



中国认可
国际互认
检测
TESTING
CNAS L2954

苏州大学 卫生与环境技术研究所 最终报告

报告编号: SDWH-M202400909-1

参照 ISO 10993-5: 2009 方法进行
一次性透气式细胞培养瓶的细胞毒性试验
MTT 法
含 10%胎牛血清的 MEM 浸提液

委托单位

碳基生命科技（广州）有限公司
制造商

碳基生命科技（广州）有限公司

苏州大学卫生与环境技术研究所

电话: 0512-65880038 传真: 0512-65880034 电子邮箱: sudaweihuan@mail.suda.edu.cn
地址: 中国苏州工业园区仁爱路 199 号 邮编: 215123 http://yxbfzb.suda.edu.cn

目 录

目 录.....2

检测报告说明.....3

试验确认与签名.....4

 1.0 摘 要.....5

 2.0 目 的.....5

 3.0 参考标准.....5

 4.0 执行规范.....5

 5.0 对照和试验样品确定.....5

 6.0 试验系统鉴别.....6

 7.0 试验系统确认.....6

 8.0 给药途径确认.....6

 9.0 试验设计.....6

 9.1 试验和对照样品制备.....6

 9.2 仪器设备.....7

 9.3 试剂.....7

 9.4 试验方法.....7

 9.5 细胞形态结果.....7

 9.6 细胞活力结果.....8

 9.7 统计方法.....8

 9.8 评价标准.....8

 9.9 结 论.....8

 10.0 记录存储.....8

 11.0 保密协议.....8

 12.0 试验偏离声明.....8

检测报告说明

- 一、对本报告有异议者，请于收到报告之日起十五天内提出复核申请。
- 二、检测报告涂改或无检测专用章无效。
- 三、检测报告无编制人、审核人及检测报告签发人签字无效。
- 四、送样委托检验，本检验机构仅对来样负责。
- 五、未经本检验机构同意，不得部分复制本报告。

1.0 摘要

试验样品浸提液与生长旺盛的 L929 细胞培养 (37℃, 5% CO₂) 24h 后, 观察细胞形态, 细胞裂解情况, 采用 MTT 法测定供试品的潜在细胞毒性。结果显示 100% 样品浸提液的细胞活力为 83.6%, 对照组结果显示本次试验结果有效。

在本次试验条件下, 样品一次性透气式细胞培养瓶浸提液对 L929 细胞无潜在毒性影响。

2.0 目的

该试验目的是为了评价试验样品对 L929 哺乳动物成纤维细胞的生物学反应。该测试是根据样品浸提液而设计的。

3.0 参考标准

医疗器械的生物学评价-第 5 部分: 细胞毒性测试-体外法 ISO 10993-5: 2009

医疗器械的生物学评价-第 12 部分: 样品制备和参照样品 ISO 10993-12: 2012

4.0 执行规范

ISO/IEC 17025:2005《检测和校准实验室能力的通用要求》CNAS-CL01 检测和校准实验室能力认可准则 (中国合格评定国家认可委员会实验室认可证书 No.CNAS L2954)

实验室资质认定评审准则 (江苏省质量技术监督局资质认定计量认证证书 CMA 151000100270)

5.0 对照和试验样品确定

- 5.1 试验样品名称: 一次性透气式细胞培养瓶
来样原始状态: 已灭菌, Gamma 辐照灭菌
CAS 编号: 未提供
规格: 50ml
型号: 未提供
批号: 03012024
性状: 固体
颜色: 未提供
密度: 未提供
稳定性: 未提供
溶解度: 未提供
保存条件: 室温
样品材料: PS
包装材质: 未提供
以上试验样品信息是由样品委托单位提供。
浸提液: 含 10% 胎牛血清的 MEM 培养液

5.2 阴性对照

名称: 高密度聚乙烯
制造商: 美国药典委员会
规格: 3 片装
批号: KOM357

性状：固体
颜色：白色
稳定性：室温下稳定
保存条件：室温
浸提液：含 10%胎牛血清的 MEM 培养液

- 5.3 阳性对照样品名称：Zinc diethyldithiocarbamate
制造商：Sigma
规格：25g
批号：MKBD516V
浓度：1%
溶剂：10%胎牛血清的 MEM 培养液
配制日期：2024-04-17
性状：固体
颜色：白色
保存条件：4 ± 2 °C
- 5.4 空白对照样品名称：含 10%胎牛血清的 MEM 培养液
配制日期：2024-04-17
性状：液体
颜色：粉红色
保存条件：4 ± 2 °C

6.0 试验系统鉴别

该试验用小鼠成纤维细胞 L929,细胞系来自美国菌种保存中心。

7.0 试验系统确认

小鼠成纤维细胞 L929 用来检测细胞毒性试验是因为其对试验样品浸提液反应灵敏。

8.0 给药途径确认

试验样品通过浸提液（用一种与试验系统相容的载体浸提）与试验系统接触，被认为是最佳给药途径，也是为标准推荐的。

9.0 试验设计

9.1 试验和对照样品制备

无菌操作按下表的比例（样品：浸提液体积）用含 10%胎牛血清的 MEM 培养液浸提样品，于 37℃浸提 24 小时。浸提前后浸提液状态未发生改变。浸提液立即用于实验。浸提液 pH 值未经调整，未经过滤，离心，稀释等处理过程。

无菌操作取样		惰性容器内 无菌浸提			最终浸提液	
取样方式	实际取样	取样比例	浸提液	条件	pH	是否澄清
整取	18.3g	0.2g : 1ml	91.5ml	37℃，24h	7.4	澄清

同法制备空白对照、阴性对照样品和阳性对照样品。

9.2 仪器设备

高压灭菌器 (SDWH030) 校正有效期 (2024-05-24) ;
CO₂ 培养箱 (SDWH021) 校正有效期 (2024-09-17) ;
恒温摇床 (SDWH2109) 校正有效期 (2024-11-23) ;
倒置显微镜 (SDWH037) 校正有效期 (2024-09-22) ;
钢直尺 (SDWH463) 校正有效期 (2024-09-12) ;
电子天平 (SDWH056) 校正有效期 (2024-02-13) ;
超净工作台 (SDWH454) 校正有效期 (2024-09-17) ;
酶联免疫检测仪 (SDWH312) 校正有效期 (2024-09-20) 。

9.3 试剂

MTT(3- (4, 5-二甲基噻唑-2) -2, 5-二苯基四氮唑溴盐) (SIGMA, 批号: MKBX0151V) ;
胎牛血清 (CORNING, 批号: 35076116) ;
胰酶 (GiBco, 批号: 1786548) ;
青霉素链霉素 (GiBco, 批号: 1665735) ;
MEM (GiBco, 批号: 8117022) ;
异丙醇 (江苏强盛功能化学股份有限公司, 批号: 20240206) 。

9.4 试验方法

试验过程无菌操作;

将 L929 细胞培养在含 10%胎牛血清和抗生素(青霉素 100 U/ml,链霉素 100 µg/ml)的 MEM 培养液中, 置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。用 0.25%胰酶(含 EDTA) 消化细胞制备成单细胞悬液, 细胞悬液离心 (200g, 3min) , 然后将细胞重新分散于培养基中, 调整细胞密度为 1×10⁵ 个/ml 的细胞悬液;

接种上述细胞悬液到 1 个 96 孔培养板中, 每孔 100 µL, 置 37℃培养箱中 (5% CO₂, 37℃, >90%湿度) 培养 24 小时;

待细胞长成单层后, 吸出原来的培养液, 分别加入 100 µl 不同浓度的试验样品浸提液 (100%、75%、50%、25%)、空白对照液、阳性对照 (100%) 和阴性对照液 (100%) , 37℃, 5% CO₂ 培养 24 小时。每组做 5 个平行样;

培养 24h 后, 取出 96 孔板先做细胞形态学观察, 然后吸出原来的培养液, 每孔加 50µl MTT (1mg/ml), 培养 2 小时, 吸弃上清, 加 100µl 99.9%纯度的异丙醇溶解结晶;

在酶标仪上以 570nm 为主吸收波长, 650nm 为参考波长测定吸光度值。

9.5 细胞形态结果

表 1 细胞形态学观察

组别	接种细胞前	加浸提液前	加浸提液 24h 后
空白对照	个别细胞有颗粒, 细胞无裂解, 生长状态良好。	个别细胞有颗粒, 细胞无裂解, 生长状态良好。	个别细胞有颗粒, 细胞无裂解, 生长状态良好。
阴性对照			个别细胞有颗粒, 细胞无裂解, 生长状态良好。
阳性对照			细胞裂解死亡。
100%样品浸提液			个别细胞有颗粒, 细胞无裂解, 生长状态良好。
75%样品浸提液			个别细胞有颗粒, 细胞无裂解, 生长状态良好。
50%样品浸提液			个别细胞有颗粒, 细胞无裂解, 生长状态良好。
25%样品浸提液			个别细胞有颗粒, 细胞无裂解, 生长状态良好。

9.6 细胞活力结果

表 2 细胞活力%

组别	Mean±SD	细胞活力%
空白对照	0.8028±0.043	100.0%
阴性对照	0.7482±0.004	93.2%
阳性对照	0.0098±0.001	1.2%
100%样品浸提液	0.6712±0.045	83.6%
75%样品浸提液	0.6898±0.040	85.9%
50%样品浸提液	0.6956±0.046	86.6%
25%样品浸提液	0.7040±0.017	87.7%

9.7 统计方法

均数±标准差 (Mean±SD)

细胞活力%=试验（或阳性及阴性）样品组[$\overline{OD_{570}-OD_{650}}$]/空白对照组[$\overline{OD_{570}-OD_{650}}$]×100%.

9.8 评价标准

50%的样品浸提液至少和 100%的细胞活力相同或者比 100%的细胞活力更高，否则应该重复试验。
细胞活力%越低，潜在的细胞毒性越大；
细胞活力<空白组 70%，说明样品具有潜在的细胞毒性；
100%试验样品浸提液的细胞活力%为最终结果。

9.9 结 论

在本次试验条件下，样品一次性透气式细胞培养瓶浸提液对 L929 细胞无潜在毒性影响。

10.0 记录存储

所有与本次试验有关的原始数据和记录都被保存在指定的 SDWH 档案文件中。

11.0 保密协议

签订检测委托合同即认为双方接受保密协议。

12.0 试验偏离声明

本次试验严格按照方案执行，未发生影响实验数据有效性的偏离。

