



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

细胞分选用磁珠性能检测方法

Magnetic beads performance detection methods for cell separation

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

— XX — XX 发布

XXXX — XX — XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 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 2

5 试剂和标本 2

6 粒度 3

7 超顺磁性 3

8 磁回收率 3

9 无菌 3

10 内毒素 4

11 体外细胞毒性 4

12 细胞活率 6

13 细胞纯度 8

14 细胞得率 9

参考文献 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。

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。

本文件由全国生化检测标准化技术委员会（SAC/TC 387）提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

细胞分选用磁珠性能检测方法

1 范围

本文件规定了细胞分选用磁珠的粒度、超顺磁性、磁回收率、无菌、内毒素、体外细胞毒性的性能参数及检测方法，规定了反映细胞分选用磁珠分选性能的目标细胞活率、纯度、得率的性能参数及检测方法。

本文件适用于具有超顺磁性且表面固定有抗体或链霉亲和素等生物活性分子的细胞分选用磁珠的性能检测。

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 16886.2 医疗器械生物学评价 第2部分：动物福利要求
GB/T 16886.5 医疗器械生物学评价 第5部分：体外细胞毒性试验
GB/T 38506 动物细胞培养过程中生化参数的测定方法
GB/T 39729 细胞纯度测定通用要求 流式细胞测定法
GB/T 40268 免疫磁性材料性能检测方法
中华人民共和国药典（2020年版）四部（国家药典委员会）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

体外细胞毒性 *in vitro cytotoxicity*

由细胞分选用磁珠浸提液引起的体外培养的细胞的死亡、溶解和生长抑制等现象。

3.2

浸提液 *extract*

由试验样品或对照样品浸提而获得的液体。

[来源：ISO 10993-12: 2021, 3.6]

3.3

细胞活率 *cell viability*

活细胞数目占总细胞数目的百分比。

3.4

设门 *gating*

在流式分析图分析过程中，选定特定细胞群的操作。

3.5

细胞纯度 *cell purity*

目标细胞数目占总细胞数目的百分比。

3.6

细胞得率 cell yield

分选后获得的目标细胞数目占分选前的目标细胞数目的百分比。

4 缩略语

以下缩略语适用于本文件。

AO: 吖啶橙 (Acridine Orange)

DMSO: 二甲基亚砷 (Dimethyl Sulfoxide)

EDTA: 乙二胺四乙酸 (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)

FITC: 异硫氰酸荧光素 (Fluorescein Isothiocyanate)

FSC: 前向角散射光 (Forward Scatter)

MTT: 噻唑蓝 (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

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

PI: 碘化丙啶 (Propidium Iodide)

SSC: 侧向角散射光 (Side Scatter)

XTT: 2,3-二(2-甲氧基-4-硝基-5-磺苯基)-2H-四氮唑-5-甲酰苯胺 (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)

7-AAD: 7-氨基放线菌素D (7-Aminoactinomycin D)

5 试剂和标本

5.1 试剂

5.1.1 除非另有说明,分析时使用符合国家标准和分析纯试剂,试验用水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1.2 PBS (1×): 称取 8.006 g 氯化钠 (NaCl)、0.201 g 氯化钾 (KCl)、0.272 g 磷酸二氢钾 (KH₂PO₄)、2.865 g 十二水合磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄ · 12H₂O), 用纯水定容至 1 L, pH 值为 7.2-7.4, 经 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 4 °C 储存。

5.1.3 分选缓冲液: 配置 0.5 mol/L EDTA 储存液 (称取 18.61 g 二水合乙二胺四乙酸二钠 (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈ · 2H₂O), 用纯水定容至 100 mL, 配置成 0.5 mol/L EDTA 储存液, pH 值为 8, 4 °C 储存), 量取 4 mL 0.5 mol/L EDTA 储存液和 20 mL 胎牛血清, 用 PBS (1×) 定容至 1 L; 或量取 4 mL 0.5 M EDTA 储存液和称取 5 g 牛血清白蛋白, 用 PBS (1×) 定容至 1 L; 经 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 4 °C 储存。

注: 试验使用的试剂质量应避免过期造成的试剂性能改变, 测定前应根据试剂说明书或产品质量报告验证试剂质量。

5.2 标本

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:

- 商用标本。注明: 厂家、货号、批号、质检报告。
- 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。

- c) 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实验室动物福利全部适用法规的实验室内进行，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。
- d) 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。

6 粒度

检测细胞分选用磁珠的粒度，按照GB/T 40268规定的粒度执行。

7 超顺磁性

7.1 无柱式

检测无柱式的细胞分选用磁珠的超顺磁性，按照GB/T 40268规定的超顺磁性执行。

7.2 有柱式

7.2.1 试剂

细胞分选用磁珠。

7.2.2 设备

7.2.2.1 离心机：允许在 4 °C 条件下进行 20000 g 的离心。

7.2.2.2 振动样品磁强计（Vibrating Sample Magnetometer, VSM）。

7.2.2.3 分析天平：灵敏度大于 0.1 mg。

7.2.3 试验步骤

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。

7.2.4 试验数据处理

按照GB/T 40268规定的超顺磁性执行。

8 磁回收率

按照GB/T 40268规定的磁回收率，采用分光光度法测定细胞分选用磁珠的磁回收率。首先对细胞分选用磁珠进行全光谱波长扫描，确定测试波长，如细胞分选用磁珠具有最大吸收峰，则按照GB/T 40268规定的磁回收率执行。如细胞分选用磁珠不具有最大吸收峰，则不能按照GB/T 40268规定的磁回收率执行。

9 无菌

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。

10 内毒素

10.1 原理

细菌死亡或自溶后释放出内毒素，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。

10.2 试剂

10.2.1 细胞分选用磁珠。

10.2.2 凝胶法鲎试剂。

10.2.3 细菌内毒素检查用水。

10.2.4 细菌内毒素标准品。

10.3 设备

10.3.1 恒温水浴锅或干热恒温仪等恒温器：37℃ ± 1℃。

10.3.2 涡旋混合器。

10.3.3 无内毒素玻璃反应试管或无内毒素安瓿。

10.3.4 无内毒素吸头或无内毒素移液管。

10.4 试验步骤

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。

10.5 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。

11 体外细胞毒性

11.1 原理

活细胞线粒体内的琥珀酸脱氢酶能将外源性四咪唑盐（MTT、XTT等）还原成蓝紫色甲瓚物质，甲瓚的生成量与活细胞的增殖呈正相关，可通过酶标分析仪检测甲瓚含量，从而检测细胞增殖效率。采用含血清培养基对细胞分选用磁珠进行浸提，用浸提液进行细胞的体外培养，通过酶标分析仪检测细胞增殖状态来评估细胞分选用磁珠对细胞的毒性。

11.2 试剂

- 11.2.1 细胞分选用磁珠。
- 11.2.2 胎牛血清。
- 11.2.3 依格尔最低限量基本培养基。
- 11.2.4 0.25%胰蛋白酶溶液（含 EDTA）。
- 11.2.5 青霉素-链霉素溶液。
- 11.2.6 高密度聚乙烯。
- 11.2.7 DMSO。
- 11.2.8 MTT 和异丙醇，或 XTT 和吩嗪硫酸甲酯。
- 11.2.9 PBS（1×）。

11.3 设备

- 11.3.1 培养箱：37 °C，湿化，5% CO₂，95%空气。
- 11.3.2 生物安全柜。
- 11.3.3 水浴锅：37 °C。
- 11.3.4 倒置显微镜。
- 11.3.5 分析天平：灵敏度大于 0.1 mg。
- 11.3.6 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。
- 11.3.7 细胞计数仪或血细胞计数器。
- 11.3.8 细胞培养瓶或细胞培养皿。
- 11.3.9 96 孔细胞培养板。

11.4 试验步骤

11.4.1 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）接触的手机分选用磁珠，浸提条件为 37 °C ± 1 °C 下浸提 24 h ± 2 h；方法 2 适用于与细胞长期（≥24 h）接触的手机分选用磁珠，浸提条件为 37 °C ± 1 °C 下浸提 72 h ± 2 h。

11.4.2 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。

11.4.3 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。

11.4.4 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。

11.5 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。

12 细胞活率

12.1 台盼蓝染色法

12.1.1 试剂

12.1.1.1 细胞分选用磁珠及其配套试剂。

12.1.1.2 台盼蓝溶液染色液。

12.1.1.3 分选缓冲液。

12.1.2 设备

12.1.2.1 细胞分选用磁珠配套磁分离器。

12.1.2.2 生物安全柜。

12.1.2.3 血细胞计数板或自动细胞计数仪。

12.1.3 试验步骤

12.1.3.1 取适量标本（统称分选前的细胞悬液），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的密度。

12.1.3.2 根据细胞密度，取适量分选前的细胞悬液，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，得到分选后的细胞悬液。

12.1.3.3 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执行。

12.1.4 试验数据处理

按照GB/T 38506规定的细胞活率的测定的结果计算执行。

12.2 荧光染色法

12.2.1 细胞计数仪检测法

12.2.1.1 原理

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。

12.2.1.2 试剂

12.2.1.2.1 细胞分选用磁珠及其配套试剂。

12.2.1.2.2 AO/PI 荧光染料。

12.2.1.2.3 分选缓冲液。

12.2.1.3 设备

12.2.1.3.1 细胞分选用磁珠配套磁分离器。

12.2.1.3.2 生物安全柜。

12.2.1.3.3 双荧光细胞计数仪：配置 AO/GFP 和 PI/RFP 荧光通道。

12.2.1.4 试验步骤

12.2.1.4.1 按照本文件“12.1.3.1”和“12.1.3.2”规定的磁性细胞分选试验方法进行磁性细胞分选。

12.2.1.4.2 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。

12.2.1.4.3 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。

12.2.1.5 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。

12.2.2 流式细胞仪检测法

12.2.2.1 原理

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。

12.2.2.2 试剂

12.2.2.2.1 细胞分选用磁珠及其配套试剂。

12.2.2.2.2 7-AAD 荧光染料。

12.2.2.2.3 分选缓冲液。

12.2.2.3 设备

12.2.2.3.1 细胞分选用磁珠配套磁分离器。

12.2.2.3.2 生物安全柜。

12.2.2.3.3 流式细胞仪。

12.2.2.4 试验步骤

- 12.2.2.4.1 按照本文件“12.1.3.1”和“12.1.3.2”规定的磁性细胞分选试验方法进行磁性细胞分选。
- 12.2.2.4.2 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。
- 12.2.2.4.3 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。
- 12.2.2.4.4 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（1 \times ）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。
- 12.2.2.4.5 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。
- 12.2.2.4.6 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-苯基吡啶）、PI 等核酸类染料和胺基类染料。

12.2.2.5 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。

13 细胞纯度

13.1 原理

通过荧光素标记的单克隆抗体标记待测样品中的目标细胞，使用流式细胞仪，观测总细胞和目标细胞不同的光学（散射光和荧光）特性，实现样本中的总细胞和目标细胞进行区分和计数，以获得目标细胞纯度。

13.2 试剂

13.2.1.1.1 细胞分选用磁珠及其配套试剂。

13.2.1.1.2 荧光素标记的单克隆抗体：确保特异性识别目标细胞，如 FITC 标记的抗人 CD4 单克隆抗体，能特异性识别人 CD4 阳性细胞；FITC 标记的抗鼠 CD4 单克隆抗体，能特异性识别鼠 CD4 阳性细胞。

13.2.1.1.3 分选缓冲液。

13.3 设备

同 12.2.2.3。

13.4 试验步骤

按照本文件“12.1.3.1”和“12.1.3.2”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。

13.5 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。

14 细胞得率

14.1 试剂

同 13.2。

14.2 设备

14.2.1.1.1 细胞分选用磁珠配套磁分离器。

14.2.1.1.2 生物安全柜。

14.2.1.1.3 血细胞计数器或自动细胞计数仪。

14.2.1.1.4 流式细胞仪。

14.3 试验步骤

14.3.1 按照本文件“12.1.3.1”和“12.1.3.2”规定的磁性细胞分选试验方法进行磁性细胞分选。

14.3.2 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。

14.3.3 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。

14.4 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。

参 考 文 献

- [1] GB/T 16886.12 医疗器械生物学评价 第12部分：样品制备与参照材料
 - [2] GB/T 41309-2022 纳米技术 纳米材料的内毒素体外测试 鲎试剂法
 - [3] JJG 861-2007 酶标分析仪检定规程
 - [4] JJF 1665-2017 流式细胞仪校准规范
 - [5] WS/T 360-2024 流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群指南
 - [6] YY/T 0588-2017 流式细胞仪
-