ICS 点击此处添加 ICS 号
CCS 点击此处添加 CCS 号

T/C9

团 体 标 准

T/XXX XXXX—XXXX

免疫磁珠法富集技术规范

Technical specification for enrichment of Immunomagnetic beads method

（征求意见稿）

V 1.22

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。

2022－XX－XX 发布　　2022－XX－XX 实施

中国出入境检验检疫协会　　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。

本文件由北京国科融智生物技术有限公司提出。

本文件由中国出入境检验检疫协会检疫处理与生物安全标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：北京国科融智生物技术有限公司、中国海关科学技术研究中心、中国疾病预防控制中心、中国检验认证集团研究院、中国华夏展安（北京）科技有限公司、北京出入境检验检疫协会、深圳华大智造科技股份有限公司、南京金斯瑞生物科技有限公司、通州区疾病预防控制中心、昌平区中心医院、黑龙江国际旅行卫生保健中心、黑河海关综合技术中心、深圳市坪山区妇幼保健院、北京大学第一医院、国家电网公司北京电力医院、南宫市中医院、北京中科基因技术股份有限公司、洛阳普泰生物技术有限公司。

本文件主要起草人：张金菊、万康林、汪涛、蒙青林、刘海灿、李桂莲、许达、李马超、田洁、王震、李毅、吴浩然、王凤君、赵文吉、余进文、侯晓丹、程成、焦丹、杨娟、王茫桔、胥俊越、张祎、原霖、彭伍平。

本规范具体条款的级别用语有*必须（must）*、*应当(should be)*、*可以（may）*、*禁止(must not)*，在本规范中皆为斜体字表示。

必须：指强制条款，如果不满足要求，相应的产品或操作被视为不合格，不能被接受。

应当：推荐的要求，符合该技术要求是被推荐的、可能为当前最佳的。

可以：虽然不是最佳，但被允许的要求。

禁止：强制性的排除性要求。若违反，不仅会被视为不合格产品，甚至会被认为是违法产品。

本文件版权归中国出入境检验检疫协会所有。任何单位或个人未经许可不得以营利为目的印制、出版、翻译、转发或复制全文或部分文字。

免疫磁珠法富集技术规范

1 范围

1.1 技术范围

本文件规定了免疫磁珠的要求、特性、尺寸，目标物样本的要求，免疫磁珠法富集所需要的设备、材料、缓冲液和试剂和产品输出形态；

本文件描述了免疫磁珠法富集的方法、流程。

1.2 应用领域

本文件适用于展馆、进出口货物、畜牧业等环境、人员、牲畜等来源，或其他具有特异性的有机分子等待测的痕量组分（富集目标物，简称“目标物”）的采样，以及其它可采用免疫磁珠富集方法的领域。

1.3 富集目的

富集的目的及应用可分为：

(1) 提升低载量目标物的检测灵敏度。应用于此目的时，采集的样本一般为单点来源，不采用混检。从每个原始样本中提取的样本量*禁止*低于核酸提取样本量的5倍。单拭子采样管3mL保存液，常规提取200μL样本量用于核酸提取，使用免疫磁珠富集方法时提取的样本量*禁止*低于1mL。

(2) 降低成本及提升检测效率。应用于此目的时，采样的样本为单采或混采的样本，将多个原始样本混合后，进行富集，然后再交其他后续检测流程。从每个原始样本中提取的样本量*禁止*低于折算为单采时的核酸提取样本量的2倍。

不同采样管样本富集时最低样本量

采样管类型	保存液容量(mL)	常规核酸最取样本量(μL)	富集最低样本量(μL)
单拭子采样管	3	200	800
5 拭子采样管	3	200	800
10 拭子采样管	6	200	1000
20 拭子采样管	12	200	1600

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 9969 工业产品使用说明书 总则

GB 4789.36 食品微生物学检验 大肠埃希菌O157：H7/NM检验

GB/T 40268—2021 免疫磁性材料性能检测方法

GB/T 29022 粒度分析动态光散射法（DLS）

YY/T 0242 医用输液、输血、注射器具用聚丙烯专用料

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3．1 **富集（Enrichment）**

指使用一定的方法将目标物从大量样本物质中提取出来，集中到一个较小体积的溶液中，同时通过特异性的技术去除目标物以外的其他杂质，以提高目标物的检测灵敏度。

3．2 **免疫磁珠（immunomagnetic beads）与富集磁珠（Enriched magnetic beads）**

免疫磁珠为表面固定有抗体或抗原等生物活性分子,在一定条件下，能够与目标物特异性结合的一类具有超顺磁性的生物纳米微球复合材料。

当免疫磁珠被用于富集目的，即称为富集磁珠。

在本标准中，富集磁珠*应当*以生物源性纳米晶体磁珠（BNCM，Biogenic NanoCrystalline Magnetic beads）为基础，即由生物合成方式产生的磁性纳米颗粒，其表面自带有生物质膜及自表达的生物活性分子如蛋白、纳米抗体、多肽等，以及在此基础上进一步偶联不同生物活性分子（如抗体、蛋白）。

3.3 **免疫磁珠法富集(Enrichment with immunomagnetic beads method)**

以免疫磁珠为基础实现富集的方法。

3.4 **免疫磁珠富集试剂（Immunomagnetic bead enrichment reagent）**

简称“**富集试剂**”（Enrichment reagent），用于免疫磁珠法富集的磁珠悬液。富集试剂中的磁珠含量标称单位为mg/ml，采用湿重法进行测量。参考方法为：提取1ml富集试剂，磁吸2min，吸去上清，尽量不触碰磁珠，用天平测量磁珠的质量(mg)。平行重复测量5次，取平均值除以1ml，结果即可作为富集试剂中的富集磁珠含量。如果要获得更为精确的测量值，可以加大测量样本的容量，如提取5ml或10ml富集试剂进行上述测量。

富集磁珠含量*应当*为5mg/ml。

3.5 **保存液**（Preservation solution）

用于保存从检测对象获取的目标物的溶液。

4 裸磁珠及免疫磁珠要求

4.1 **粒径（Grain size）**

未包被其他物质的裸磁珠粒径*应当*为20nm至100nm。*可以*为100nm-300nm。裸磁珠粒径测量方法符合GB/T 29022 粒度分析动态光散射法（DLS）规定。

4.2 **磁珠形态（Shape of magnetic beads）**

裸磁珠形态*应当*为规则晶体形状或球体。

4.3 **磁珠材料(Magnetic bead material)**

裸磁珠的材料*应当*为 Fe_3O_4 晶体。针对特定的需要富集的目标物，选择具有特异性的抗体偶联在磁珠上，用于富集过程。

4.4 **目标物捕获率（Capture efficiency for targets）**

经过富集试剂特异性结合的目标物占样本中目标物总量的百分比，单位为%。富集试剂产品的目标物捕获率*应当*在最低检测限时>70%。

4.5 **捕获特异性（Capture specificity）**

富集试剂仅结合、捕获目标物，而不与非目标物结合的能力。单位为%。

4.6 **捕获率稳定性（Stability of capture efficiency）**

富集试剂在规定的储存条件，以及按本规范操作方法进行富集的条件下，保持原捕获率的能力。单位为%。

5 目标物样本要求

5.1 样本形态

对目标物富集的样本*必须*为液相，目标物在保存液中以游离状态存在。

5.2 样本的保存液

样本的保存液分为非灭活型与灭活型。保存样本的容器材料满足YY/T 0242 医用输液、输血、注射器具用聚丙烯专用料的规定。

5.3 灭活型保存液特殊要求

灭活型保存液有如下要求：

(1) *必须*确保不会改变目标物抗原靶点。

(2) *必须*能够保持目标物（生命体）的完整性，比如不因为灭活而导致目标物结构破坏释放核酸从而影响目标物富集后的核酸检测。

5.4 用于富集时的样本容量

用于富集时的样本容量*应当*为1mL，2mL，5mL，7 mL，10 mL。

*可以*根据特殊需要选择其他容量。

5.5 目标物样本来源

目标物的来源包括但不限于：

展馆、商场、剧院等人群密集环境表面及空气中气溶胶的采样。

参展人员等密集人群口咽拭子采样。

海关进口货物、动植物产品等采样。

市场中的食物及环境等的采样。

社区人员口咽拭子采样。

养殖场环境采样。

养殖场牲畜拭子采样。

其他。

6 富集的实验条件

6.1 富集所用的设备和材料

漩涡混匀仪

振荡反应器

微量移液器（100μL，1mL）

无菌吸管

均质器或研磨仪

恒温水浴箱

金属浴反应器

离心管架，磁力架或磁板、磁板架

离心管（1.5mL，2mL，5mL，10mL，15mL）

能满足免疫磁珠法富集基本所需的设备和耗材即可，不限于上述。

6.2 富集所用缓冲液和试剂

PBS 缓冲液

TBS 缓冲液

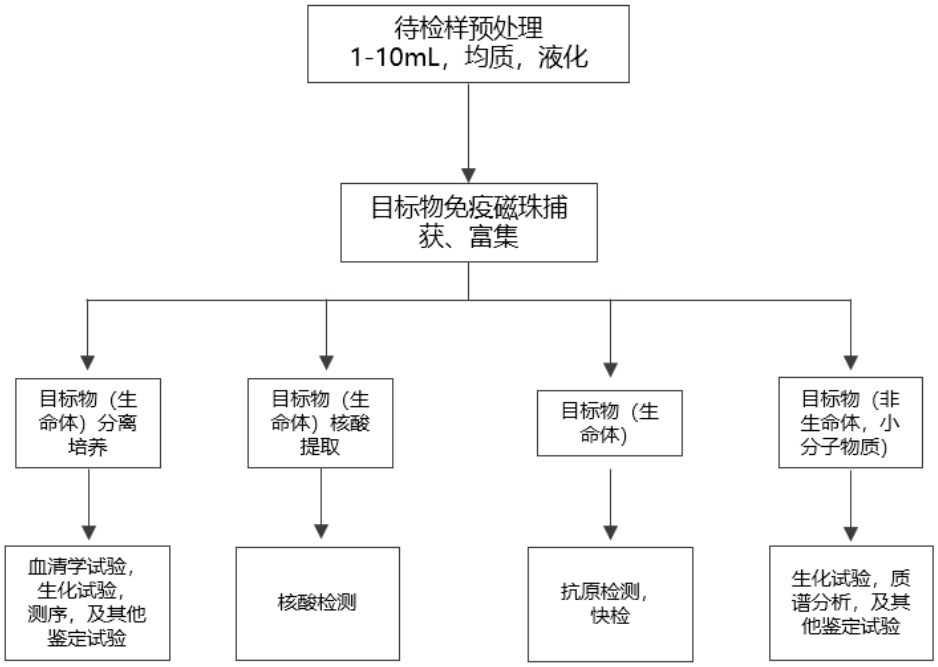
PBST 洗液/PBS-Tween20

TBST 洗液/TBS-Tween20

富集试剂

7 富集程序

目标物免疫磁珠法富集程序见下图



富集后的产物*可以*根据后续试验需求分为洗脱分离和不洗脱分离两种。

8 操作步骤

8.1 待检样本应为均匀的液体，其中包含有游离的目标物。不合适的样本应该经过简单预处理，如均质，液化，裂解细胞等方式将目标物充分释放到液体中。

8.2 目标物富集

8.2.1 应按照磁珠生产商提供的使用说明进行目标物的富集。当生产商的使用说明与下面的描述可能有偏差时，按使用说明进行。

8.2.2 取适合的离心管按样品进行编号，分别加入适量的样品。在漩涡混合器上轻轻振荡生物纳米磁珠试剂悬液，根据样品量加入的富集试剂。

不同样本容量对应的富集试剂推荐容量

样本容量（mL）	富集试剂推荐容量(μL)
1	50
2	70
5	100
7	150
10	200

8.2.3 结合：在室温或者 30℃～37℃条件下，将离心管及管架放在样品混合器上振荡，或者手动轻微混匀样本，10 min～30 min，使目标物与富集试剂中富集磁珠充分接触结合。

8.2.4 磁吸：将离心管短暂离心，将管盖的残留液体甩到管中，将离心管插入适合的磁力架孔中，轻微倾斜磁力架，确保溶液中的磁珠全部被磁力吸附，形成明显可见的富集磁珠吸附聚集物。

8.2.5 吸取上清液：用吸管或移液器，从富集磁珠聚集物的对侧轻轻吸走上清液，尽量避免吸走富集磁珠。根据不同试验的需求，可全部吸取上清，或者保留适量的上清重悬富集磁珠后直接用于后续试验（比如富集浓缩后直接用于核酸提取）

8.2.6 洗涤：根据不同试验要求，如目标物分离培养，则 8.2.5 步骤完全吸取上清后，加入适量的 PBST 或 TBST 洗液重悬富集磁珠洗涤 1-2 次，去除非特异性吸附的物质。重复步骤 8.2.4 ～8.2.6。

8.2.7 富集磁珠重悬、洗脱或解吸附：根据后续试验需要，富集了目标物的富集磁珠可通过洗脱或解吸附，将目标物释放到相应的溶液中，获得比较纯的目标物样本。

8.3 目标物（生命体）富集后的分离培养

免疫磁珠法富集后的目标物，如用于分离培养，应根据其特性选择相应的分离培养方式。

8.4 目标物（生命体）富集后的核酸提取与检测

免疫磁珠法富集后的目标物，如用于后续核酸扩增检测，如荧光PCR，可选择将免疫磁珠法富集后的不洗脱分离悬液直接作为样本，直接进行后续核酸提取，核酸扩增检测。

8.5 目标物（生命体）富集后的快速检测

免疫磁珠法富集后的目标物，如直接用于目标物快速检测，如抗原检测，可选择将富集磁珠上的目标物快速裂解以释放其各种抗原，同时应选择检测灵敏度足够的快检技术，并确保富集的目标物数量达到或超出检出限以提高检测准确性。

8.6 目标物（非生命体）富集后的检测

免疫磁珠法富集后的目标物，比如小分子物质、毒素、代谢物质等非生命体，应选择适当的检测方式进行分析鉴定，应根据后续检测试验要求确定免疫磁珠法富集后的目标物如何洗脱或解吸附。

9 富集效果评价

富集效果评价应使用与试剂盒声称适用的样品一致或接近的标准物质。当没有标准物质时，可使用足够均匀的，与试剂盒声称适用的样品一致或接近的样品。

9.1 富集效率

对于目标物浓度在检出限附近的样本，免疫磁珠法富集后的目标物浓度*应当*比原样本高4倍以上。比如低载量的目标物核酸检测，原样本荧光PCR检测无检出或Ct值≥35，经富集后的样本荧光PCR的Ct值*必须*比原来的小2个或以上。

9.2 富集后目标物完整性以及生物活性

经免疫磁珠富集处理后的目标物，在后续检测之前，其完整性以及生物活性不应发生显著变化，并影响其后续检测应用。

例，病毒样本经免疫磁珠法富集，如用于分离培养，其感染活性应为富集前病毒感染活性 70%以上。

参 考 文 献

联防联控机制医疗发〔2020〕277号：新冠病毒核酸筛查稀释混样检测技术指引
联防联控机制医疗发〔2020〕352号：新冠病毒核酸10合1混采检测技术规范