

ICS
CCS

CITS

深圳市生物医药促进会团体标准

T/CITS XXXX. 1—20XX

软琼脂克隆形成试验

Soft Agar Assay

（草案稿）

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

2025-XX-XX 发布

2025-XX-XX 实施

深圳市生物医药促进会 发布

目 次

目 次..... 1

前 言..... 2

引 言..... 3

1 范围..... 4

2 规范性引用文件..... 4

3 术语和定义..... 4

4 符号和缩略语..... 4

5 实验环境..... 4

6 仪器与耗材..... 4

7 试剂..... 5

8 实验用细胞..... 5

9 实验分组..... 6

10 操作步骤..... 6

11 方法说明..... 7

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这些专利的责任。

本文件由深圳市生物医药促进会提出并归口。

本文件起草单位：深圳市茵冠生物科技有限公司、XXX、XXX、XXX、XXX。

本文件主要起草人：姜舒、XXX、XXX。

引 言

《中国药典》2020 版三部通则《生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制》规定，“对于某些细胞，也可采用软琼脂克隆形成试验或器官培养试验等体外法检测细胞的成瘤性，特别是对于低代次、在动物体内无成瘤性的传代细胞系。体外法的结果可作为细胞成瘤性评价的参考”，但未规定软琼脂克隆形成试验的检测方法。基于我们实验研究的基础，起草组形成了软琼脂克隆形成试验检测方法，并制定本文件。目的在于，方便需求单位使用，便于行业内实验方法的统一，利于对结果评价达成共识。

本方法以人间充质干细胞作为检测样本开展软琼脂克隆形成试验，其余细胞类型未进行测试，确认方法适用性后参考使用。依据药典，此方法结果可作为细胞成瘤性评价的参考。当检测结果有争议时，以动物成瘤性实验的检测结果为准。

软琼脂克隆形成试验

1 范围

本文件规定了软琼脂克隆形成试验检测方法的实验用细胞、实验分组、操作步骤、结果判定。
本文件适用于人间充质干细胞软琼脂克隆形成试验检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

《中国药典》2020版

《药品生产质量管理规范（2010年修订）》（新版GMP）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

人间充质干细胞 human mesenchymal stem cell, hMSC

一种来源于中胚层的多能干细胞，具有自我更新和多向分化的干细胞特性。

3.2

完全培养基 complete medium

在基础培养基中加入添加物，使培养基中营养物质更丰富，配制后得到的最终培养细胞用的培养基。

4 符号和缩略语

下列缩略语适用于本文。

FBS: 胎牛血清（Fetal bovine serum）

MEM: 最小必需培养基（Minimum Essential Medium）

NEAA: 非必需氨基酸（Non-essential amino acid）

MSC: 间充质干细胞（Mesenchymal stem cell）

5 实验环境

实验环境为不低于C级背景下的A级洁净区，按照《药品生产质量管理规范（2010年修订）》执行。

6 仪器与耗材

- 6.1 二级生物安全柜。
- 6.2 荧光细胞计数仪。
- 6.3 低速离心机。
- 6.4 分析天平。
- 6.5 纯水仪。
- 6.6 高压灭菌锅。
- 6.7 水浴锅。
- 6.8 CO₂培养箱。
- 6.9 微量移液器： 10 μl、100 μl、200 μl、1000 μl。
- 6.10 倒置显微镜及成像系统。
- 6.11 2℃ ~ 8℃医用冷藏冰箱。
- 6.12 药匙、称量纸、量筒、三角瓶。
- 6.13 无菌吸头：10 μl、100 μl、200 μl、1000 μl。
- 6.14 无菌移液管：5 ml、10 ml、25 ml。
- 6.15 无菌离心管：1.5 ml、15 ml、50 ml。
- 6.16 细胞计数板
- 6.17 无菌六孔板。

7 试剂

- 7.1 低熔点琼脂糖。
- 7.2 MSC 细胞培养基。
- 7.3 MEM 培养基。
- 7.4 FBS。
- 7.5 MEM NEAA。
- 7.6 丙酮酸钠。
- 7.7 谷氨酰胺。
- 7.8 AO/PI 染液。

8 实验用细胞

- 8.1 阴性对照用细胞

推荐使用 MRC-5 细胞系。来源于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库，保存取用按照说明书执行。

8.2 阳性对照用细胞

推荐使用 HeLa 细胞系，或经验证过的永生化细胞。来源于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库，保存取用按照说明书执行。

8.3 待检细胞

hMSC。

9 实验分组

表 1 实验分组设计表

分组	平行	上层平板			底层平板培养基 (0.6 %琼脂)
		接种细胞	接种量 (活细胞数量)	上层平板培养基 (0.35 %琼脂)	
阴性对照	3	MRC-5	1000 cells/孔	MEM 完全培养基 +琼脂糖	MEM 完全培养基 +琼脂糖
阳性对照	3	HeLa	1000 cells/孔	MEM 完全培养基 +琼脂糖	MEM 完全培养基 +琼脂糖
样本组	3	hMSC	1000 cells/孔	MSC 细胞培养基 +琼脂糖	MSC 细胞培养基 +琼脂糖
干扰组	3	HeLa+hMSC	HeLa: 1000 cells/孔 hMSC: 1000 cells/孔	MSC 细胞培养基 +琼脂糖	MSC 细胞培养基 +琼脂糖
空白对照	3	无	无	MSC 细胞培养基 +琼脂糖	MSC 细胞培养基 +琼脂糖

10 操作步骤

10.1 溶液配制

10.1.1 5%琼脂糖（以 10 ml 为例）：用分析天平称量 0.5 g 低熔点琼脂糖干粉，加入 10 ml 超纯水，混匀，121 °C灭菌 15 min。灭菌完成后，热水浴保持琼脂糖溶液不凝固。

10.1.2 MEM 完全培养基（以 100 ml 为例）：无菌条件下按照表 2 配制，混匀后置于 37 °C备用。

表 2 MEM 完全培养基成分表

试剂	用量
MEM (1×)	87 ml
FBS	10 ml
MEM NEAA (100×)	1 ml
丙酮酸钠 (100 mM)	1 ml
谷氨酰胺 (100×)	1 ml

10.2 细胞处理

10.2.1 细胞 300 g 离心 10 min，去上清，按照表 1 对应的细胞培养基进行重悬。

10.2.2 细胞计数：取 20 μ l 细胞悬液加入至 1.5 ml 离心管中，再加入 20 μ l AO/PI 染料，混匀后取 20 μ l 加入细胞计数板中，使用荧光细胞计数仪检测。

10.2.3 浓度调整：根据计数结果，调整细胞浓度，方法如下：

10.2.3.1 阴性对照组：MRC-5，用 MEM 完全培养基调整活细胞浓度至 1×10^3 cells/ml。

10.2.3.2 阳性对照组：HeLa，用 MEM 完全培养基调整活细胞浓度至 1×10^3 cells/ml。

10.2.3.3 样本组：待检细胞，用 MSC 细胞培养基调整活细胞浓度至 1×10^3 cells/ml。

10.2.3.4 干扰组：HeLa 和待检细胞，分别用 MSC 细胞培养基调整活细胞浓度至 2×10^3 cells/ml，各取 3 ml，混匀。

10.3 铺板及细胞接种（每组）

10.3.1 底层琼脂（0.6%）配制及铺板：取 8.8 ml 细胞用培养基加入到 15 ml 离心管中，再加入 1.2 ml 5% 琼脂糖溶液，混匀即为底层琼脂溶液。取六孔板，每孔铺入 2 ml 底层琼脂溶液，将孔板室温水平放置 30 min 自然冷却至凝固，或密封后置于 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。

10.3.2 上层琼脂（0.35%）配制（含细胞）及铺板：取 5 ml 调整好浓度的细胞悬液加入到 15 ml 离心管中，再加入 4.3 ml 37°C 预热的对应培养基，混匀，最后加入 0.7 ml 5% 琼脂糖溶液，混匀后立即接种至底层琼脂上，每孔接种 2 ml，每孔接种所需细胞 1×10^3 cells。

10.3.3 空白对照：底层平板配制同 10.3.1。上层平板配制，取 9.3 ml MSC 细胞培养基加入到 15 ml 离心管中，再加入 0.7 ml 5% 琼脂，混匀后取 2 ml 铺板。

10.3.4 配制后的平板室温水平放置 30 min 自然冷却。

10.4 培养

平板置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 21 d。每 3 d $\sim$ 5 d 加 100 μ l 上层平板配制用细胞培养基进行补液并观察有无污染，有无克隆形成。

10.5 结果与报告

10.5.1 培养结束后显微镜下观察细胞克隆形成情况，可采用低倍镜观察。

10.5.2 结果判定原则：各组 3 个平行结果一致。空白对照无克隆形成、阴性对照无克隆形成、阳性对照有克隆形成、干扰组有克隆形成，则实验结果有效。样本组结果在实验有效的前提下判定。

11 方法说明

软琼脂克隆形成试验是细胞成瘤性检测的辅助方法，检测阳性的样本以动物成瘤性实验检测结果为准，动物成瘤性实验检测方法见《中国药典》现行版三部通则。