain)

## 5 方法提要

本方法采用 SYTO9、PI 双重荧光染料对人源性益生菌样品进行荧光标记, 同时添加微球作为参考物质, 完成样品微生物相对定量检测。细胞膜完整的细菌以绿色荧光信号为主, 细胞膜受损的细菌可被PI染色, 表现为红色荧光增强, 并伴随绿色荧光信号变弱。

样品标记完成后, 采用流式细胞仪对悬浮颗粒进行逐一检测, 依据 FSC、SSC 及荧光信号差异, 区分活菌、死菌与内标微球, 计算样品微生物活菌率。结合微球实测浓度与理论添加浓度的校正比例, 计算得到样品中益生菌活菌浓度、总菌浓度。

本检测方法为微生物非特异性流式检测技术, 无菌株特异性识别能力; 若待测样品中存在杂菌、非目标微生物, 会被仪器同步采集识别, 当待测样品中存在非目标微生物或其他可被染色并被采集的颗粒时, 可能对结果产生干扰, 导致总菌浓度或活菌浓度测定值偏高。

## 6 试剂和材料

### 6.1 一般要求

本文件所用试剂若无特殊说明, 均为分析纯; 试验用水应符合 GB/T 6682 规定的二级水及以上级别。所有试剂在使用前应避免微生物污染, 避光、低温保存。

### 6.2 染色试剂

#### 6.2.1 SYTO9

用于微生物核酸染色。应在不高于  $-20^{\circ}\text{C}$  条件下避光保存, 并按照试剂说明书进行稀释配制。

#### 6.2.2 PI

用于细胞膜破损微生物核酸染色。应在不高于  $-20^{\circ}\text{C}$  条件下避光保存, 并按照试剂说明书进行稀释配制。

### 6.3 微球

应按照产品说明书进行保存。

### 6.4 稀释液

应选用 0.9% 氯化钠注射液 (符合《中华人民共和国药典》要求)。

### 6.5 无菌容器

应为经灭菌工艺处理的密封性容器。

## 7 仪器和设备

仪器和设备应包括但不限于:

- 超净工作台或生物安全柜；
- 微量移液器；
- 涡旋振荡器（0~3600 rpm）；
- 电子分析天平（1 mg ≤ e）；
- 超声波均质仪（20 ~ 40 kHz）；
- 流式细胞仪（包含 488 nm 激发光，500 nm ~ 570 nm 检测器和 > 570 nm 检测器）。

## 8 实验条件

### 8.1 环境条件

试验环境温度控制在 18℃ ~ 26℃，相对湿度 40% ~ 70%；检测过程避免强光直射荧光染料。

### 8.2 洁净要求

样品前处理全过程应在二级生物安全洁净操作台内完成，防止外源杂菌污染。

### 8.3 仪器状态

流式细胞仪检测前需进行光路校准、质控微球校准，保证仪器稳定性。

## 9 检测步骤

### 9.1 样品制备

9.1.1 样品的全部制备过程均应遵循无菌操作程序。

9.1.2 冷冻样品应先在 37℃ 条件下水浴解冻，时间不超过 30 min。

9.1.3 粉剂样品：以无菌操作称取 10 g 样品，置于装有 90 mL 0.9% 氯化钠注射液的无菌均质容器中，于 3600 rpm ~ 4200 rpm 涡旋振荡 1 min ~ 2 min，制成 1:10 样品匀液。

9.1.4 片剂样品：以无菌操作称取 10 g 样品，置于装有 90 mL 0.9% 氯化钠注射液的无菌均质容器中，于 3600 rpm ~ 4200 rpm 涡旋振荡 3 min ~ 5 min，制成 1:10 样品匀液。

9.1.5 胶囊样品：以无菌操作称取 10 g 胶囊内容物样品，置于装有 90 mL 0.9% 氯化钠注射液的无菌均质容器中，于 3600 rpm ~ 4200 rpm 涡旋振荡 1 min ~ 2 min，制成 1:10 样品匀液。

9.1.6 口服液样品：应先将其充分摇匀后，以无菌吸管或移液器吸取 10 mL 样品置于装有 90 mL 0.9% 氯化钠注射液的无菌均质容器中，于 3600 rpm ~ 4200 rpm 涡旋振荡 1 min ~ 2 min，制成 1:10 样品匀液。

9.1.7 若样品量不足，可改为以无菌操作称取 1 g 样品，置于装有 9 mL 0.9% 氯化钠注射液的无菌均质容器中，涡旋振荡，制成 1:10 样品匀液。

### 9.2 样品荧光信号标记及内标法相对计数

#### 9.2.1 混合染料制备

应在确认 SYTO9 稀释液（配制方法参见附录 A.1）和 PI 稀释液（配制方法参见附录 A.2）已完全融化后，按照 1:1 的比例混合配制。实验过程应避免强光照射。

#### 9.2.2 微球准备

应将微球（参见附录 A.3）超声 10 min ~ 15 min 后备用。使用前应涡旋振荡 10 s 以保证充分均质。

### 9.2.3 空白对照

- 吸取 987  $\mu\text{L}$  0.9% 氯化钠注射液至无菌 2.0 mL 离心管中，加入 3  $\mu\text{L}$  的混合染料；
- 振荡混匀并室温避光静置 15 min；
- 加入 10  $\mu\text{L}$  的微球并再次振荡混匀；
- 上机流式细胞仪排除背景干扰。

### 9.2.4 荧光信号标记及内标法操作流程

荧光信号标记及内标法操作流程见图 1，应以下步骤进行：

- 吸取 977  $\mu\text{L}$  0.9% 氯化钠注射液至无菌 2.0 mL 离心管中，加入 3  $\mu\text{L}$  的混合染料和 10  $\mu\text{L}$  的样品稀释液；
- 振荡混匀并室温避光静置 15 min；
- 加入 10  $\mu\text{L}$  的微球并再次振荡混匀；
- 每个样品平行试验两次。

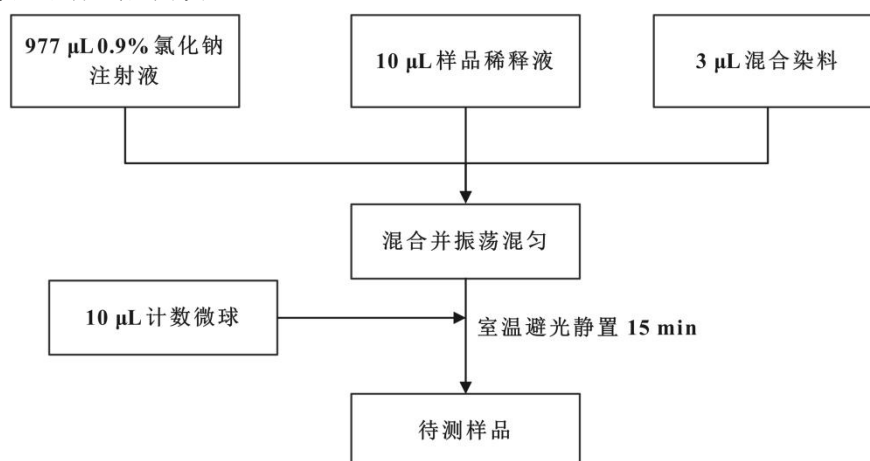


图 1 荧光信号标记及内标法操作流程

### 9.3 样品检测

应将待测样品按照流式细胞仪说明书进行上机检测，检测参数参见附录 C。

## 10 结果计算

10.1 流式细胞仪数据分析处理见附录 B，通过流式细胞仪可直接得到样品活菌率结果。

10.2 总菌浓度按照公式（1）（2）计算：

$$K = N_{\text{微球}} \div N_{\text{实测}} \dots\dots\dots (1)$$

$$N_{\text{总}} = N_1 \times K \times 1000 \times d \dots\dots\dots (2)$$

式中：

$K$  ——相对微球计算系数；

$N_{\text{微球}}$  ——微球浓度，单位为个每微升（个/ $\mu\text{L}$ ）；

- $N_{\text{实测}}$  ——仪器测定微球浓度，单位为个每微升（个/ $\mu\text{L}$ ）；  
 $N_{\text{总}}$  ——样品总菌浓度，单位为个每毫升（个/ $\text{mL}$ ）或个每克或（个/ $\text{g}$ ）；  
 $N_I$  ——仪器测定总菌浓度，单位为个每微升（个/ $\mu\text{L}$ ）；  
 1000 —— $\mu\text{L}$  和  $\text{mL}$  的单位计算系数；  
 $d$  ——样品稀释倍数。

### 10.3 活菌浓度按照公式（1）（3）计算：

$$N_{\text{活}}=N_2 \times K \times 1000 \times d \cdots \cdots (3)$$

式中：

- $N_{\text{活}}$  ——样品活菌浓度，单位为个每毫升（个/ $\text{mL}$ ）或个每克或（个/ $\text{g}$ ）；  
 $N_2$  ——仪器测定活菌浓度，单位为个每微升（个/ $\mu\text{L}$ ）；  
 1000 —— $\mu\text{L}$  和  $\text{mL}$  的单位计算系数；  
 $d$  ——样品稀释倍数。

## 11 结果表述

- 11.1 平行试验两次测定结果相对偏差应不大于 10%，否则重新试验。  
 11.2 样品中总菌浓度以  $N_{\text{总}}$  个/ $\text{g}$  或 个/ $\text{mL}$  报告。  
 11.3 样品中活菌浓度以  $N_{\text{活}}$  个/ $\text{g}$  或 个/ $\text{mL}$  报告。  
 11.4 样品中活菌率以  $N\%$  报告。  
 11.5 结果修约应符合 GB/T 8170 的规定。

## 12 试验报告

试验报告应包括但不限于以下信息：

- 本报告编号；
- 样品名称、批次、生产单位；
- 检测日期、检测环境；
- 仪器型号、检测参数；
- 原始数据（冷冻样品需包含解冻温度及时间）、计算结果；
- 试验人员、审核人员；
- 异常现象说明。

附 录 A  
(资料性)  
试剂配制

A. 1 SYTO9 荧光染料

采用商品化 SYTO9 nucleic acid stain (3.34 mM)，或可自行使用二甲亚砜配制。

A. 2 PI 荧光染料

采用商品化 Propidium iodide (20 mM)，或可自行使用二甲亚砜配制。

A. 3 微球

采用商品化微球 ( $1.0 \times 10^8$  beads/mL)，或自行使用纯水稀释制备。

## 附录 B (资料性) 流式细胞术设门

### B.1 荧光补偿调整

参照 9.2.4 步骤制备单染 SYTO9 的活菌样品及死菌样品，单染 PI 的活菌样品及死菌样品。参照流式细胞仪说明书进行荧光补偿调整。

### B.2 细菌主群体设门

在 FSC-A vs SSC-A 密度图中，以颗粒大小与内部复杂程度为评估标准，初步设门确定细菌主群体。分别上样空白样品（0.9% 氯化钠注射液）与目标细菌样品，以确定背景噪音与细菌群体的位置。空白样品（ck）的流式图像显示背景噪音与杂质区域（Background）位于左下方。活菌与死菌样品的流式图像显示细菌主群体（Bac）。采用多边形门分别圈定背景区域与细菌群体，如图 B.1 所示。

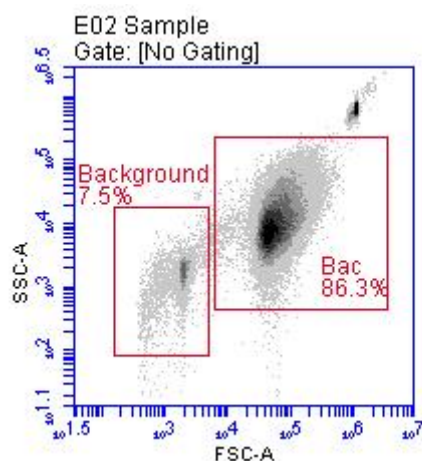


图 B.1 细菌主群体设门

### B.3 微球设门

在 FSC-A vs SSC-A 密度图中，以上样含微球的样品确定微球区域（microspheres）。微球位于右上方，如图 B.2 所示。

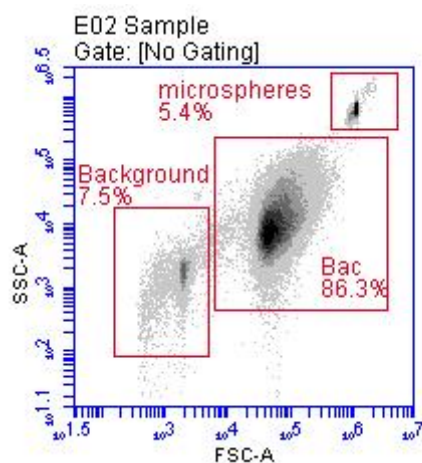


图 B.2 微球设门

#### B.4 活/死菌区分设门

在细菌群体（Bac）基础上进一步设门，如图 B.3 所示。SYTO9 为跨膜荧光核酸染料，可使所有含 DNA 的颗粒带有绿色荧光，而大小与细菌相似的杂质颗粒表现为弱绿色荧光或无绿色荧光。根据这一特点，以 FSC 与绿色荧光通道（FITC）为轴，进一步设门确认细菌群体（Bac-1）。

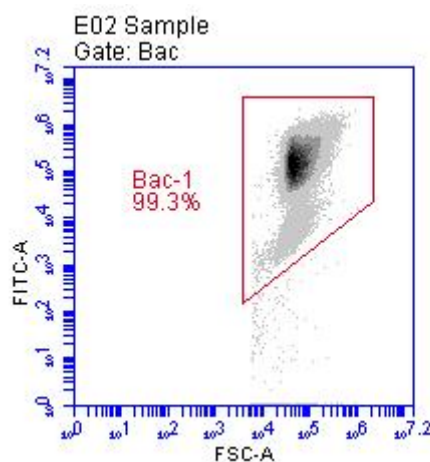


图 B.3 带荧光信号细菌群体设门

在细菌群体（Bac-1）基础上，以 FITC - A vs PerCP - A 作图，如图 B.4 所示。SYTO9 可标记所有含 DNA 的细菌（活菌与死菌均呈绿色荧光阳性），PI 为非跨膜染料，仅能进入死菌并使其带有红色荧光。理论上，细胞膜完整的细菌发出亮绿色荧光，而膜受损的细菌则显示出明显较少的绿色荧光，而且也发出红色荧光。

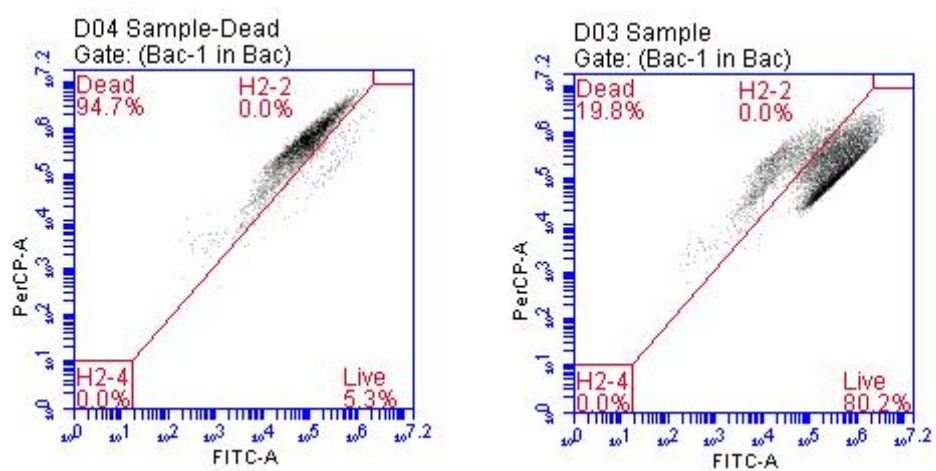


图 B.4 死菌/活菌设门（左图为灭活益生菌样品，右图为正常益生菌样品）

根据样品实际检测谱图进行设门。

附 录 C  
(资料性)  
流式细胞仪试验参数

流式细胞仪试验参数见表 C.1。

表C.1 流式细胞仪试验参数

光学系统	激发源	激发波长 488 nm, 强度大于 20 mW
	检测器	至少两个荧光及散射通道
		绿色荧光通道: 波长 500 nm ~ 570 nm
		橙色或红色荧光通道: 波长 > 570nm
		散射光: 侧向散射光 (SSC) 和前向散射光 (FSC)
进样流速	10 $\mu$ L ~ 60 $\mu$ L 每分钟 <sup>a</sup>	
<sup>a</sup> 该参数需根据不同流式细胞仪进行调整, 具体参数设置请参照仪器使用说明书		