

国家标准《细胞分选用磁珠性能检测方法》
(征求意见稿)

编制说明

《细胞分选用磁珠性能检测方法》标准起草组

2025 年 3 月

目 录

（一）工作简况.....	3
（二）国家标准编制原则、主要内容.....	4
（三）主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益.....	17
（四）与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况.....	44
（五）以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因.....	44
（六）与有关的现行法律、行政法规及相关标准的关系	44
（七）重大分歧意见的处理经过和依据.....	44
（八）涉及专利的有关说明.....	44
（九）实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期建议等措施建议.....	44
（十）其他应予说明的事项.....	44

国家标准《细胞分选用磁珠性能检测方法》编制说明

（一）工作简况，包括任务来源、协作单位、起草过程、国家标准主要起草人及其所做的工作等

1、任务来源

本标准根据国标委公布的2024年第一批国家标准计划项目（国标委综合【2024】16号），本项目计划编号为20240308-T-469，名称为《细胞分选用磁珠性能检测方法》。

本标准由全国生化检测标准化技术委员会（SAC/TC 387）提出并归口。

本标准由_____联合起草。

2、目的和意义

拟解决细胞分选用磁珠性能检测方法标准缺失的问题和细胞分选用磁珠性能检测无完善的评价体系的问题。通过该标准的建立，可以规范国内细胞分选用磁珠生产市场行为，一定程度上消除技术壁垒，促进国际间的发展与合作，为世界一体化的市场开辟道路。

3、协作单位

4、标准编制过程和主要工作

（1）2022年1月至2023年4月，标准起草单位组织相关技术人员对《细胞分选用磁珠性能检测方法》标准项目进行了预研，课题组成员广泛收集了国内外100余篇标准、文献，了解了国内外相关技术动态，并且明确了工作思路和进程安排。

（2）2023年4月标准起草单位在收到全国生化检测标准化技术委员会生检标〔2023〕8号文件《关于召开生化检测领域2023年国家标准宣贯培训暨生物实验室自动化技术标准化交流研讨会的通知》后，提交了项目建议书以及国家标准草案。

（3）2024年3月收到全国生化检测标准化技术委员会【2024】5号文件《关于下达2024年第一批推荐性国家标准计划的通知》以及该标委会转发的国标委综合【2024】16号《国家标准委关于下达2024年第一批国家标准制修订计划的通知》立项文件，计划编号：20240308-T-469。

（4）2024年8月，起草小组对全国生化检测标准化技术委员会汇报了《细胞分选用磁珠性能检测方法》标准的起草工作，与会专家就《细胞分选用磁珠性能检测方法》标准（草案）进行了讨论，提出了宝贵的意见和建议。标准起草小组根据专家意见进行了修改和完善。

(5) 2024 年 3 月至 2025 年 3 月，进行《细胞分选用磁珠性能检测方法》标准的起草研制工作。完成了《细胞分选用磁珠性能检测方法》标准的编制说明，并对全国生化检测标准化技术委员会汇报了《细胞分选用磁珠性能检测方法》标准（草案）进一步完善和修改情况，向全国生化检测标准化技术委员会提交了《细胞分选用磁珠性能检测方法》标准（征求意见稿）和编制说明。

5、国家标准主要起草人及其所做的工作

(二) 国家标准编制原则、主要内容（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等）及其确定依据（包括试验、统计数据），修订国家标准时，还包括修订前后技术内容的对比

1、标准编制原则

本标准的编制依据 GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写》，并参照 GB/T 6379.1-2004《测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）第 1 部分 总则与定义》和 GB/T 6379.2-2004《测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）第 2 部分 确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法》。

2、确定国家标准主要内容（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等）及其确定依据（包括试验、统计数据）

本文件征求意见稿主要内容为细胞分选用磁珠性能检测方法，检测指标包括粒度、超顺磁性、磁回收率、无菌、内毒素、体外细胞毒性、细胞活率、细胞纯度、细胞得率。

调研市场上的细胞分选用磁珠，选取具有代表性的12种细胞分选用磁珠进行试验，信息见表2。

表 2 细胞分选用磁珠信息

序号	表面修饰	磁分离方式	分选方式	粒径 (官方资料)	磁性分选时磁珠用量 (每 10 ⁷ 细胞)
1	抗人 CD4 抗体	有柱式	阳选	50 nm	20 μL
2	抗小鼠 CD4 抗体	有柱式	阳选	50 nm	10 μL
3	抗小鼠 F4/80 抗体	有柱式	阳选	50 nm	10 μL
4	抗生物素抗体	有柱式	阴选	50 nm	20 μL
5	抗人 CD4 抗体	有柱式	阳选	50 nm	10 μL
6	抗人 CD3 抗体	有柱式	阳选	50 nm	10 μL
7	抗人 CD4 抗体	有柱式	阳选	50 nm	10 μL

8	抗人 CD8 抗体	有柱式	阳选	50 nm	10 μ L
9	链霉亲和素	无柱式	阴选	300 nm	20 μ L
10	抗小鼠 CD8 抗体	无柱式	阳选 解离	2.8 μ m	15 μ L
11	抗 IgG 抗体	无柱式	阴选	4.5 μ m	200 μ L
12	抗小鼠 CD19 抗体	有柱式	阳选	50 nm	5 μ L

关于细胞活率、细胞纯度和细胞得率的检测，试验中需要使用哺乳动物细胞或全血等，如来自小鼠脾脏的细胞、人外周血单个核细胞（Peripheral blood mononuclear cell, PBMC）和人外周血等，由于该类型的细胞是多种细胞的混合物，目前国内外均没有标准品，因此本文件对细胞活率、细胞纯度和细胞得率试验的标本进行了以下规定：

标本限定于细胞分选用磁珠适用范围，并注明标本类型及标本中目标细胞占总细胞的比例。标本可来源但不限于以下几类：

- 1) 商用标本。注明：厂家、货号、批号、质检报告。
- 2) 临床追踪的患者血液或活检标本。注明：性别、年龄、身高、体重、身体质量指数（Body Mass Index, BMI）、种族、健康状况。
- 3) 试验动物。所有的动物试验应在经国家认可机构批准并符合试验室动物福利全部适用法规的试验室内进行，并且还应符合GB/T 16886.2的要求。注明：物种品系、洁净级别、周龄、健康状况。
- 4) 或在以上标本中加阳性细胞，阳性细胞可来源于流式分选，或纯培养细胞系等。

为了便于理解，后文将所有分选前的标本统称为分选前的细胞悬液。

2.1 粒度

粒度是表征细胞分选用磁珠粒径大小的重要基础参数。粒度的表征方法采用动态光散射或激光衍射法，该方法在GB/T 40268《免疫磁性材料性能检测方法》中作了详细的规定，本文件粒度的检测方法按照GB/T 40268规定的粒度执行。




经调研，目前市场上纳米级的细胞分选用磁珠有50 nm磁珠（如德国美天旎、南京金斯瑞、南京东纳生物等），百纳米级磁珠（如biolegend的130 nm磁珠、苏州海狸生物300 nm磁珠等），微米级磁珠（如Dynabeads的1 μ m、2.8 μ m和4.5 μ m的磁珠等）。这类细胞分选用磁珠的粒度均按照GB/T 40268规定的粒度执行。

2.2 超顺磁性

超顺磁性是表征细胞分选用磁珠磁性能的重要参数。在细胞分选过程中，磁珠的超顺磁性影响细胞分选的速度和富集效果，该性能表征还能为磁珠的生产提供品控指导。

测量细胞分选用磁珠的超顺磁性，首先需要从磁珠溶液中获得固体磁珠，然后使用振动样品磁强计（Vibrating Sample Magnetometer, VSM）对固体磁珠进行磁学性能测试。由于不同粒径磁珠在一定磁场条件下表现的磁响应不同，目前市场上细胞分选用磁珠的磁分离器包括有柱式和无柱式两种，有柱式磁分离器包括分选柱、磁力架和磁力支架，无柱式磁分离器只有磁力架。其中100 nm以下磁珠适用有柱式，100 nm~200 nm适用有柱式和无柱式，300 nm以上适用无柱式（如表2.2所示）。对适用无柱式的细胞分选用磁珠的超顺磁性的检测，在GB/T 40268中已经进行了论证，其超顺磁性测定按照GB/T 40268规定的超顺磁性执行。

表2.2 磁性分离器种类

磁性分离器种类			
适用磁珠粒径	200 nm以下	100nm以上	300nm以上
细胞分选用磁珠	美天旎 50 nm	Biolegend 130 nm	海狸 300 nm
应用举例	金斯瑞 50 nm	Stemcell 100 nm~200 nm	Dynabeads 1 μm

进行VSM磁学性能检测所需磁珠固体材料的质量一般为10 mg以上，有些第三方检测公司甚至要求20 mg以上，而对于适用于有柱式的细胞分选用磁珠，其质量浓度很小（约0.5mg/mL），若通过分选柱形式获得固体磁珠，其效率低，检测需提供更多的磁珠样品以及使用昂贵的分选柱，使得检测成本更高，因此本文件规定对于该类磁珠使用离心的方式来获得固体磁珠（记为样本前处理方法）。通过离心并干燥得到的固体磁珠按照GB/T 40268规定的超顺磁性执行。

离心时间的确定。取1 mL有柱式细胞分选用磁珠置于离心管中，在4 °C条件下，20000 g离心0 min、30 min、60 min、90 min，分别取原液（代表0 min）和离心后的上清液100 μL，使用酶标分析仪进行360 nm~800 nm扫描，结果可以看出（如图2.2所示），离心90 min后，上清液的吸光度值已经几乎接近于磁珠保护液的吸光度值，再延长离心时间对获得固体磁珠量的效果不大，因此，将离心时间设定为1.5 h。

有柱式细胞分选用磁珠样本前处理方法：取适量细胞分选用磁珠原液，在4 °C条件下，20000 g离心约1.5 h，待上清液澄清后弃上清，加少量纯水混匀磁珠，将混匀的磁珠溶液转

移至已烘干至恒重的玻璃称量瓶中，干燥至恒重（干燥步骤参照GB/T 40268描述的质量浓度）。

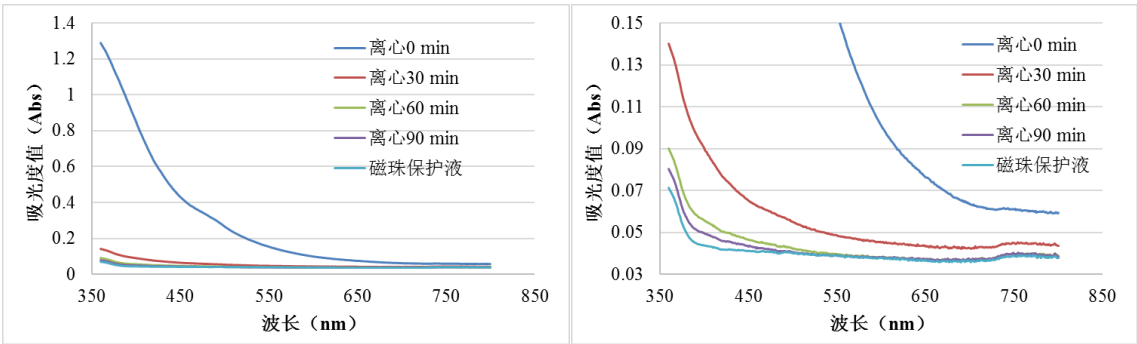


图2.2 离心时间与上清液吸光度值的变化情况

注：左图显示的是完整数据，右图是突出显示左图中的吸光度值小于0.15部分的数据

2.3 磁回收率

磁回收率是反应细胞分选用磁珠磁性能的重要参数之一。参考GB/T 40268规定的磁回收率测定方法，细胞分选用磁珠磁回收率测定采用分光光度法。采用分光光度法测定磁回收率时，首先需要对细胞分选用磁珠进行可见光（360 nm~800 nm）光谱扫描，以最大吸收峰对应的波长为最佳测试波长。

(1) 无柱式

取稀释至1 mg/mL的细胞分选用磁珠（300 nm、4.5 μm）100 μL，加入96孔酶标板中，使用酶标分析仪进行360 nm~800 nm扫描，结果如图2.3.1。由图2.3.1可以看出，300 nm细胞分选用磁珠的最佳测试波长为468 nm，4.5 μm细胞分选用磁珠的最佳测试波长为488 nm。

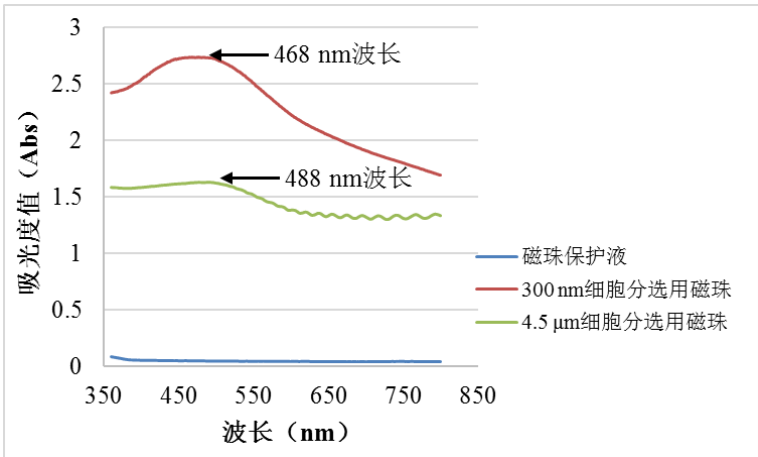


图2.3.1 无柱式细胞分选用磁珠的360 nm~800 nm扫描

(2) 有柱式

有柱式细胞分选用磁珠粒径较小（如表2所示），磁珠颗粒与存在的液体环境呈一种稳定的胶体状态，造成对朗伯-比尔定律的偏离。

分别取100 μL 两种不同的有柱式细胞分选用磁珠原液，使用酶标分析仪（酶标分析仪吸光度读数上限为6）进行360 nm~800 nm扫描，结果如图2.3.2。取3 mL有柱式细胞分选用磁珠，加入1 cm石英比色皿（光程1 cm），使用分光光度计（分光光度计吸光度读数上限为4）进行360 nm~800 nm扫描；取100 μL 同种磁珠，使用酶标分析仪进行360 nm~800 nm扫描，结果如图2.3.3。结果表明这些磁珠在360 nm~800 nm波长范围内没有最大吸收峰，且检测光程增大时，吸光值相应增大，无法通过最大吸收峰的方式确定最佳测试波长。

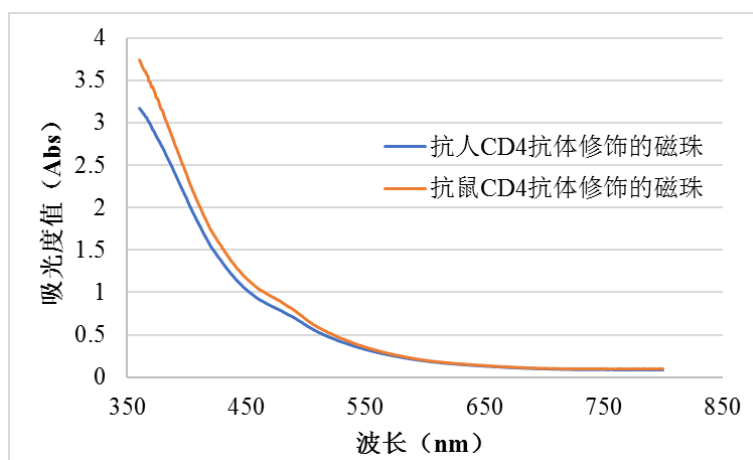


图2.3.2 酶标分析仪对两种磁珠进行360 nm-800 nm扫描

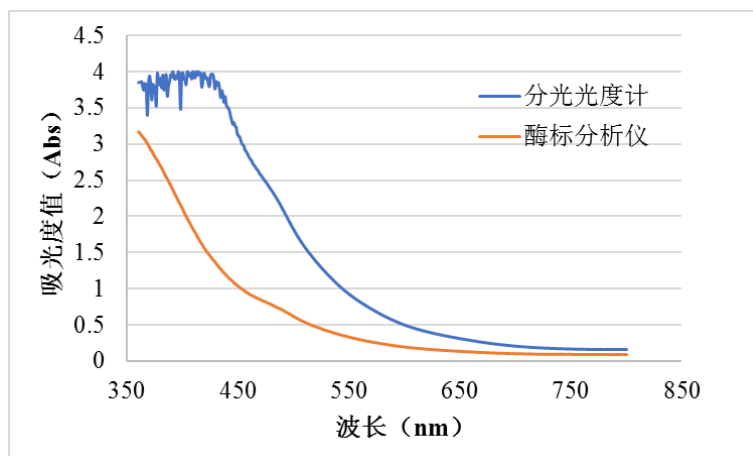


图2.3.3 分光光度计和酶标分析仪对同一磁珠进行360 nm-800 nm扫描

对8种不同的有柱式磁珠（包括三个品牌：3种抗人CD4抗体修饰的磁珠、1种抗鼠CD4抗体修饰的磁珠、1种抗人CD3抗体修饰的磁珠、1种抗鼠F4/80抗体修饰的磁珠、1种链霉亲和素修饰的磁珠、1种抗生物素抗体修饰的磁珠）进行360 nm~800 nm扫描，均未出现最大吸收峰，无法使用分光光度法测量该种磁珠的磁回收率。

因此，本文件规定只有当细胞分选用磁珠在可见光波长范围内具有最大吸收峰时，该类磁珠磁回收率的测定才可按照GB/T 40268规定的磁回收率执行。

2.4 无菌

细胞分选用磁珠应用于细胞的分选，无菌是细胞分选用磁珠最基本的应用性能要素。细胞分选用磁珠在制备和生产过程中，需添加非灭菌的磁性材料分散体，添加保护液作为产品的稳定剂，这些操作及试剂的存在均可能导致终产品的微生物污染，微生物污染干扰试验体系和试验结果，因此，细胞分选用磁珠的无菌检测非常必要。

《中华人民共和国药典》（2020年版）四部1101无菌检查法中这样描述——“无菌检查法包括薄膜过滤法和直接接种法。只要供试品性质允许，应采用薄膜过滤法”。鉴于磁珠保护液中可能存在抑菌剂，从而影响菌落生长，且细胞分选用磁珠均为固体磁珠和保护液的混合液，符合薄膜过滤法对样本的要求。故对细胞分选用磁珠的无菌检查采用《中华人民共和国药典》（2020年版）四部1101无菌检查法中的薄膜过滤法进行检测。

2.5 内毒素

细菌内毒素是革兰阴性菌的细胞壁组分，内毒素在环境中无处不在，内毒素污染能干扰生物学评价相关试验，导致得到错误的生物相容性结论，是细胞分选用磁珠的常见污染物。细胞分选用磁珠在制备、生产、储存、运输的过程中都有可能受细菌内毒素的污染，因此，细菌内毒素是体现细胞分选用磁珠应用性能最重要的参数之一。

《中华人民共和国药典》（2020年版）四部1143细菌内毒素检查法中这样描述——“当测定结果有争议时，除另有规定外，以凝胶限度试验结果为准”。另通过调研获悉，凝胶限度法也是生产商普遍采用的对细胞分选用磁珠进行内毒素检测的方法。基于细胞内毒素检测原理：当细菌死亡或自溶后便会释放出内毒素，通过用鲎试剂与细菌内毒素产生凝集反应，对细菌内毒素进行限度检测。本文件采用《中华人民共和国药典》（2020年版）四部规定的细菌内毒素检查法（通则1143）-凝胶限度试验检测内毒素。

（1）内毒素限值的确定

《中华人民共和国药典》（2020年版）四部1143细菌内毒素检查法中这样描述——“按人用剂量计算限值时，如遇特殊情况，可根据生产和临床用药试剂情况做必要调整，但需说明理由”。由于科研用细胞分选用磁珠不应用于临床，根据国家药品监督管理局发布的《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则》，临床用GMP（Good Manufacturing Practice of Medical Products）级别的细胞分选用磁珠被归类为其它原材料，不直接作用于

人体,或者极少量直接作用于人体。因此细胞分选用磁珠的内毒素限值的确定无法根据《药典》公式中的 $L = K/M$ 计算得出(L为供试品的细菌内毒素限值, K为人每千克体重每小时最大可接受的内毒素剂量, M为人用每千克体重每小时的最大供试品计量)。

通过对国内外细胞分选用磁珠生产厂商(美天旎、金斯瑞、海狸生物、同立海源等)进行调研,细胞分选用磁珠的内毒素限值均为2 EU/mL,以产品实际应用为依据,本文件将细胞分选用磁珠的内毒素限值规定为2 EU/mL。

根据内毒素限值2 EU/mL,对市场上应用广泛的6种不同磁珠(金斯瑞cat#L00863、美天旎cat#130-117-043、DynaL cat#11462D、海狸cat#70902、美天旎cat#130-045-101、DynaL cat#11417D)分别使用湛江安度斯生物有限公司和厦门鲎试剂生物科技有限公司的0.03 EU/mL灵敏度的鲎试剂进行内毒素凝胶限度检测,结果显示内毒素含量均小于2 EU/mL。结果表明将内毒素限值定为2 EU/mL是合理的。

(2) 细胞分选用磁珠的稀释

取适量细胞分选用磁珠,使用细菌内毒素检查用水对细胞分选用磁珠进行稀释,最大有效稀释倍数按式(1)计算:

$$MVD=L/\lambda \dots\dots\dots (1)$$

式中:

MVD——细胞分选用磁珠的最大有效稀释倍数;

L——细胞分选用磁珠需控制的内毒素限值,限值为2 EU/mL;

λ ——凝胶法鲎试剂的标示灵敏度,单位为EU每毫升(EU/mL)。

2.6 体外细胞毒性

细胞毒性是细胞功能的损伤,包括但不限于质膜完整性破坏、细胞器功能的干扰和细胞骨架破坏等。细胞分选用磁珠主要由磁性核心、外层的材料修饰和特异性标志物组成。磁性核心具有超顺磁性的特性,其材料主要是铁、钴、镍及其氧化物,其中氧化铁的应用最为广泛。材料修饰主要是连接磁性核心与特异性标志物,其材料包括无机材料(二氧化硅、金、石墨烯等)、有机材料(生物大分子、脂质体、树枝状大分子等)、仿生材料(细胞膜、巨噬细胞等)。特异性标志物包括抗体、链霉亲和素等。这些材料都是潜在的影响细胞、亚细胞和生物分子水平的生物学行为的因素。同时,磁珠在保存和使用过程中可能会存在降解和细胞内吞,这些都是潜在的导致细胞毒性的因素,通过体外试验检测细胞分

选用磁珠的体外细胞毒性十分必要，因此，体外细胞毒性是反映细胞分选用磁珠细胞生物相容性的重要参数。

（1）浸提时间的确定

科研级别的细胞分选用磁珠不应用于人体。根据中国国家药品监督管理局发布的《免疫细胞治疗产品药学研究与评价技术指导原则》，GMP级别的细胞分选磁珠被归类为其他原材料。用于细胞治疗的细胞在回输人体前会去除磁珠，因此磁珠不会接触人体。磁珠悬液的状态是磁珠保护液中含有固体状的磁珠，属于非水溶性液体样本，GB/T 16886.5-2017/ISO 10993-5:2009《医疗器械生物学评价 第5部分：体外细胞毒性试验》和GB/T 16886.12-2023/ISO 10993-12:2021《医疗器械生物学评价 第12部分：样品制备与参照材料》中对该类样本没有明确规定的浸提方法。

GB/T 16886.12-2023/ISO 10993-12:2021《医疗器械生物学评价_第12部分：样品制备与参照材料》中提出“短期接触的医疗器械细胞毒性试验中，浸提条件可选择 $(37\pm1)^{\circ}\text{C}$ 下浸提 $(24\pm2)\text{h}$对于长期 $(>24\text{h}\sim 30\text{d})$ 或持久接触 $(>30\text{d})$ 的医疗器械，细胞毒性试验中的浸提时间建议为72 h，因为浸提24 h获得的浸提物可能不足以代表器械使用24 h释放的化学物”。

细胞经磁珠分选后，有两种情况：（1）细胞与磁珠结合，如采用50 nm粒径的磁珠进行分选；（2）细胞表面没有磁珠，包括目标细胞未接触磁珠的情形和磁珠先结合在目标细胞表面后又被解离的情形，如采用300 nm磁珠和2.8 μm 磁珠。第一种情况下，细胞表面的磁珠会伴随细胞较长时间，按照超过24 h计算，浸提条件设定为 $(37\pm1)^{\circ}\text{C}$ 下浸提 $(72\pm2)\text{h}$ 。第二种情况下，磁珠不结合在细胞表面，按照短暂接触计算，浸提条件设定为 $(37\pm1)^{\circ}\text{C}$ 下浸提 $(24\pm2)\text{h}$ ，在浸提结束后，需要将浸提液放置在磁力架上，以去除浸提液中的磁珠，否则将影响细胞的观察。图2.6展示了磁珠附着在细胞表面的情形（96孔板，L929细胞，1万/孔），由图可以看出，50 nm磁珠几乎不影响细胞的观测，300 nm的磁珠影响细胞的观测。

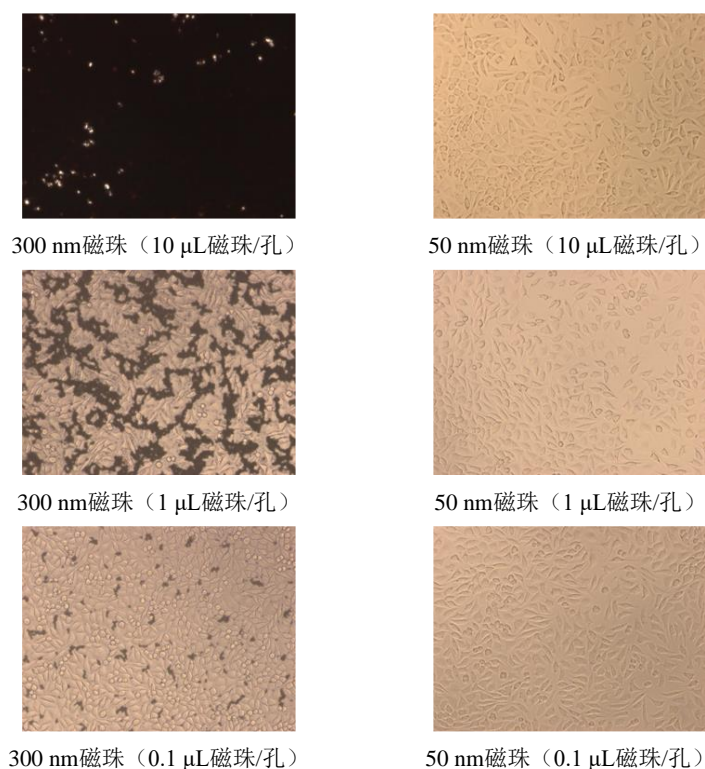


图2.6 磁珠附着在细胞表面的显微镜照片（100倍）

浸提时间应用情况说明：

1) 如经磁珠分选得到的细胞用于细胞治疗：分选结束后，如果磁珠结合在细胞表面，则该种情况符合长期接触（ ≥ 24 h）；分选结束后，如果磁珠与细胞分离，则该种情况符合短期接触（ < 24 h）。

2) 如经磁珠分选得到的细胞用于科研：若分选得到的细胞需要进行培养，则该种情况与细胞治疗的磁珠处理方式相同。

3) 如经磁珠分选得到的细胞用于科研：若分选得到的细胞直接用于分析，且当天完成分析，则该种情况符合短期接触（ < 24 h）；若当天不能完成分析，则按照长期接触（ ≥ 24 h）处理。

（2）对照组的确定

阳性对照的规定：使用10% DMSO作为阳性对照，浸提条件同磁珠。

阴性对照的规定：由于需要浸提（ 72 ± 2 ）h的磁珠粒径较小（50 nm），使用过程中不经洗涤，直接用于磁性标记，所以这类型磁珠的阴性对照设定为磁珠相同体积的1×PBS。由于需要浸提（ 24 ± 2 ）h的磁珠粒径较大，使用前需经过洗涤，这种情况下，洗涤结束后会

有一定重量的磁珠湿重，按照湿重的体积称取相应体积的高密度聚乙烯，该高密度聚乙烯作为阴性对照。洗涤次数不少于磁珠在做磁性标记前的洗涤次数。浸提条件同磁珠。

(3) 浸提液体积的确定

制备好的浸提液按照GB/T 16886.5规定的MTT细胞毒性试验或XTT细胞毒性试验的方法执行。MTT细胞毒性试验或XTT细胞毒性试验的步骤几乎一致，使用的具有相似功能MTT和XTT来检测细胞活率。简明试验步骤如表2.6.1：

表2.6.1 细胞毒性试验简明试验步骤

时间	步骤
第一天	接种96孔板：1×10 ⁴ 个细胞/100 μL MEM培养基/孔 孵育（37 °C，5% CO ₂ ，22 h~26 h）
第二天	除去培养基，加入浸提液 孵育（37 °C，5% CO ₂ ，24 h）
第三天	形态学改变的显微镜评价 加MTT或者XTT，测吸光值

体外细胞毒性试验的第一步是接种L929细胞（接种96孔板，每孔1万个细胞，每孔培养液体积为100 μL），培养24 h后，每孔的细胞量将少于1×10⁷个细胞。规定每个孔的浸提液体积为分选1×10⁷个细胞所需的磁珠用含血清培养基稀释至100 μL。如果该浸提体积对少于1×10⁷个细胞没有毒性，则可以判断对1×10⁷个细胞没有毒性。浸提液体积举例如表2.6.2：

表2.6.2 浸提液体积举例

厂家 货号	磁性分选时磁珠用量（每10 ⁷ 细胞）	磁性标记前 洗涤次数	浸提液体积 （96孔板每孔）
美天旎 130-045-101	20 μL	0	20 μL磁珠加80 μL培养基
美天旎 130-117-043	10 μL	0	10 μL磁珠加90 μL培养基
金斯瑞 L00863	10 μL	0	10 μL磁珠加90 μL培养基
海狸 70902-50	20 μL	2	洗涤2次后加100μL培养基
Dynal 11462D	15 μL	1	洗涤1次后加100μL培养基
Dynal 11417D	200 μL	1	洗涤1次后加100μL培养基

2.7 活率

细胞活率是体现细胞分选用磁珠对目标细胞分选性能的重要参数之一。

磁性细胞分选过程中，磁珠在溶液中通过与目标细胞碰撞而进行免疫识别结合，从而实现目标细胞捕获，并在一定磁场条件下发生富集，磁珠对细胞的碰撞以及磁场中磁珠

携带细胞的磁响应运动，都会影响细胞的活性。所以通过对目标细胞活率的测定以反映细胞分选用磁珠的分选性能。

本文采用细胞死活检测方法来测定目标细胞活率。细胞的死活检测包括台盼蓝染色法和荧光染色法。荧光染色法包括使用双荧光自动细胞计数仪检测法和流式细胞仪检测法，前者采用AO/PI双染色标记，后者采用核酸类染料染色或胺基类染料染色标记。

2.7.1 台盼蓝染色法

正常的活细胞膜结构完整，能够排斥台盼蓝，使之不能够进入细胞内。而死细胞膜的通透性增加，可被台盼蓝染成蓝色。因此，台盼蓝染色可以非常简便、快速地区分活细胞和死细胞。台盼蓝价格便宜，操作简便，无需避光，无需特殊仪器，通过普通显微镜即可辨别细胞的死活，是最常用的死活细胞鉴定方法之一。

悬浮细胞的密度测定和台盼蓝染色法细胞活率测定，在GB/T 38506-2020《动物细胞培养过程中生化参数的测定方法》均有详细的规定，本文件规定按照细胞分选用磁珠及其配套试剂的操作说明或设备操作说明进行磁性分选，取适量分选前的细胞悬液或分选后的细胞悬液，按照GB/T 38506规定的细胞活率的测定方法测定细胞活率。

2.7.2 荧光染色法

2.7.2.1 细胞计数仪检测法

基于细胞膜的选择透过性原理，活细胞的细胞膜完整且具有选择透过性，而死细胞或受损细胞的细胞膜通透性增加。AO为绿色荧光核酸染料，能够进入活细胞和死细胞；PI为红色荧光核酸染料，只能进入死细胞。因此，在活细胞中的AO染料使细胞呈现出绿色荧光；而死细胞中的AO和PI两种染料发生能量共振转移，使死细胞呈现出红色荧光。通过使用双荧光通道的细胞计数仪采集图像数据，并进行图像处理和分析，得出细胞的数量和活率。

AO/PI染料价格相对于台盼蓝较高，染色过程需要避光，且需要在双荧光通道的计数仪上计数才能得出活率。台盼蓝在染色血细胞时，无法排除无核的红细胞，造成细胞浓度和活率结果不够准确。而AO/PI为核酸染料，无核的红细胞不会染色，因此可以排除红细胞的干扰。AO/PI染色法弥补了台盼蓝染色法在染色血细胞方面的不足。因此在对可能存在红细胞的混合细胞进行活率检测时，AO/PI染色法更加适宜。

预估分选前的细胞悬液或分选后的细胞悬液的细胞密度，根据仪器的线性范围，适当调整细胞密度，取适量细胞悬液，加入等体积的AO/PI荧光染料，充分吹打混匀。细胞和染料混合后应5 min内进行测定。启动细胞计数仪，设定细胞类型，根据仪器的上样体积要求

取适量细胞和染料的混合液加至细胞计数板的一个样品腔内，按照仪器操作说明，通过图像分析系统，自动分析细胞活率。

2.7.2.2 流式细胞仪检测

流式细胞术是一种以流式细胞仪为检测手段，可以快速、准确、客观地检测单个生物微粒的特性，并定量的技术。流式细胞仪检测活率包括核酸类染料染色和胺基类染料染色。核酸类染料包括7-AAD、PI、DAPI等，胺基类染料包括BD的Fixable Viability Stain (FVS) 系列染料、biolegend的Zombie Violet Viability Kit等。

根据活细胞和死细胞的细胞膜通透性差异，7-AAD是一种可穿透死细胞膜，不可穿透活细胞膜的核酸荧光染料，当被488 nm激发光激发时，7-AAD荧光在光谱的远红色范围被检测到，通过流式细胞仪测定样品中的7-AAD荧光强度以定量分析细胞活率。

根据流式细胞仪的性能参数、待测细胞的粘附、自然沉降等特性调整细胞密度。使用不含任何荧光染料的待测细胞样本作为空白对照；使用已经证明可有效地与7-AAD结合的细胞样本作为阳性对照。取适量分选前的细胞悬液或分选后的细胞悬液作为待测样品，在待测样品和阳性对照样品中，加入适量7-AAD荧光染料使终浓度为0.5 $\mu\text{g/mL}$ ；空白对照样品中，加入PBS替代荧光染料。充分混匀，室温避光孵育5 min，孵育结束后应5 min内上样检测，检测前混匀样品。按照流式细胞仪操作规程，启动流式细胞仪。根据空白对照、阳性对照的FSC/SSC和荧光信号的强弱调整电压大小，在FCS/SSC散点图中，使细胞位于合适位置并排除碎片干扰；在7-AAD/SSC散点图中，使未染色细胞的自发荧光完全在阴性区域。调节完毕，进行上样检测，并获取数据，总细胞信号采集数量不应小于10000。

在对流式结果进行分析时，在FCS/SSC散点图中，对除细胞碎片外的所有主细胞设门。在主细胞散点图中，对7-AAD阴性细胞设门。

图2.7.2.2为举例说明使用抗人CD3抗体修饰的细胞分选用磁珠对PBMC中的CD3阳性细胞进行阳性分选后，使用7-AAD染色进行活率检测。图中示例可看出分选前细胞活率为93.8%，分选后细胞活率为92.2%。

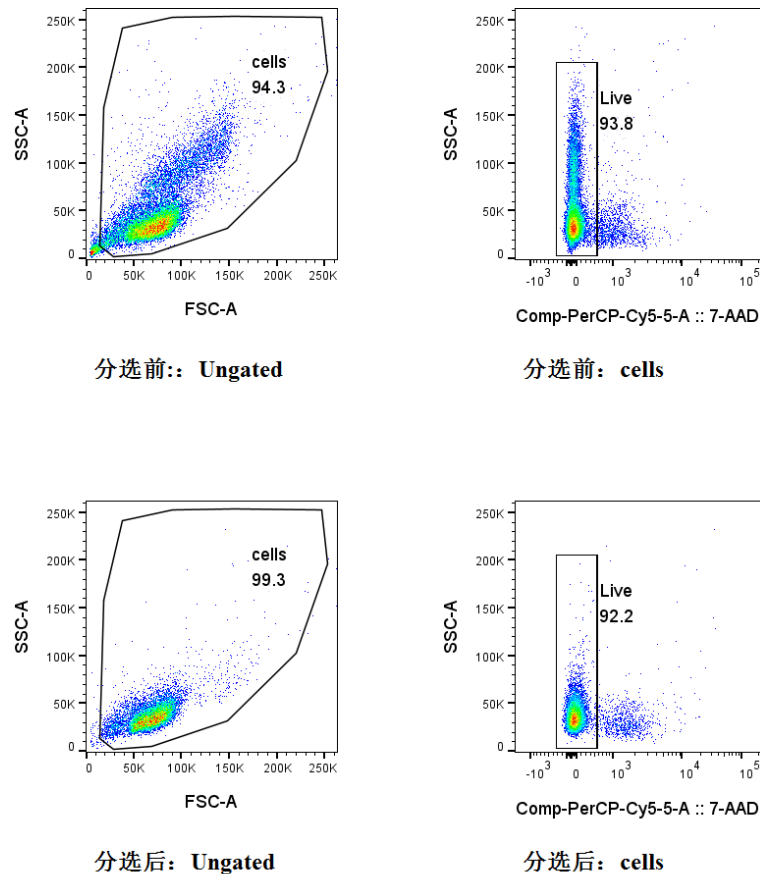


图2.7.2.2 磁性分选前后的细胞活率检测

2.8 纯度

纯度是体现细胞分选用磁珠对目标细胞分选性能的另一个重要参数。如当细胞分选用磁珠表面偶联的是特异性抗体，该特异性抗体对目标细胞进行特异性结合，通过分选获得目标细胞。由于抗体的交叉反应以及分选过程中环境溶液的干扰，分选产物中有目标细胞和非目标细胞，因此，检测纯度可以有效表征细胞分选用磁珠对目标细胞捕获的特异性，反映细胞分选用磁珠对目标细胞的分选性能。本文采用GB/T 39729规定的方法测定细胞纯度。

纯度定义为目标细胞数目占总细胞数目的百分比。举例说明，如从PBMC中分离CD4⁺细胞，则分选前CD4⁺细胞的纯度为CD4⁺细胞占PBMC总细胞数的比值；分选后CD4⁺细胞的纯度为分选后CD4⁺细胞占分选后总细胞数的比值。此比值的分子必须是CD4阳性细胞，分母必须是相应的流式分析过程中FSC/SSC双参数散点图中的总细胞。

取适量分选前或分选后的细胞悬液按照GB/T 39729-2020《细胞纯度测定通用要求 流式细胞测定法》规定使用荧光素标记的单克隆抗体对目标细胞进行标记并进行流式检测。

在对流式结果进行分析时，在FCS/SSC散点图中，对除细胞碎片外的所有主细胞设门。在主细胞散点图中，对目标细胞设门。

图2.8为举例说明使用抗人CD3抗体修饰的细胞分选用磁珠对PBMC中的CD3阳性细胞进行阳性分选后，使用CD3-FITC抗体染色进行纯度检测。图中示例可看出分选前CD3阳性细胞纯度为58.6%，分选后CD3阳性细胞纯度为99.6%。

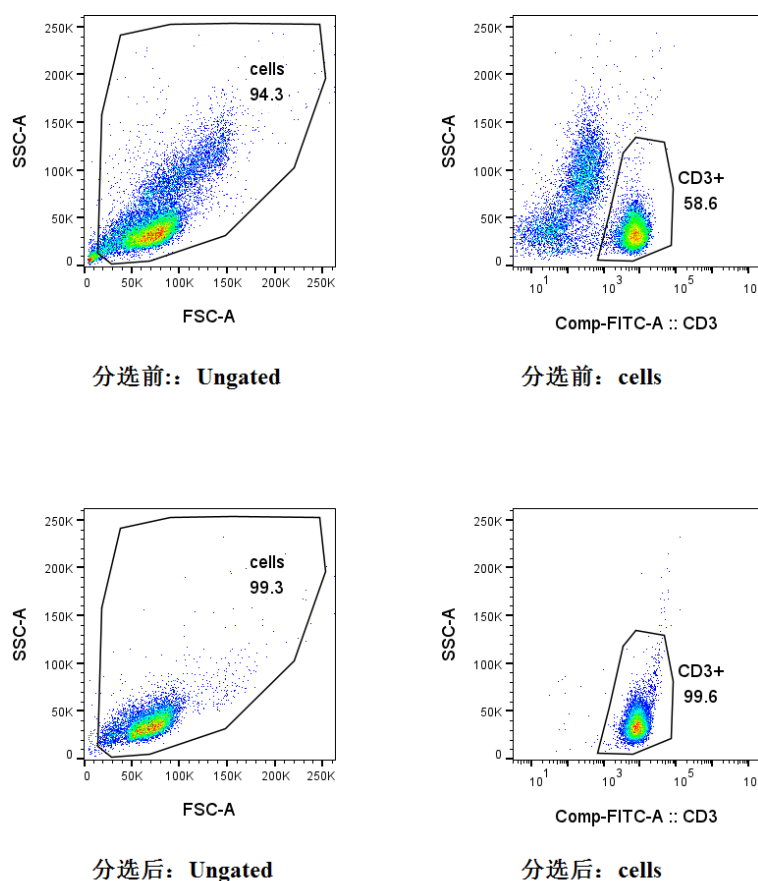


图2.8 磁性分选前后的细胞纯度检测

2.9 得率

细胞得率是体现细胞分选用磁珠对目标细胞分选性能的另一个重要参数。细胞得率的高低可以反映出细胞分选用磁珠对目标细胞的特异性捕获情况，以及细胞分选用磁珠对整个分选流程的适宜性，因此，检测得率可以很好的评估细胞分选用磁珠分选性能的优劣。

本文件将分选后获得的目标细胞的数目占分选前的目标细胞数目的百分比定义为细胞得率。

(三) 主要试验(或验证)的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

1. 粒度

1.1 试剂

细胞分选用磁珠、PBS（1×）。

1.2 设备

粒度分析仪。

1.3 试验方法和数据处理

检测细胞分选用磁珠的粒度，按照 GB/T 40268 规定的粒度执行。

1.4 方法验证

试验样品为有柱式纳米级磁珠，试验样品由本标准起草单位提供，共 3 个试验室参与验证，使用动态光散射法进行检测，验证结果如表 1.1、表 1.2 和表 1.3。结果表明，该细胞分选用磁珠的粒径的三个试验室的平均值为 120.04 nm，试验室内相对标准偏差为 0.78%~2.38%，试验室间相对标准偏差为 1.07%，满足 GB/T 29022 规定的相对标准偏差低于 5%的要求，说明该方法具有较好测重复性和再现性，满足该标准要求，说明该方法稳定可靠。

表 1.1 粒径和粒径分布原始数据

	有效直径（Di（50））（nm）	Di（10）（nm）	Di（90）（nm）	PdI
试验室 1	121.10	70.88	206.91	0.191
	119.34	70.25	202.75	0.186
	119.66	71.58	200.04	0.174
试验室 2	119.98	72.93	197.39	0.163
	117.74	72.2	192	0.157
	118.6	71.64	196.35	0.167
试验室 3	118.00	72.20	198.00	0.182
	123.00	76.00	201.00	0.173
	123.00	75.70	201.00	0.170

注：有效直径指的是 Di（50）的直径；Di（10）是指在组成该样品的所有颗粒体系中，小于等于某一直径的颗粒占比 10%；Di（50）是指在组成该样品的所有颗粒体系中，小于等于某一直径的颗粒占比 50%；Di（90）是指在组成该样品的所有颗粒体系中，小于等于某一直径的颗粒占比 90%；PdI 是用于描述粒度分布宽度的无量纲量，PdI 数值越接

近于 0，表示颗粒的大小分布越均匀，颗粒之间的尺寸差异越小。

表 1.2 粒径的试验室内偏差

试验室	有效直径（nm）	平均值（nm）	标准偏差（nm）	相对标准偏差
试验室 1	121.10	120.03	0.94	0.78%
	119.34			
	119.66			
试验室 2	119.98	118.77	1.13	0.95%
	117.74			
	118.6			
试验室 3	118.00	121.33	2.89	2.38%
	123.00			
	123.00			

表 1.3 粒径的试验室间偏差

粒径（nm）	平均值（nm）	标准偏差（nm）	相对标准偏差
120.03	120.04	1.28	1.07%
118.77			
121.33			

2. 超顺磁性

2.1 试剂

细胞分选用磁珠。

2.2 设备

离心机（允许在 4 °C 条件下进行 20000 g 的离心）、振动样品磁强计（Vibrating Sample Magnetometer, VSM）、分析天平（灵敏度大于 0.1 mg）。

2.3 试验方法

取适量细胞分选用磁珠，在 4 °C 条件下，20000 g 离心约 1.5 h，待上清液澄清后弃上清，加少量纯水混匀磁珠，将混匀后的磁珠转移至已烘干至恒重的玻璃称量瓶中，干燥至恒重（干燥步骤参照 GB/T 40268 描述的质量浓度）。取干燥至恒重的固体材料，按照 GB/T

40268 规定的超顺磁性执行。

2.4 试验数据处理

按照 GB/T 40268 规定的超顺磁性执行。

2.5 方法验证

本文件规定了通过离心方式从有柱式细胞分选用磁珠悬液中获得固体磁珠，检测磁学性能的方法及数据处理方法按照 GB/T 40268 规定的超顺磁性执行。试验样品为有柱式纳米级磁珠，试验样品由本标准起草单位提供，共 2 个试验室参与验证。验证磁珠为有柱式纳米级磁珠，使用振动样品磁强计（Vibrating Sample Magnetometer, VSM）进行检测，验证结果如图 2.1、图 2.2 和图 2.3，图 2.3 为两个试验室的 VSM 曲线的拟合。从图中可以看出该磁珠几乎没有磁滞，剩磁和矫顽力接近于 0，由此判断该磁珠具有超顺磁性。试验室 1 检测的饱和磁化强度平均值为 1135093 A/m，矫顽力平均值为 22.98 A/m，试验室 2 检测的饱和磁化强度平均值为 1093150 A/m，矫顽力平均值为 18.71 A/m。

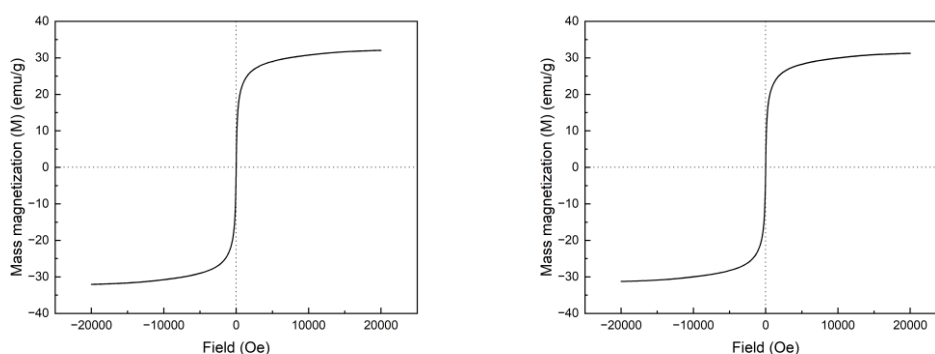


图 2.1 VSM 检测-试验室 1

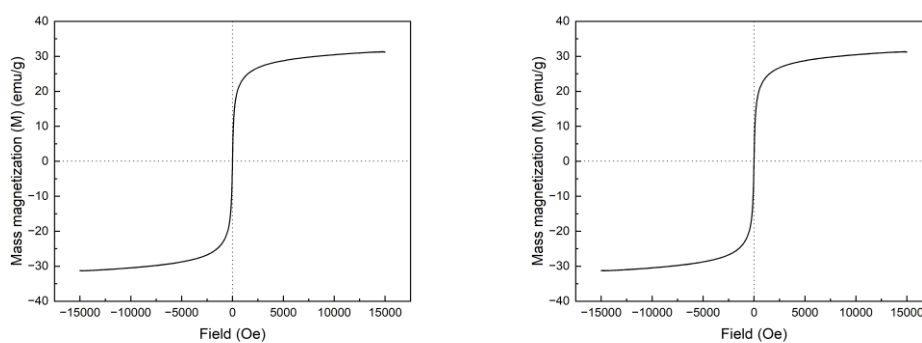


图 2.2 VSM 检测-试验室 2

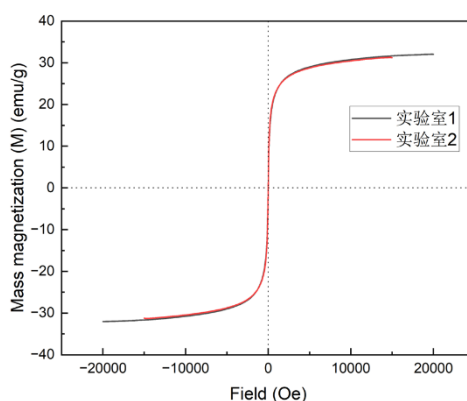


图 2.3 VSM 检测曲线拟合-两个试验室

3. 无菌

3.1 试剂

细胞分选用磁珠、硫乙醇酸盐流体培养基、胰酪大豆胨液体培养基、生理盐水。

3.2 设备

安全柜、37℃培养箱、集菌培养器、集菌仪。

3.3 试验方法和数据处理

按照《中华人民共和国药典》（2020 年版）四部规定的无菌检查法（通则 1101）-薄膜过滤法执行。

3.4 方法验证

试验样品为无菌的百纳米级细胞分选用磁珠，试验样品由本标准起草单位提供，共 3 个试验室参与验证。

已知该磁珠为链霉亲和素磁珠，磁珠保护液为 1×PBS（含 0.1%（W/V）BSA，0.1%（V/V）proclin-300），其中 proclin-300 是抑菌成分，通过薄膜过滤法，可有效去除抑菌剂。《药典》中规定“无菌检查用的滤膜孔径应不大于 0.45 μm”，选用的百纳米级细胞分选用磁珠的粒径分布是 300 nm~500 nm，当通过滤膜过滤时，有一部分磁珠被过滤到下层溶液中，有一部分磁珠会被截留在滤膜上，由此可以看出该磁珠同时模拟了小粒径磁珠（如 50 nm 磁珠，被过滤到下层溶液中）和大粒径磁珠（如微米磁珠，被截留在滤膜上）在薄膜过滤法中通过滤膜的情况。由此使用该百纳米级细胞分选用磁珠进行无菌检测具有代表性。

验证结果如表 3。结果表明，100 μL 该磁珠使用 100 mL 培养体系时，均未产生抑菌作用，且无菌检查结果均显示无菌，满足该标准要求，说明该方法稳定可靠。

表 3 无菌检查

分组	试验室 1	试验室 2	试验室 3
阴性对照	澄清无菌	澄清无菌	澄清无菌
磁珠-100 mL 硫乙醇酸盐流体培养基, 33℃	澄清无菌	澄清无菌	澄清无菌
磁珠-100 mL 硫乙醇酸盐流体培养基, 23℃	澄清无菌	澄清无菌	澄清无菌
磁珠-100 mL 胰酪大豆胨液体培养基, 23℃	澄清无菌	澄清无菌	澄清无菌
磁珠-金黄色葡萄球菌-100 mL 硫乙醇酸盐流体培养基, 33℃	生长良好	生长良好	生长良好
对照-金黄色葡萄球菌-100 mL 硫乙醇酸盐流体培养基, 33℃	生长良好	生长良好	生长良好
磁珠-大肠杆菌-100 mL 硫乙醇酸盐流体培养基, 33℃	生长良好	生长良好	生长良好
对照-大肠杆菌-100 mL 硫乙醇酸盐流体培养基, 33℃	生长良好	生长良好	生长良好
磁珠-生孢梭菌-100 mL 硫乙醇酸盐流体培养基, 33℃	生长良好	生长良好	生长良好
对照-生孢梭菌-100 mL 硫乙醇酸盐流体培养基, 33℃	生长良好	生长良好	生长良好
磁珠-黑曲霉菌-100 mL 胰酪大豆胨液体培养基置, 23℃	生长良好	生长良好	生长良好
对照-黑曲霉菌-100 mL 胰酪大豆胨液体培养基置, 23℃	生长良好	生长良好	生长良好
磁珠-枯草芽孢杆菌-100 mL 胰酪大豆胨液体培养基置, 23℃	生长良好	生长良好	生长良好
对照-枯草芽孢杆菌-100 mL 胰酪大豆胨液体培养基置, 23℃	生长良好	生长良好	生长良好
磁珠-白色念珠菌-100 mL 胰酪大豆胨液体培养基置, 23℃	生长良好	生长良好	生长良好
对照-白色念珠菌-100 mL 胰酪大豆胨液体培养基置, 23℃	生长良好	生长良好	生长良好
供试品检查结论	无菌	无菌	无菌

上述用于方法验证的磁珠的“方法适用性试验”表明, 该检验量在该检验条件下无抑菌作用或其抑菌作用可以忽略不计。

如果在对其它种类磁珠进行无菌检测时遇到磁珠对检测有干扰的情况时, 可按照《中华人民共和国药典》(2020 年版) 四部规定的无菌检查法(通则 1101) 要求重新进行方法适用性试验: “如含供试品的任一容器中的试验菌生长微弱、缓慢或不生长, 则说明供试品的该检验量在该检验条件下有抑菌作用, 应采用增加冲洗量、增加培养基的用量、使用中和剂或灭活剂、更换滤膜品种等方法, 消除供试品的抑菌作用, 并重新进行方法适用性试验”。

4. 内毒素

4.1 试剂

细胞分选用磁珠、凝胶法鲎试剂、细菌内毒素检查用水、细菌内毒素标准品。

4.2 设备

恒温水浴锅或干热恒温仪等恒温器（37℃ ± 1℃）、涡旋混合器、无内毒素玻璃反应试管或无内毒素安瓿、无内毒素吸头或无内毒素移液管。

4.3 试验方法

取适量细胞分选用磁珠，使用细菌内毒素检查用水对细胞分选用磁珠进行稀释，最大有效稀释倍数按式（1）计算：

$$MVD=\frac{L}{\lambda} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- MVD——细胞分选用磁珠的最大有效稀释倍数；
- L——细胞分选用磁珠需控制的内毒素限值，限值为 2 EU/mL；
- λ——凝胶法鲎试剂的标示灵敏度，单位为 EU 每毫升（EU/mL）。

使用稀释倍数不超过 MVD 的样品作为供试品溶液，取适量供试品溶液按照《中华人民共和国药典》（2020 年版）四部规定的细菌内毒素检查法（通则 1143）-凝胶限度试验执行。

4.4 试验数据处理

按照《中华人民共和国药典》（2020 年版）四部规定的细菌内毒素检查法（通则 1143）-凝胶限度试验的结果判断执行。

4.5 方法验证

试验样品为一种科研级细胞分选用磁珠和一种 GMP 级细胞分选用磁珠，二者内毒素含量均<2 EU/mL，试验样品由本标准起草单位提供，共 3 个试验室参与验证，验证结果如表 4.1 和表 4.2。结果表明，该磁珠内毒素检查结果均<2 EU/mL。3 个试验室的方法适用性和供试品检查的结果均一致，满足该标准要求，说明该方法稳定可靠。

表 4.1 内毒素检查-科研级磁珠

编号	内毒素浓度/配制内毒素的溶液	内毒素浓度 (EU/mL)	凝集管数/试验管数		
			试验室 1	试验室 2	试验室 3
A	无/供试品溶液	-	0/2	0/2	0/2
B	2λ/供试品溶液	2λ	4/4	4/4	4/4
B	1λ/供试品溶液	1λ	4/4	4/4	4/4

B	0.5λ/供试品溶液	0.5λ	0/4	0/4	0/4
B	0.25λ/供试品溶液	0.25λ	0/4	0/4	0/4
C	2λ/检查用水	2λ	2/2	2/2	2/2
C	1λ/检查用水	1λ	2/2	2/2	2/2
C	0.5λ/检查用水	0.5λ	0/2	0/2	0/2
C	0.25λ/检查用水	0.25λ	0/2	0/2	0/2
D	无/检查用水	0	0/2	0/2	0/2
鲎试剂灵敏度（EU/mL）			0.03	0.06	0.125
溶液 B 终点浓度的几何平均值=内毒素浓度 $\times 2^{(1-n/4)}$ ，其中 n 为凝集管数			1.0λ	1.0λ	1.0λ
溶液 C 终点浓度的几何平均值=内毒素浓度 $\times 2^{(1-n/2)}$ ，其中 n 为凝集管数			1.0λ	1.0λ	1.0λ
检测结果			<2 EU/mL	<2 EU/mL	<2 EU/mL

表 4.2 内毒素检查-GMP 磁珠

编号	内毒素浓度/配制内毒素的溶液	内毒素浓度 (EU/mL)	凝集管数/试验管数		
			试验室 1	试验室 2	试验室 3
A	无/供试品溶液	-	0/2	0/2	0/2
B	2λ/供试品溶液	2λ	4/4	4/4	4/4
B	1λ/供试品溶液	1λ	4/4	4/4	4/4
B	0.5λ/供试品溶液	0.5λ	0/4	0/4	0/4
B	0.25λ/供试品溶液	0.25λ	0/4	0/4	0/4
C	2λ/检查用水	2λ	2/2	2/2	2/2
C	1λ/检查用水	1λ	2/2	2/2	2/2
C	0.5λ/检查用水	0.5λ	0/2	0/2	0/2
C	0.25λ/检查用水	0.25λ	0/2	0/2	0/2
D	无/检查用水	0	0/2	0/2	0/2
鲎试剂灵敏度（EU/mL）			0.03	0.06	0.125
溶液 B 终点浓度的几何平均值=内毒素浓度 $\times 2^{(1-n/4)}$			1.0λ	1.0λ	1.0λ

n/4), 其中 n 为凝集管数			
溶液 C 终点浓度的几何平均值=内毒素浓度 $\times 2^{(1-n/2)}$, 其中 n 为凝集管数	1.0 λ	1.0 λ	1.0 λ
检测结果	<2 EU/mL	<2 EU/mL	<2 EU/mL

当细胞分选用磁珠在小于 MVD 的稀释倍数下对试验具有干扰作用, 按照《中华人民共和国药典》(2020 年版) 四部规定的细菌内毒素检查法(通则 1143) 中的凝胶限度试验的规定, 可通过对细胞分选用磁珠进行不超过 MVD 的进一步稀释, 或通过其他适宜的方法(如过滤、中和、透析或加热处理等) 排除干扰。按照 GB/T 41309-2022/ISO 29701:2010 《纳米技术 纳米材料的内毒素体外测试 鲎试剂法》, 除内毒素外, 普通的鲎试剂还与 β -1,3-葡聚糖反应, 当怀疑存在 β -1,3-葡聚糖污染时, 宜使用不与 β -1,3-葡聚糖反应的特异性鲎试剂检测。

5. 体外细胞毒性

5.1 试剂

细胞分选用磁珠、胎牛血清、依格尔最低限量基本培养基、0.25%胰蛋白酶溶液(含 EDTA)、青霉素-链霉素溶液、高密度聚乙烯、DMSO、MTT、异丙醇、PBS (1 \times)。

5.2 设备

培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$, 湿化, 5% CO_2 , 95%空气)、生物安全柜、水浴锅(37 $^{\circ}\text{C}$)、倒置显微镜、分析天平(灵敏度大于 0.1 mg)、酶标分析仪(配置 570 nm 和 650 nm 滤光片, 或配置 450 nm 和 650 nm 滤光片)、细胞计数仪或血细胞计数器、细胞培养瓶或细胞培养皿、96 孔细胞培养板。

5.3 试验方法

(1) 根据细胞分选用磁珠与细胞接触时间长短的不同, 将细胞分选用磁珠浸提液的制备方法分为两种: 方法 1 适用于与细胞短期(<24 h) 接触的细胞分选用磁珠, 浸提条件为 37 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 下浸提 24 h ± 2 h; 方法 2 适用于与细胞长期(≥ 24 h) 接触的细胞分选用磁珠, 浸提条件为 37 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 下浸提 72 h ± 2 h。

浸提液制备方法 1:

- a) 空白对照组: 含 10% 血清培养基;
- b) 阴性对照组: 含 10% 血清培养基中加入与洗涤后的磁珠相同质量的高密度聚乙烯材料;
- c) 阳性对照组: 含 10% 血清培养基中加入 10% DMSO;

d) 细胞分选用磁珠组：取适量细胞分选用磁珠，使用无菌 PBS（1×）对细胞分选用磁珠进行洗涤（洗涤次数不超过细胞分选前该磁珠应洗涤的次数），使用含 10% 血清培养基将经洗涤的分选 1×10^7 个细胞所需的细胞分选用磁珠稀释至 100 μL （96 孔培养板一个孔的浸提液用量）。

浸提结束后，对浸提液进行磁分离，以获得去除磁珠的浸提液，各组分磁分离条件同细胞分选用磁珠组，磁分离后的浸提液为各组的 100% 浸提液。

浸提液制备方法 2：

a) 空白对照组：含 10% 血清培养基；

b) 阴性对照组：含 10% 血清培养基中加入与细胞分选用磁珠相同体积的无菌 PBS（1×）；

c) 阳性对照组：含 10% 血清培养基中加入 10% DMSO；

d) 细胞分选用磁珠组：取适量细胞分选用磁珠，使用含 10% 血清培养基将分选 1×10^7 个细胞所需的细胞分选用磁珠稀释至 100 μL （96 孔培养板一个孔的浸提液用量）。

浸提结束后，各组液体为 100% 浸提液。

（3）制备好的浸提液按照 GB/T 16886.5 规定的 MTT 细胞毒性试验或 XTT 细胞毒性试验执行。

5.4 试验数据处理

按照 GB/T 16886.5 规定的 MTT 细胞毒性试验或 XTT 细胞毒性试验的数据分析执行。

5.5 方法验证

本文件征求意见稿通过对 GB/T 16886.12-2023/ISO 10993-12:2021《医疗器械生物学评价 第 12 部分：样品制备与参照材料》的归纳总结，从 GB/T 16886.12 的多种样本浸提方法中选取适宜进行细胞分选用磁珠的样本浸提方法，以及选择适宜的参照材料，从而获得适宜用于细胞毒性检测的浸提液。本文件征求意见稿规定制备好的浸提液按照 GB/T 16886.5 规定的 MTT 细胞毒性试验或 XTT 细胞毒性试验的方法执行。本标准起草单位对 50 nm、300 nm、2.8 μm 、4.5 μm 磁珠均进行了 MTT 细胞毒性试验，结果均显示无潜在细胞毒性。

试验样品为一种无潜在细胞毒性的 300 nm 细胞分选用磁珠，试验样品由本标准起草单位提供，共 3 个试验室参与验证，验证结果如表 5。结果表明，该磁珠体外细胞毒性试验检查结果均显示无潜在的细胞毒性，满足该标准要求，说明该方法稳定可靠。

表 5 体外细胞毒性检查（MTT 法）

分组	存活率		
	试验室 1	试验室 2	试验室 3
空白对照	100.0%	100.0%	100.0%
阴性对照	94.6%	95.2%	97.8%
100%浸提液	95.6%	94.5%	91.1%
75%浸提液	97.6%	94.8%	95.4%
50%浸提液	98.1%	96.4%	103.9%
25%浸提液	98.4%	97.7%	103.7%
阳性对照	17.6%	28.6%	31.9%
结论	无潜在细胞毒性	无潜在细胞毒性	无潜在细胞毒性

对该磁珠进行有效磁分离需要使用不小于 6500 Gs 的磁力架，而验证单位使用的磁力架磁场强度约 4000 Gs~5500 Gs 的磁力架，因此经过磁分离，会有一部分磁珠被磁分离去除，另一部分磁珠存留在浸提液中，该种情况可以有效模拟本文件征求意见稿中的“浸提液制备方法 1（浸提液中不含有磁珠）”和“浸提液制备方法 2（浸提液中含有磁珠）”，因此该磁珠具有代表性。

6. 活率

6.1 荧光染色法-细胞计数仪检测法

6.1.1 试剂

细胞分选用磁珠及其配套试剂、AO/PI 荧光染料、分选缓冲液。

6.1.2 设备

细胞分选用磁珠配套磁分离器、生物安全柜、双荧光细胞计数仪（配置 AO/GFP 和 PI/RFP 荧光通道）。

6.1.3 试验方法

按照本文件“台盼蓝染色法”规定的磁性细胞分选试验方法进行磁性细胞分选。

预估分选前的细胞悬液或分选后的细胞悬液的细胞密度，根据仪器的线性范围，适当调整细胞密度，取适量细胞悬液，加入等体积的 AO/PI 荧光染料，充分吹打混匀。细胞和染料混合后应 5 min 内进行测定。

启动细胞计数仪，设定细胞类型，根据仪器的上样体积要求取适量细胞和染料的混合

液加至细胞计数板的一个样品腔内，按照仪器操作说明，通过图像分析系统，自动分析细胞活率。

6.1.4 试验数据处理

按照式（2）计算细胞活率

$$X = \frac{L}{C} \times 100\% \dots\dots\dots(2)$$

式中：

- X——细胞活率；
- L——活细胞数目（发出绿色荧光的细胞），单位为个；
- C——细胞总数目，单位为个。

结果取3次平行试验的算术平均值（3个结果的相对标准偏差允许5%以内），计算结果精确到小数点后一位。

6.1.5 方法验证

试验样品为两种 50 nm、一种 300 nm、一种 2.8 μm 细胞分选用磁珠，其中 50 nm 磁珠包括两个不同品牌，均为对人 PBMC 细胞进行阳性分选；300 nm 磁珠为对小鼠脾脏单细胞进行阴性分选；2.8 μm 磁珠为对小鼠脾脏单细胞进行阳性分选，并将磁珠从细胞上解离下来，试验样品由本标准起草单位提供，共 6 个试验室参与验证，验证结果如表 6.1.1-6.1.6。本文件对活率、纯度、得率均使用该 4 种磁珠进行验证，并均由本标准起草单位提供。

（1）原始数据如表 6.1.1。

表 6.1.1 原始数据：活率-AOPI

试验室 <i>i</i>	水平 <i>j</i>			
	1	2	3	4
1	91.2%	85.6%	89.5%	85.6%
	92.1%	87.4%	90.3%	84.6%
	90.5%	90.1%	91.6%	86.1%
	92.9%	89.6%	89.3%	83.2%
2	91.5%	90.4%	88.5%	82.8%
	92.2%	91.0%	88.1%	85.3%
	92.2%	95.4%	83.8%	86.1%

	93.4%	94.9%	87.3%	85.1%
3	94.0%	87.6%	90.3%	90.8%
	93.8%	86.5%	90.7%	87.7%
	93.1%	88.9%	91.8%	87.5%
	92.6%	90.8%	93.0%	87.2%
4	96.2%	93.5%	93.9%	87.3%
	96.5%	92.6%	91.7%	86.8%
	94.2%	94.1%	94.3%	90.2%
	96.6%	92.7%	92.1%	88.7%
5	94.6%	93.8%	88.0%	88.8%
	95.8%	95.0%	89.8%	87.9%
	93.3%	91.0%	92.0%	89.0%
	93.2%	91.6%	93.1%	86.7%
6	90.4%	92.2%	91.9%	88.5%
	93.0%	89.0%	93.7%	90.9%
	92.5%	83.6%	89.1%	86.2%
	90.4%	92.6%	89.4%	90.3%

(2) 单元平均值 \bar{y}_{ij} 的计算如表 6.1.2。

表 6.1.2 活率的单元平均值-AOPI

试验室 i	水平 j							
	1		2		3		4	
	\bar{y}_{ij}	n_{ij}	\bar{y}_{ij}	n_{ij}	\bar{y}_{ij}	n_{ij}	\bar{y}_{ij}	n_{ij}
1	91.7%	4	88.2%	4	90.2%	4	84.9%	4
2	92.3%	4	92.9%	4	86.9%	4	84.8%	4
3	93.4%	4	88.5%	4	91.5%	4	88.3%	4
4	95.9%	4	93.2%	4	93.0%	4	88.3%	4
5	94.2%	4	92.9%	4	90.7%	4	88.1%	4
6	91.6%	4	89.4%	4	91.0%	4	89.0%	4

(3) 单元标准差 s_{ij} 的计算如表 6.1.3。

表 6.1.3 活率的单元标准差-AOPI

试验室 i	水平 j							
	1		2		3		4	
	S_{ij}	n_{ij}	S_{ij}	n_{ij}	S_{ij}	n_{ij}	S_{ij}	n_{ij}
1	1.0%	4	2.1%	4	1.0%	4	1.3%	4
2	0.8%	4	2.6%	4	2.1%	4	1.4%	4
3	0.6%	4	1.8%	4	1.2%	4	1.7%	4
4	1.1%	4	0.7%	4	1.3%	4	1.5%	4
5	1.2%	4	1.9%	4	2.3%	4	1.0%	4
6	1.4%	4	4.2%	4	2.2%	4	2.1%	4

(4) 一致性和离群值的检查

应用柯克伦检验，计算得到的检验统计量 C 的值，如表 6.1.4。对 $n=4$, $p=6$ ，显著性水平为 5%时的临界值为 0.532，显著性水平为 1%时的临界值为 0.626，表明没有离群值或歧离值。

表 6.1.4 柯克伦检验统计量 C 的值-AOPI

水平 j	1	2	3	4
C	0.277	0.484	0.276	0.311

将格拉布斯检验应用于单元平均值，计算得到的单个低值、单个高值、两个低值、两个高值，如表 6.1.5。结果表明没有单个的歧离值或离群值，水平 4 的两个低值是歧离值，这些歧离值在分析中予以保留。

表 6.1.5 对单元平均值的格拉布斯检验-AOPI

水平 j	单个低值	单个高值	两个低值	两个高值	检验类型
1	0.957	1.616	0.484	0.147	格拉布斯检验统计量
2	1.100	0.993	0.346	0.479	
3	1.797	1.214	0.151	0.527	

4	1.287	0.943	0.026*	0.639	
歧离值	1.887	1.887	0.0349	0.0349	格拉布斯检
离群值	1.973	1.973	0.0116	0.0116	验临界值

注：*为歧离值。

(5) \hat{m}_j 、 S_{rj} 和 S_{Rj} 的计算

对总平均值 \hat{m}_j 、重复性标准差 S_{rj} 和再现性标准差 S_{Rj} 进行计算，结果如表 6.1.6，对表中数据进行检查，没有显示出它们与 m 有任何依赖关系，因而可用他们的平均值作为重复性和再现性标准差的最终值。

表 6.1.6 活率的 \hat{m}_j 、 S_{rj} 和 S_{Rj} 值-AOPI

水平 j	P_j	\hat{m}_j	S_{rj}	S_{Rj}
1	6	93.2%	1.1%	1.9%
2	6	90.8%	2.4%	3.2%
3	6	90.6%	1.8%	2.5%
4	6	87.2%	1.5%	2.3%

(6) 结论

测量方法精密度如下：

重复性标准差： $S_r = 1.7\%$ ；

再现性标准差： $S_R = 2.5\%$ 。

这些值的适当范围为 87.2% ~ 93.2%。这些值是通过 6 个试验室参与的一致性水平试验获得的，所测活率（自动细胞计数仪检测法）的值在上述范围内，试验中共检测到 2 个歧离值，但在分析中予以保留。该方法重复性、再现性均较好，满足该标准要求，说明该方法稳定可靠。

6.2 荧光染色法-流式细胞仪检测法

6.2.1 试剂

细胞分选用磁珠及其配套试剂、7-AAD 荧光染料、分选缓冲液。

6.2.2 设备

细胞分选用磁珠配套磁分离器、生物安全柜、流式细胞仪。

6.2.3 试验方法

- (1) 按照本文件“台盼蓝染色法”规定的磁性细胞分选试验方法进行磁性细胞分选。
- (2) 根据流式细胞仪的性能参数、待测细胞的粘附、自然沉降等特性调整细胞浓度。
- (3) 设置对照：使用不含任何荧光染料的待测细胞样本作为空白对照；使用已经证明可有效地与 7-AAD 结合的细胞样本作为阳性对照。

(4) 染色：取适量分选前的细胞悬液或分选后的细胞悬液作为待测样品，在待测样品和阳性对照样品中，加入适量 7-AAD 荧光染料使终浓度为 0.5 µg/mL；空白对照样品中，加入 PBS (1×) 替代荧光染料。充分混匀，室温避光孵育 5 min，孵育结束后应 5 min 内上样检测，检测前混匀样品。

(5) 按照流式细胞仪操作规程，启动流式细胞仪。调节仪器参数：根据空白对照、阳性对照的 FSC/SSC 和荧光信号的强弱调整电压大小，在 FCS/SSC 散点图中，使细胞位于合适位置并排除碎片干扰；在 7-AAD/SSC 散点图中，使未染色细胞的自发荧光完全在阴性区域。

(6) 调节完毕，进行上样检测，并获取数据，总细胞信号采集数量不应小于 10000。

注：可使用其他等效染料，如 DAPI (4',6-二脒基-2-苯基吲哚)、PI 等核酸类染料和胺基类染料。

6.2.4 试验数据处理

在 FCS/SSC 散点图中，对除细胞碎片外的所有主细胞设门。在主细胞散点图中，对 7-AAD 阴性细胞设门。按照式 (3) 计算细胞活率：

$$X = \frac{L}{C} \times 100\% \dots\dots\dots(3)$$

式中：

X ——细胞活率；

L ——活细胞数目 (7-AAD 阴性细胞)，单位为个；

C ——细胞总数目，单位为个。

结果取 3 次平行试验的算术平均值 (3 个结果的相对标准偏差允许 5% 以内)，计算结果精确到小数点后一位。

6.2.5 方法验证

共 6 个试验室参与验证，验证磁珠为 50 nm、300 nm、2.8 µm 磁珠，验证结果如表 6.2.1-

6.2.6。

(1) 原始数据如表 6.2.1。

表 6.2.1 原始数据：活率-7-AAD

试验室 i	水平 j			
	1	2	3	4
1	91.6%	91.6%	84.1%	81.7%
	92.3%	88.3%	84.8%	84.5%
	92.6%	90.3%	84.2%	83.0%
	92.9%	91.5%	82.8%	82.9%
2	94.2%	93.6%	83.9%	87.9%
	94.1%	95.0%	80.2%	86.9%
	93.4%	93.1%	79.8%	86.2%
	93.4%	95.7%	79.6%	86.4%
3	94.9%	93.0%	90.9%	90.6%
	93.8%	92.9%	88.0%	90.0%
	93.9%	92.0%	91.4%	90.4%
	94.6%	91.6%	90.3%	88.3%
4	96.3%	95.0%	92.7%	90.0%
	95.7%	94.7%	92.8%	91.3%
	95.0%	94.9%	94.1%	90.8%
	95.4%	94.6%	92.9%	90.2%
5	96.0%	95.0%	91.6%	90.4%
	95.4%	94.7%	90.6%	91.0%
	95.5%	94.9%	91.6%	91.0%
	94.7%	94.8%	91.3%	90.0%
6	95.4%	93.8%	92.5%	95.5%
	95.5%	93.6%	92.7%	96.7%
	94.9%	94.7%	93.0%	95.6%

	94.5%	94.0%	93.2%	95.1%
--	-------	-------	-------	-------

(2) 单元平均值 \bar{y}_{ij} 的计算如 6.2.2。

表 6.2.2 活率的单元平均值-7-AAD

试验室 i	水平 j							
	1		2		3		4	
	\bar{y}_{ij}	n_{ij}	\bar{y}_{ij}	n_{ij}	\bar{y}_{ij}	n_{ij}	\bar{y}_{ij}	n_{ij}
1	92.4%	4	90.4%	4	84.0%	4	83.0%	4
2	93.8%	4	94.4%	4	80.9%	4	86.9%	4
3	94.3%	4	92.4%	4	90.2%	4	89.8%	4
4	95.6%	4	94.8%	4	93.1%	4	90.6%	4
5	95.4%	4	94.9%	4	91.3%	4	90.6%	4
6	95.1%	4	94.0%	4	92.9%	4	95.7%	4

(3) 单元标准差 s_{ij} 的计算如表 6.2.3。

表 6.2.3 活率的单元标准差-7-AAD

试验室 i	水平 j							
	1		2		3		4	
	S_{ij}	n_{ij}	S_{ij}	n_{ij}	S_{ij}	n_{ij}	S_{ij}	n_{ij}
1	0.6%	4	1.5%	4	0.8%	4	1.1%	4
2	0.4%	4	1.2%	4	2.0%	4	0.8%	4
3	0.5%	4	0.7%	4	1.5%	4	1.0%	4
4	0.5%	4	0.2%	4	0.7%	4	0.6%	4
5	0.5%	4	0.1%	4	0.5%	4	0.5%	4
6	0.5%	4	0.5%	4	0.3%	4	0.7%	4

(4) 一致性和离群值的检查

应用柯克伦检验，计算得到的检验统计量 C 的值，如表 6.2.4。对 $n=4$ ， $p=6$ ，显著性水平为 5%时的临界值为 0.532，显著性水平为 1%时的临界值为 0.626，表明没有离群值或

歧离值。

表 6.2.4 柯克伦检验统计量 C 的值-7-AAD

水平 j	1	2	3	4
C	0.195	0.517	0.526	0.325

将格拉布斯检验应用于单元平均值，计算得到的单个低值、单个高值、两个低值、两个高值，如表 6.2.5。结果表明没有歧离值和离群值。

表 6.2.5 对单元平均值的格拉布斯检验-7-AAD

水平 j	单个低值	单个高值	两个低值	两个高值	检验类型
1	1.688	0.966	0.131	0.528	格拉布斯检验统计量
2	1.679	0.820	0.036	0.612	
3	1.542	0.869	0.045	0.574	
4	1.509	1.482	0.246	0.391	
歧离值	1.887	1.887	0.0349	0.0349	格拉布斯检验
离群值	1.973	1.973	0.0116	0.0116	验临界值

(5) \hat{m}_j 、 S_{rj} 和 S_{Rj} 的计算

对总平均值 \hat{m}_j 、重复性标准差 S_{rj} 和再现性标准差 S_{Rj} 进行计算，结果如表 6.2.6，对表中数据进行检查，没有显示出它们与 m 有任何依赖关系，因而可用他们的平均值作为重复性和再现性标准差的最终值。

表 6.2.6 活率的 \hat{m}_j 、 S_{rj} 和 S_{Rj} 值-7-AAD

水平 j	P_j	\hat{m}_j	S_{rj}	S_{Rj}
1	6	94.4%	0.5%	1.3%
2	6	93.5%	0.9%	1.9%
3	6	88.7%	1.1%	5.2%
4	6	89.4%	0.8%	4.3%

(6) 结论

测量方法精密度如下：

重复性标准差： $S_r = 0.8\%$ ；

再现性标准差： $S_R = 3.2\%$ 。

这些值的适当范围为 88.7% ~ 94.4%。这些值是通过 6 个试验室参与的一致性水平试验获得的，所测活率（流式细胞仪检测法）的值在上述范围内，试验中未检测到歧离值和离群值。该方法重复性、再现性均较好，满足该标准要求，说明该方法稳定可靠。

7. 纯度

7.1 试剂

细胞分选用磁珠及其配套试剂、荧光素标记的单克隆抗体、分选缓冲液。

7.2 设备

细胞分选用磁珠配套磁分离器、生物安全柜、流式细胞仪。

7.3 试验方法

按照本文件“台盼蓝染色法”规定的磁性细胞分选试验方法进行磁性细胞分选，取适量分选前的细胞悬液或分选后的细胞悬液，按照 GB/T 39729 规定的方法执行。

7.4 试验数据处理

在 FCS/SSC 散点图中，对除细胞碎片外的所有主细胞设门。在主细胞散点图中，对目标细胞设门。按照 GB/T 39729 规定的数据分析的方法计算结果，结果需注明目标细胞种类和总细胞种类。结果取 3 次平行试验的算术平均值（3 个结果的相对标准偏差允许 5%以内），计算结果精确到小数点后一位。

7.5 方法验证

共 6 个试验室参与验证，验证磁珠为 50 nm、300 nm、2.8 μm 磁珠，验证结果如表 7.1-7.6。

（1）原始数据如表 7.1。

表 7.1 原始数据：纯度

试验室 i	水平 j			
	1	2	3	4
1	96.7%	93.4%	91.9%	86.9%
	96.9%	95.0%	91.5%	87.4%

	96.8%	94.9%	93.1%	86.2%
	97.3%	93.3%	92.7%	86.6%
2	99.3%	95.3%	75.3%	88.9%
	99.4%	97.5%	72.9%	88.1%
	99.1%	96.4%	74.4%	86.7%
	99.2%	97.8%	73.2%	88.9%
3	99.4%	97.2%	83.0%	83.5%
	99.2%	98.3%	77.0%	84.8%
	99.3%	97.5%	84.9%	85.4%
	99.3%	97.2%	87.1%	83.4%
4	99.3%	97.9%	85.4%	85.0%
	99.1%	97.8%	84.7%	86.2%
	99.2%	97.3%	92.9%	87.6%
	97.7%	97.8%	89.5%	85.1%
5	99.0%	95.9%	91.1%	86.9%
	98.7%	98.0%	91.2%	87.6%
	99.5%	96.7%	91.7%	89.3%
	99.6%	97.8%	92.5%	87.0%
6	99.1%	96.9%	90.0%	84.2%
	98.9%	96.9%	91.6%	85.0%
	97.7%	96.5%	92.0%	85.8%
	99.1%	98.3%	92.6%	85.3%

(2) 单元平均值 \bar{y}_{ij} 的计算如表 7.2。

表 7.2 纯度的单元平均值

试验室 i	水平 j							
	1		2		3		4	
	\bar{y}_{ij}	n_{ij}	\bar{y}_{ij}	n_{ij}	\bar{y}_{ij}	n_{ij}	\bar{y}_{ij}	n_{ij}
1	96.9%	4	94.2%	4	92.3%	4	86.8%	4

2	99.3%	4	96.8%	4	74.0%	4	88.2%	4
3	99.3%	4	97.6%	4	83.0%	4	84.3%	4
4	98.8%	4	97.7%	4	88.1%	4	86.0%	4
5	99.2%	4	97.1%	4	91.6%	4	87.7%	4
6	98.7%	4	97.2%	4	91.6%	4	85.1%	4

(3) 单元标准差 s_{ij} 的计算如表 7.3。

表 7.3 纯度的单元标准差

试验室 i	水平 j							
	1		2		3		4	
	S_{ij}	n_{ij}	S_{ij}	n_{ij}	S_{ij}	n_{ij}	S_{ij}	n_{ij}
1	0.3%	4	0.9%	4	0.7%	4	0.5%	4
2	0.1%	4	1.1%	4	1.1%	4	1.0%	4
3	0.1%	4	0.5%	4	4.3%	4	1.0%	4
4	0.8%	4	0.3%	4	3.8%	4	1.2%	4
5	0.4%	4	1.0%	4	0.6%	4	1.1%	4
6	0.7%	4	0.8%	4	1.1%	4	0.7%	4

(4) 一致性和离群值的检查

应用柯克伦检验，计算得到的检验统计量 C 的值，如表 7.4。对 $n=4$ ， $p=6$ ，显著性水平为 5% 时的临界值为 0.532，显著性水平为 1% 时的临界值为 0.626，表明没有离群值或歧离值。

表 7.4 柯克伦检验统计量 C 的值

水平 j	1	2	3	4
C	0.440	0.317	0.511	0.269

将格拉布斯检验应用于单元平均值，计算得到的单个低值、单个高值、两个低值、两个高值，如表 7.5。结果表明水平 1 和 2 的单个低值、水平 1 和 2 的两个低值和水平 4 的两个高值是歧离值，这些歧离值在分析中予以保留。

表 7.5 对单元平均值的格拉布斯检验

水平 j	单个低值	单个高值	两个低值	两个高值	检验类型
1	1.965*	0.664	0.034*	0.757	格拉布斯检 验统计量
2	1.972*	0.738	0.031*	0.721	
3	1.785	0.772	0.041	0.683	
4	1.363	1.213	0.250	0.312*	
歧离值	1.887	1.887	0.0349	0.0349	格拉布斯检
离群值	1.973	1.973	0.0116	0.0116	验临界值

注：*为歧离值。

(5) \hat{m}_j 、 S_{rj} 和 S_{Rj} 的计算

对总平均值 \hat{m}_j 、重复性标准差 S_{rj} 和再现性标准差 S_{Rj} 进行计算，结果如表 7.6，对表中数据进行检查，没有显示出它们与 m 有任何依赖关系，因而可用他们的平均值作为重复性和再现性标准差的最终值。

表 7.6 纯度的 \hat{m}_j 、 S_{rj} 和 S_{Rj} 值

水平 j	P_j	\hat{m}_j	S_{rj}	S_{Rj}
1	6	98.7%	0.5%	1.0%
2	6	96.7%	0.8%	1.5%
3	6	86.8%	2.5%	7.5%
4	6	86.3%	1.0%	1.7%

(6) 结论

测量方法精密度如下：

重复性标准差： $S_r = 1.2\%$ ；

再现性标准差： $S_R = 2.9\%$ 。

这些值的适当范围为 86.3% ~ 98.7%。这些值是通过 6 个试验室参与的一致性水平试验获得的，所测细胞纯度的值在上述范围内。试验中共检测到 8 个歧离值，但在分析中予以保留。该方法重复性、再现性均较好，满足该标准要求，说明该方法稳定可靠。

8. 得率

8.1 试剂

细胞分选用磁珠及其配套试剂、荧光素标记的单克隆抗体、分选缓冲液。

8.2 设备

细胞分选用磁珠配套磁分离器、生物安全柜、血细胞计数器或自动细胞计数仪、流式细胞仪。

8.3 试验方法

(1) 按照本文件“台盼蓝染色法”规定的磁性细胞分选试验方法进行磁性细胞分选。

(2) 按照 GB/T 38506 规定的血球计数法或自动图像分析法测定分选前的细胞悬液和分选后的细胞悬液密度。

(3) 按照本文件“第 13 章”规定的方法测定分选前的细胞悬液和分选后的细胞悬液纯度。

8.4 试验数据处理

按照式 (4) 计算细胞得率：

$$Y = \frac{\rho_{after} \times V_{after} \times P_{after}}{\rho_{before} \times V_{before} \times P_{before}} \times 100\% \dots\dots\dots (4)$$

式中：

Y ——细胞得率；

ρ_{after} ——分选后的细胞悬液密度，单位为个每毫升（个/mL）；

V_{after} ——分选后的细胞悬液体积，单位为毫升（mL）；

P_{after} ——分选后的细胞悬液纯度；

ρ_{before} ——分选前的细胞悬液密度，单位为个每毫升（个/mL）；

V_{before} ——分选前的细胞悬液体积，单位为毫升（mL）；

P_{before} ——分选前的细胞悬液纯度。

结果取 3 次平行试验的算术平均值（3 个结果的相对标准偏差允许 10% 以内），计算结果精确到小数点后一位。

8.5 方法验证

共 6 个试验室参与验证，验证磁珠为 50 nm、300 nm、2.8 μ m 磁珠，验证结果如表 8.1-8.6。

(1) 原始数据如表 8.1。

表 8.1 原始数据：得率

试验室 i	水平 j			
	1	2	3	4
1	83.1%	82.7%	80.3%	86.9%
	87.3%	83.0%	91.8%	89.6%
	86.6%	90.0%	78.6%	86.1%
	89.4%	82.9%	90.9%	91.3%
2	92.9%	92.1%	93.5%	74.5%
	88.5%	98.0%	94.0%	82.6%
	91.3%	91.4%	84.0%	75.8%
	89.3%	98.3%	88.1%	72.1%
3	95.5%	91.4%	87.0%	86.2%
	90.4%	94.2%	80.7%	79.3%
	93.4%	94.6%	80.8%	70.5%
	90.8%	95.1%	84.7%	85.5%
4	94.9%	88.7%	86.3%	79.0%
	95.6%	93.8%	92.1%	85.2%
	83.2%	89.0%	92.0%	91.4%
	82.8%	92.9%	86.8%	85.0%
5	89.4%	90.0%	93.7%	94.7%
	92.3%	85.6%	90.4%	95.6%
	73.5%	82.2%	93.9%	87.4%
	72.4%	86.3%	89.4%	98.6%
6	91.2%	95.5%	81.8%	83.0%
	96.6%	94.4%	78.8%	75.9%
	91.1%	97.8%	84.1%	83.6%
	90.2%	98.7%	94.7%	81.6%

(2) 单元平均值 \bar{y}_{ij} 的计算如表 8.2。

表 8.2 得率的单元平均值

试验室 i	水平 j							
	1		2		3		4	
	\bar{y}_{ij}	n_{ij}	\bar{y}_{ij}	n_{ij}	\bar{y}_{ij}	n_{ij}	\bar{y}_{ij}	n_{ij}
1	86.6%	4	84.7%	4	85.4%	4	88.5%	4
2	90.5%	4	95.0%	4	89.9%	4	76.3%	4
3	92.5%	4	93.8%	4	83.3%	4	80.4%	4
4	89.1%	4	91.1%	4	89.3%	4	85.2%	4
5	81.9%	4	86.0%	4	91.9%	4	94.1%	4
6	92.3%	4	96.6%	4	84.9%	4	81.0%	4

(3) 单元标准差 s_{ij} 的计算如表 8.3。

表 8.3 得率的单元标准差

试验室 i	水平 j							
	1		2		3		4	
	S_{ij}	n_{ij}	S_{ij}	n_{ij}	S_{ij}	n_{ij}	S_{ij}	n_{ij}
1	2.6%	4	3.6%	4	6.9%	4	2.4%	4
2	2.0%	4	3.7%	4	4.8%	4	4.5%	4
3	2.4%	4	1.7%	4	3.1%	4	7.3%	4
4	7.1%	4	2.6%	4	3.2%	4	5.1%	4
5	10.4%	4	3.2%	4	2.3%	4	4.8%	4
6	2.9%	4	2.0%	4	6.9%	4	3.5%	4

(4) 一致性和离群值的检查

应用柯克伦检验，计算得到的检验统计量 C 的值，如表 8.4。对 $n=4$ ， $p=6$ ，显著性水平为 5% 时的临界值为 0.532，显著性水平为 1% 时的临界值为 0.626，表明水平 1 的一个单元为歧离值，没有离群值，该歧离值仍然参与后续计算。

表 8.4 柯克伦检验统计量 C 的值

水平 j	1	2	3	4
C	0.591*	0.273	0.334	0.379

注：*为歧离值。

将格拉布斯检验应用于单元平均值，计算得到的单个低值、单个高值、两个低值、两个高值，如表 8.5。结果表明没有歧离值或离群值。

表 8.5 对单元平均值的格拉布斯检验

水平 j	单个低值	单个高值	两个低值	两个高值	检验类型
1	1.715	0.918	0.094	0.527	格拉布斯检验统计量
2	1.336	1.105	0.134	0.463	
3	1.225	1.308	0.385	0.343	
4	1.247	1.540	0.446	0.195	
歧离值	1.887	1.887	0.0349	0.0349	格拉布斯检验临界值
离群值	1.973	1.973	0.0116	0.0116	离群值临界值

(5) \hat{m}_j 、 S_{rj} 和 S_{Rj} 的计算

对总平均值 \hat{m}_j 、重复性标准差 S_{rj} 和再现性标准差 S_{Rj} 进行计算，结果如表 8.6，对表中数据进行检查，没有显示出它们与 m 有任何依赖关系，因而可用他们的平均值作为重复性和再现性标准差的最终值。

表 8.6 得率的 \hat{m}_j 、 S_{rj} 和 S_{Rj} 值

水平 j	P_j	\hat{m}_j	S_{rj}	S_{Rj}
1	6	88.8%	5.5%	6.3%
2	6	91.2%	2.9%	5.5%
3	6	87.4%	4.9%	5.4%
4	6	84.2%	4.8%	7.6%

(6) 结论

测量方法精密度如下：

重复性标准差： $S_r = 4.5\%$ ；

再现性标准差： $S_R = 6.2\%$ 。

这些值的适当范围为 84.2% ~ 91.2%。这些值是通过 6 个试验室参与的一致性水平试验获得的，所测细胞得率的值在上述范围内。试验中共检测到 1 个歧离值，但在分析中予以保留。该方法重复性、再现性均较好，满足该标准要求，说明该方法稳定可靠。

9. 预期达到的社会效益、对产业发展的作用等情况

制定细胞分选用磁珠关键性能检测方法与评价体系标准势在必行。该标准的研制与制定将有助于对国内外同类产品进行统一检测统一评价，能更客观、有效体现产品的优缺点，使消费者能够一目了然地判断产品优劣；同时，国内研发者能有的放矢的进行产品改造和新产品的研发，打破垄断，促进我国自主知识产权磁性细胞分选产品的产出和应用，有助于国内产品大放异彩。

（四）与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

本标准在制定过程中未采用国际标准和国外标准。

（五）以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因

本标准在制定过程中未采用国际标准和国外标准。

（六）与有关的现行法律、行政法规及相关标准的关系

本标准中引用了《GB/T 6682》、《GB/T 16886.2》、《GB/T 16886.5》、《GB/T 16886.12》、《GB/T 38506》、《GB/T 39729》、《GB/T 40268》和《中华人民共和国药典》（2020 年版）四部（国家药典委员会）相关规定，保持一致；与相关的现行法律、法规和强制性国家标准没有冲突。

（七）重大分歧意见的处理经过和依据

无。

（八）涉及专利的有关说明

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。

（九）实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期建议等措施建议

本标准一经发布，标准编制组首先将制定出《细胞分选用磁珠性能检测方法》标准实施建议方案；其次在国标委及归口单位的协调下，组织标准的宣贯和集中培训，推进标准的顺利实施。

（十）其他应予说明的事项

无。

标准起草组
2025 年 3 月