ICS 13.040.35
CCS C 70

中华人民共和国国家标准

GB/T 43459—2023

洁净室及受控环境中细胞培养操作技术规范

Technical specification for cell culture operations in cleanroom and relevant controlled environment

2023-12-28 发布　　2024-07-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会　发布

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。

本文件由全国洁净室及受控环境标准化技术委员会(SAC/TC 319)提出并归口。

本文件起草单位:中国科学院动物研究所、北京工商大学、军事科学院军事医学研究院、中国农业大学、中国标准化协会、华东理工大学、中国医药生物技术协会、北京干细胞与再生医学研究院、苏州安泰空气技术有限公司、珐成制药系统工程(上海)有限公司、北京贝来药业有限公司、山东泰鸿生物科技发展有限公司、昆明市延安医院、上海市室内环境净化行业协会、浙江华源环境工程有限公司、天俱时工程科技集团有限公司、杭州博岳生物技术有限公司、派欧尼尔环境净化工程(北京)有限公司、合肥中科普瑞昇生物医药科技有限公司、上海赛傲生物技术有限公司、唐颐控股(深圳)有限公司、浙江泰林生物技术股份有限公司、戴文工程设计(上海)有限公司、北京百普赛斯生物科技股份有限公司、上海沪试实验室器材股份有限公司、深圳赛动智造科技有限公司、熙迈(上海)检测技术服务有限公司、上海市食品药品包装材料测试所、东富龙生命科技有限公司、上海丹瑞生物医药科技有限公司、深圳市北科生物科技有限公司、北京萨姆伯科技有限公司。

本文件主要起草人:马爱进、张毅、吴朝晖、王健、赵同标、蔡海波、王芳、郝胤博、侯宗柳、邵小燕、刘拥军、韩建永、王坤、魏佳鸣、罗丽萍、李昂、吴志坚、徐雪强、赵娟、黄煜、曹佳妮、郝捷、李思霆、刘沐芸、陈宜顶、徐绍坤、宋晓晖、芦登峰、宋金辉、程锦生、吴军剑、孙巍群、王磊、梁晓、李因来、陈程、郝帅。

洁净室及受控环境中细胞培养操作技术规范

1 范围

本文件规定了洁净室及受控环境中哺乳动物细胞培养操作的要求，描述了对应的证实方法。

本文件适用于洁净室及受控环境中哺乳动物细胞培养。

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 25915.5 洁净室及相关受控环境 第5部分：运行

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

细胞培养 cell culture

使细胞生存、生长、增殖并维持其生物学特性及功能的过程。

3.2

扩增 expansion

细胞培养中使细胞数量增加的过程。

3.3

传代 passage

为细胞生长提供更大的生长空间进行再培养的过程。

4 要求

4.1 环境保障

4.1.1 应按GB/T 25915.5的要求建立运行体系，包括风险控制、人员培训、洁净服、人员行为、室内物流、日常清洁等方面的洁净室运行规范。

4.1.2 宜建立洁净度、温湿度、压差等受控环境的自动检测系统。

4.2 准备

4.2.1 超净工作台/生物安全柜/隔离器等受控环境应用紫外线或过氧化氢等消毒后再进行培养操作。

4.2.2 应准备细胞培养所需试剂和耗材，包括但不限于培养基、生理缓冲液（PBS）、培养容器等。

4.2.3 实验用品、试剂耗材外包装等应使用适宜的消毒剂（如75%乙醇）擦拭。

4.2.4 培养基配制时，应根据细胞来源及种类确定所需培养液种类以及需添加的特殊成分。配制后可采取通过 0.22 μm 孔径滤膜过滤等措施除菌，并选择适宜条件保存培养基。若培养基、消化液等试剂从冰箱取出，需升温到细胞培养的温度。

4.3 分离

4.3.1 人或动物细胞实体组织原代分离时，应在无菌获得组织后用适当的缓冲液清洗，去除非培养所需组织后，用适宜的工器具（如手术刀）将组织切成若干小块，移入无菌容器中，加入适量缓冲液，可反复剪切至适宜大小。然后根据不同细胞的生长、增殖特性选择机械分散、酶消化、非酶消化等适宜的方法进行分离获得原代细胞。

4.3.2 人或动物细胞液体组织原代分离培养时，采用适宜的方法获得目的细胞，然后用适当的缓冲液（如无钙、镁生理缓冲液）清洗，用培养基清洗后获得原代细胞。

4.3.3 将获得的原代细胞用缓冲液清洗，用细胞培养液重悬制成细胞悬液，并将细胞数目调整为所需密度分装于培养容器中。

4.3.4 将获得的原代细胞置于适宜的培养条件下进行培养，培养至适宜细胞密度后再进行传代。

4.4 纯化

4.4.1 需纯化的原代分离细胞，应根据细胞种类、来源、培养要求和目的，选择细胞因子依赖纯化法、酶消化法、机械刮除法、反复贴壁法、细胞克隆技术法等适宜的细胞纯化方法。

4.4.2 人和动物组织（胚胎）中某些分离细胞的生长增殖需要有特定的细胞因子或化学小分子，宜选择细胞因子或化学小分子依赖纯化法，通过不同的培养体系进行筛选纯化细胞。

4.4.3 贴壁细胞宜选择酶消化法或机械刮除法进行纯化。

4.4.4 悬浮细胞宜采用磁珠分选/流式细胞术分选等适宜纯化方法。

4.4.5 胚胎干细胞、诱导多能干细胞等宜选择细胞克隆法进行纯化。

4.5 传代与扩增

4.5.1 细胞生长到一定密度需要传代时，贴壁生长的细胞宜选择酶消化法传代；悬浮生长的细胞宜选择离心法、半量换液法等传代；收集获得的细胞计数后，根据细胞类型选择适宜的接种密度进行培养。

4.5.2 细胞需要连续扩增培养时，应根据细胞生长的状态和细胞培养预定目的要求进行细胞培养换液或补液。

4.6 冻存

4.6.1 需要冻存的细胞，应根据细胞特性，选择状态良好的细胞如对数生长期细胞，将其制备成悬液，计数，并根据具体冻存要求调整细胞密度进行冻存。

4.6.2 应选择适宜的冷冻保护剂、冷冻方法和冷冻温度进行冻存。

4.6.3 对冻存的细胞应记录细胞名称、数量、代次、日期、培养条件、操作者等信息。

4.7 复苏

冻存的细胞若需培养，超净工作台应将细胞悬液与预热培养基混匀后离心弃上清，然后用培养基重悬细胞沉淀至适宜生长密度后进行培养。

4.8 其他

4.8.1 对于培养的细胞，应对细胞进行鉴别和对细胞中细菌、真菌、支原体等进行检测，并根据需要，对纯度、生物学特性、功能特性、病毒和内毒素等指标进行检测。

4.8.2 培养操作完成后，需要移除的物品应移出超净工作台/生物安全柜。

4.8.3 应使用适宜的消毒剂进行消毒，如用75%乙醇擦拭超净工作台/生物安全柜台面后紫外灭菌。

4.8.4 废物分类放入专用容器中按照废物类别进行相应处理。

5 证实方法

5.1 细胞纯度宜按照GB/T 39729进行检测。

5.2 细胞无菌宜按照GB/T 40365进行检测。

5.3 应定期对洁净室及受控环境进行检查。

5.4 记录并保持以下信息：

a) 操作者；

b) 操作时间；

c) 清洁时间。

参 考 文 献

[1] GB/T 39729 细胞纯度测定通用要求 流式细胞测定法
[2] GB/T 40365 细胞无菌检测通则