

## PBMC 悬液中细菌内毒素检测方法的建立

李思梦, 张晓博, 王元元, 韩东雷, 韩忠阳, 徐增辉\*

(河南细胞治疗集团有限公司, 郑州 450000)

**摘要** **目的:** 建立定量检测人外周血单个核细胞(PBMC)悬液中细菌内毒素的方法, 并验证检测方法的可行性。**方法:** 参考 2020 年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)三部《通则 1143 细菌内毒素检查法》及 USP<1085 细菌内毒素检查法应用指导原则>, 从标准曲线可靠性验证、供试品干扰初筛试验 2 个方面, 初步建立 PBMC 样本细菌内毒素含量的检测方法, 并用此方法对 3 批 PBMC 悬液样品的细菌内毒素进行定量检测。**结果:** 在标准曲线可靠性验证中, 得到线性回归方程:  $\lg t = 2.9109 - 0.3001 \lg C$ ,  $r = -0.9998$ , 阴性对照的  $t > 3600$  s, 平行管  $t$  的 RSD 均小于 3%, 表明标准曲线建立成功; 干扰初筛试验结果显示, PBMC 悬液在 10 倍稀释时对鲎试剂检测有干扰作用, 在 80 倍稀释时回收率接近 100%, 表明 80 倍为最佳干扰稀释倍数; 3 批供试品的试验结果显示, 在 80 倍稀释下, 其内毒素含量均小于限值  $1.0 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , RSD 均  $\leq 10\%$ , 阳性回收率在 80.8%~100.3%, 符合 2020 年版《中国药典》的规定。**结论:** 本方法能有效定量检测 PBMC 悬液中细菌内毒素的含量。

**关键词:** 人外周血单个核细胞(PBMC)悬液; 细菌内毒素; 动态显色法; 《中华人民共和国药典》; 干扰初筛试验; 定量检测

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2024)08-1400-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2023-0613

## Establishment of bacterial endotoxin detection method for PBMC suspension

LI Si-meng, ZHANG Xiao-bo, WANG Yuan-yuan,  
HAN Dong-lei, HAN Zhong-yang, XU Zeng-hui\*

(Henan Cell Therapy Group Co., Ltd, Zhengzhou 450000, China)

**Abstract** **Objective:** To establish a method for the quantitative detection of bacterial endotoxins in human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) suspensions and to validate the feasibility of the detection method. **Methods:** According to the standards for photometric determination of bacterial endotoxin in General Notice 1143 of Chinese Pharmacopoeia (ChP) part III (2020 edition) and 1085 of USP. A preliminary detection method of bacterial endotoxin content in PBMC suspension was established from standard curve reliability verification and primary interferential screening test. Bacterial endotoxins in three batches of PBMC suspensions were quantitatively detected by this method. **Results:** In the establishment of standard curve and reliability verification test, the linear regression equation was  $\lg t = 2.9109 - 0.3001 \lg C$ ,  $r = -0.9998$ , negative control  $t > 3600$  s, repeated reaction tube RSDs were less than 3%, the standard curve was established successfully. The results of the primary

\* 通信作者 Tel: (0371) 85960000; E-mail: zenghuixu@163.com

第一作者 Tel: (0371) 85960000; E-mail: lism@shcell.com

interferential screening test showed that the PBMC suspension had interference on limulus test at the dilution ratio of 10 and the recovery rate was close to 100% at the dilution ratio of 80, indicating that 80-fold was the best interference dilution ratio without interference. The results of the three batches of samples showed that the endotoxin contents were all less than  $1.0 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$  at the dilution ratio of 80, and the RSDs were less than 10%. The positive recoveries were 80.8%–100.3%, which complied with ChP 2020. **Conclusion:** This method can quickly and quantitatively detect the content of endotoxin in PBMC suspension.

**Keywords:** PBMC suspension; bacterial endotoxin; kinetic chromogenic assay; Chinese Pharmacopoeia; primary interferential screening test; quantitative detection

人外周血单个核细胞(PBMC)来源于骨髓中的造血干细胞,主要包括淋巴细胞(T细胞、B细胞和自然杀伤细胞)和单核细胞<sup>[1]</sup>。PBMC是外周免疫系统的关键组成成分,可作为基础原料进行研究,在免疫学、传染病、恶性肿瘤、疫苗研发、移植治疗、个性化医学和毒理学等领域均发挥着重要作用<sup>[2-3]</sup>。作为重要生物资源,我国专门建立了针对乙肝和艾滋病患者群体的PBMC生物库,用于研究病毒性传染病的治疗<sup>[4]</sup>,美国Novartis制药公司以PBMC为原材料进行嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)悬液的制备,用于治疗急性淋巴细胞白血病<sup>[5]</sup>。

细菌内毒素是革兰阴性菌细胞壁的组分之一,属于高分子量脂多糖(LPS)复合物,由O抗原、核心多糖和类脂A组成,当细菌死亡或自溶后便会释放出内毒素<sup>[6]</sup>。细菌内毒素具有极强的耐热性,需要在 $250 \text{ }^\circ\text{C}$ 干热30 min以上才能彻底灭活,且具有分子极性,典型的内毒素分子以 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 的聚合物形式存在。细菌内毒素普遍存在于自然界中,是最常见的热原,当一定量的细菌内毒素进入血液后,会引起机体的发热反应<sup>[7]</sup>。免疫细胞存储是细胞治疗行业最基础、最前端的产业模块,原材料主要来自于健康人外周血和分离后的白细胞,在淋巴细胞分离液的作用下通过密度梯度离心法去除血浆、红细胞和粒细胞,吸取白膜层部分的PBMC物质,添加冻存液后可进行免疫细胞存储<sup>[8-9]</sup>。基于PBMC悬液制备的原材料及工艺分析,细菌内毒素污染主要来自于人员操作过程和环境污染,医药工业界认为,在GMP条件下控制内毒素就等于控制了热原污染。国家药品监督管理局颁布的《细胞治疗产品研究与评价技术指导原则》提出,细胞治疗产品质量控制应考虑细菌内毒素;深圳市市场监

督管理局颁布的《人类血液来源免疫细胞库建设与管理规范》中,明确要求对PBMC样品进行细菌内毒素检测;USP <1046 细胞及基因治疗产品>章节中,也要求对PBMC产品进行细菌内毒素的检测。

细菌内毒素的检测一般采用鲎试剂检查法,鲎试剂检查法可分为凝胶法、浊度法和显色法<sup>[10]</sup>,显色法又可以分为动态显色法和终点显色法,动态显色法检测原理是细菌内毒素激活鲎试剂中的C因子,引起一系列酶促反应,促使凝固酶的合成,凝固酶水解显色基质,产生黄色的对硝基苯胺,用动态光度仪分析反应溶液的光度变化,可以定量测定溶液中的内毒素含量<sup>[11-12]</sup>。PBMC作为CAR-T产品、疫苗研究的重要原辅料<sup>[13]</sup>,建立符合《中国药典》的PBMC悬液细菌内毒素检测方法已迫在眉睫。本研究建立了PBMC悬液细菌内毒素含量的定量检测方法,以评估PBMC潜在的内毒素污染风险,为PBMC样品的超低温冷冻存储提供参考依据和技术支持。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Robot 100 全自动细菌内毒素检测系统(湛江安度斯生物有限公司),Multiskan ET 微孔板光度计(赛默飞世尔(上海)仪器有限公司),X-1000XLS 移液器(湛江安度斯生物有限公司),Vortex-2 旋涡混匀仪(上海沪析实业有限公司)。

### 1.2 试剂

鲎试剂(TAL):批号 2112220,规格  $0.35 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$ ;细菌内毒素标准品(CSE):批号 2112071,规格  $10 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;细菌内毒素检查用水(BET水):批号 2202150,规格  $100 \text{ mL} \cdot \text{瓶}^{-1}$ ;细菌内毒素检查 96 孔反应板;除热原试剂管:批号 2205310,规格  $10 \text{ 支} \cdot \text{盒}^{-1}$ ;除热原稀释试管:批号 2206222,规格  $10 \text{ 支} \cdot$

盒<sup>-1</sup>;无热源吸头:批号 2211,规格 96 支·盒<sup>-1</sup>,以上试剂耗材均来自于湛江安度斯生物有限公司。PBMC 悬液样品 A1、A2、A3(批号 SP021040、SP016793、SP016788),均来自于河南细胞治疗集团有限公司。

## 2 方法和结果

### 2.1 内毒素限值的确定

细菌内毒素限值( $L$ )一般按以下公式确定: $L = K/M$ ( $K$ 为人每 1 kg 体质量每 1 h 最大可接受的内毒素剂量, $M$ 为人每 1 kg 体质量每 1 h 的最大供试品剂量)。PBMC 悬液属于种子细胞产品,不直接应用于人体,PBMC 种子细胞经过复苏培养后再进行细胞治疗的相关应用,药典中没有明确对 PBMC 产品细菌内毒素限值进行规定。基于细菌内毒素限值的计算方式,同时参考上市细胞治疗产品质量标准,设供试品的细菌内毒素限值为不得超过 1.0 EU·mL<sup>-1</sup>。

### 2.2 标准曲线可靠性试验方法和结果

#### 2.2.1 标准品稀释液的配制 按照厂家提供的效

价分析报告书(CoA)确定标准品的效价和复溶体积,如 CoA 标示 CSE 的效价为 10 EU·支<sup>-1</sup>,需加入 BET 水 1 mL 复溶,复溶混匀后可得到 10 EU·mL<sup>-1</sup>的标准内毒素溶液。用 BET 水稀释复融后的 10 EU·mL<sup>-1</sup>的标准内毒素溶液,得到终浓度分别为 1.0、0.1、0.01 EU·mL<sup>-1</sup>的标准品稀释液,分别标记为  $E_{1.0}$ 、 $E_{0.1}$ 、 $E_{0.01}$ 。

**2.2.2 鲎试剂处理** 取 1 支鲎试剂,加入 BET 水 0.35 mL,静置放置,液体澄清后用移液器将复融后的鲎试剂转移至除热原试剂管中。

**2.2.3 加样及检测** 将复溶后的标准品 1 mL、鲎试剂 0.6 mL 及 BET 水、除热原稀释试管、无热源吸头、细菌内毒素检查 96 孔反应板,放置于全自动细菌内毒素检测系统指定位置,按表 1 设置 96 孔反应板加样位置,打开生物探针软件进入数据采集界面,设置仪器波长为 405 nm,预设吸收度值为 0.1。在操作软件中设置试验参数,试验方法选择动态显色法,采样时间为 90 min,输入鲎试剂、标准品、BET 水批号及有效期。

表 1 96 孔板加样模板示意图

Tab. 1 Schematic diagram of 96 - well plate loading template

96 孔板横排序号 (horizontal serial number of 96 - well plate)	96 孔板竖列序号(vertical serial number of 96 - well plate)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	★	★	★								
B	○	★	★	★								
C		★	★	★								
D												
E												
F												
G												
H												

注(note):○. 阴性对照(negative control);★. 标准品(standard substance)

根据鲎试剂使用说明书对光度测定法的规定:阴性对照的反应时间大于标准曲线最低浓度的反应时间,反应重复管的变异系数 RSD% ≤ 20%,且根据 2020 年版《中国药典》三部 <通则 1143 细菌内毒素检查法>,根据线性回归分析,标准曲线的相关系数( $r$ )的绝对值应 ≥ 0.980,试验方为有效,否则须重新试验。

#### 2.2.4 标准曲线可靠性试验结果 根据检测数据,

将标准曲线进行线性回归,以反应时间( $t$ )的对数( $\lg t$ )为纵坐标,以细菌内毒素标准品浓度的对数( $\lg C$ )为横坐标,绘制标准曲线,得到线性回归方程: $\lg t = 2.9109 - 0.3001 \lg C$   $r = -0.9998$

$|r| > 0.980$ ,阴性对照的  $t > 3600$  s(标准曲线最低点平均反应的  $t$  为 3269.7 s),反应重复管的 RSD 均 ≤ 20%。可见,标准曲线可靠性试验成立,表明试验有效,结果见表 2。

表 2 标准曲线可靠性试验结果  
Tab. 2 Test results of standard curve reliability

孔位 (hole site)	标准内毒素浓度 (concentration of standard endotoxin)/(EU · mL <sup>-1</sup> )	t/s	RSD/ %	检测值 (detection value)/(EU · mL <sup>-1</sup> )
A1	0(阴性对照)(negative control)	>3 600	0	<0.007 07
B1	0(阴性对照)(negative control)	>3 600		
A2	0.01	3 333	2.1	0.009 74
B2	0.01	3 279		
C2	0.01	3 197		
A3	0.1	1 590	0.66	0.105 37
B3	0.1	1 611		
C3	0.1	1 600		
A4	1	811	1.1	0.974 22
B4	1	825		
C4	1	827		

### 2.3 供试品干扰初筛试验

**2.3.1 内毒素标准溶液的制备** 同“2.2.1”项下方法配制,得到 10 EU · mL<sup>-1</sup>的标准内毒素溶液 E<sub>10</sub>,用 BET 水作为稀释液,得到终浓度分别为 1.0、0.2、0.1、0.01 EU · mL<sup>-1</sup>的标准品稀释液,分别标记为 E<sub>1.0</sub>、E<sub>0.2</sub>、E<sub>0.1</sub>、E<sub>0.01</sub>(下标数字为内毒素浓度,下同)。

**2.3.2 供试品溶液与阳性对照的制备** 用 BET 水作为稀释液,将 PBMC 悬液 A1 分别稀释为 10、20、40 和 80 倍,分别标记为 S<sub>10</sub>、S<sub>20</sub>、S<sub>40</sub>、S<sub>80</sub>(下标数字为供试品的稀释倍数,下同)。分别将各不同稀释倍数的供试品溶液 400 μL 与 400 μL 的 E<sub>0.2</sub> 混匀,得到供试品阳性对照溶液,内毒素终浓度均为 0.1 EU · mL<sup>-1</sup>,分别标记为 S<sub>10</sub>E<sub>0.1</sub>、S<sub>20</sub>E<sub>0.1</sub>、S<sub>40</sub>E<sub>0.1</sub>、S<sub>80</sub>E<sub>0.1</sub>。

**2.3.3 鲎试剂处理** 取鲎试剂 2 支,开启后每支加入 BET 水 0.35 mL 复溶,轻轻摇匀,待溶液澄清后使用。

**2.3.4 供试品干扰初筛试验检测流程与结果** 分别取 E<sub>1.0</sub>、E<sub>0.1</sub>、E<sub>0.01</sub>、S<sub>10</sub>、S<sub>20</sub>、S<sub>40</sub>、S<sub>80</sub>、S<sub>10</sub>E<sub>0.1</sub>、S<sub>20</sub>E<sub>0.1</sub>、S<sub>40</sub>E<sub>0.1</sub>、S<sub>80</sub>E<sub>0.1</sub> 0.025 mL,设置 96 孔反应板加样位置,将制备的溶液加入微孔反应板相应的孔中,每个样本设置 2 个平行,每孔加入复溶后的鲎试剂 0.025 mL,于酶标仪中采集信息 90 min。结果见表 3,回收率符合 2020 年版《中国药典》三部 <通则 1143 细菌内毒素检查法> 规定,PBMC 悬液稀释 10 倍时,样本对细菌内毒素检测存在干扰,稀释

20~80 倍时回收率均在 50%~200%。经分析比较,选择回收率接近 100% 的 80 倍稀释倍数,设为干扰试验的稀释倍数。

### 2.4 供试品干扰试验

**2.4.1 供试品溶液的制备** 取 3 个批号的样品,用 BET 水稀释至 80 倍,分别标记为 A1<sub>80</sub>、A2<sub>80</sub> 和 A3<sub>80</sub>。

**2.4.2 3 批供试品阳性对照溶液的制备** 分别将上述 3 个批号稀释 40 倍的供试品溶液 400 μL 与 E<sub>0.2</sub> 400 μL 混匀,得到供试品阳性对照溶液,分别标记为 B1(A1<sub>80</sub>E<sub>0.1</sub>)、B2(A2<sub>80</sub>E<sub>0.1</sub>) 和 B3(A3<sub>80</sub>E<sub>0.1</sub>);按“2.3.1”项下方法配制标准品稀释液,作为溶液 C;取 BET 水,作为溶液 D。

**2.4.3 供试品干扰试验检测流程与结果** 打开生物探针软件进入数据采集界面,设置仪器波长为 405 nm,预设吸收度值为 0.1,根据微孔反应板设置的反应项目填表。分别取上述制备的 A、B、C、D 溶液 0.025 mL 加入微孔反应板相应的孔中,每项反应平行 2 孔,每孔加入复溶后的鲎试剂 0.025 mL,置微孔反应板于酶标仪中反应 90 min。结果见表 4,采用动态显色法检测 3 批 PBMC 悬液的细菌内毒素含量,阳性对照溶液的回收率均在 80%~101%,平行样品的 RSD 均小于 10%,回收率和 RSD 均符合《中国药典》规定,可认为在此试验条件下,免疫细胞冻存 PBMC 悬液的细菌内毒素送检样本对细菌内毒素检查无干扰,结果均小于规定的限值,判定供试品符合规定。

表 3 PBMC 悬液干扰初筛试验结果

Tab. 3 The results of primary interferential screening test of PBMC suspension

稀释倍数 (dilution multiple)	标准内毒素浓度 (concentration of standard endotoxin)/(EU · mL <sup>-1</sup> )	t/s	RSD/ %	回收率 (recovery)/%	检测值 (detection value)/(EU · mL <sup>-1</sup> )
	0(阴性对照)(negative control)	>3 600	0		<0.007 48
	0(阴性对照)(negative control)	>3 600			
	0.01	3 303	1.0		0.009 63
	0.01	3 351			
	0.1	1 566	0.27		0.107 77
	0.1	1 572			
	1	790	0.62		0.963 27
	1	797			
10 ×		>3 600	0		<0.007 48
10 ×		>3 600			
10 ×	0.1	2 054	6.1	44.4	0.051 92
10 ×	0.1	1 885			
20 ×		>3 600	0.00		<0.007 48
20 ×		>3 600			
20 ×	0.1	1 775	0.12	65.2	0.072 70
20 ×	0.1	1 772			
40 ×		>3 600	0		<0.007 48
40 ×		>3 600			
40 ×	0.1	1 652	0.94	81.9	0.089 40
40 ×	0.1	1 674			
80 ×		>3 600	0		<0.007 48
80 ×		>3 600			
80 ×	0.1	1 597	0.18	94.8	0.102 23
80 ×	0.1	1 593			

### 3 讨论

美国、英国、日本等国药典陆续收录了细菌内毒素的鲎试剂检查法,《中国药典》于 1993 年收录细菌内毒素的鲎试剂检查法<sup>[14]</sup>。相比于热原检查法,鲎试剂检查法更适应现代制药工业的发展,具备快速、灵敏、可标准化的优势<sup>[15-16]</sup>。3 种鲎试剂检测方法(凝胶法、浊度法和显色法)均被 2020 年版《中国药典》收录。

PBMC 在免疫学、传染病治疗发挥着重要作用,同时 PBMC 正逐步扩展到精准医学研究中<sup>[17]</sup>。细菌内毒素作为 PBMC 样本安全性的重要指标之一,如何有效地进行检测至关重要。相比于凝胶法,动态

显色法实现了从肉眼观察到机械化结果判断的转变,用动态光度检测仪检测反应溶液的光度变化,当光度值达到预设值时,仪器自动记录反应时间。动态显色法同时实现了从定性到定量的转变,利用反应时间与标准内毒素浓度关系的标准曲线,计算出供试品的内毒素含量,简化了试验操作过程,加强了数据的完整性要求<sup>[18]</sup>。

本试验通过标准曲线的可靠性、供试品干扰初筛和 3 批供试品的检测,证明了动态显色法定量检测 PBMC 悬液细菌内毒素含量是可行的。试验结果表明动态显色法检测 PBMC 悬液细菌内毒素不仅是可行的,而且具有检测准确性和精密度高,批次检测

表 4 PBMC 悬液干扰试验结果  
Tab. 4 The results of interference tests of PBMC suspension

孔名称 (well name)	稀释倍数 (dilution multiple)	标准内毒素浓度 (concentration of standard endotoxin)/(EU · mL <sup>-1</sup> )	t/s	RSD/ %	回收率 (recovery rate)/%	检测值 (detection value)/ (EU · mL <sup>-1</sup> )	供试品限值 (test product limits)/ (EU · mL <sup>-1</sup> )
阴性对照(negative control)			>3 270	0.00		<0.009 52	
阴性对照(negative control)			>3 270				
标准品稀释液(standard dilution)C		0.01	3 231	0.85		<0.009 71	
标准品稀释液(standard dilution)C		0.01	>3 270				
标准品稀释液(standard dilution)C		0.1	1 543	0.73		0.106 12	
标准品稀释液(standard dilution)C		0.1	1 559				
标准品稀释液(standard dilution)C		1	771	1.99		0.970 75	
标准品稀释液(standard dilution)C		1	793				
样品(sample) - A1	80 ×		>3 270	0.00		<0.009 52	1
样品(sample) - A1	80 ×		>3 270				
样品(sample) - B1	80 ×	0.1	1 628	0.22	80.77	0.090 29	
样品(sample) - B1	80 ×	0.1	1 633				
样品(sample) - A2	80 ×		>3 270	0.00		<0.009 52	1
样品(sample) - A2	80 ×		>3 270				
样品(sample) - B2	80 ×	0.1	1 435	9.17	100.33	0.109 85	
样品(sample) - B2	80 ×	0.1	1 634				
样品(sample) - A3	80 ×		>3 270	0.00		<0.009 52	1
样品(sample) - A3	80 ×		>3 270				
样品(sample) - B3	80 ×	0.1	1 621	0.74	80.94	0.090 46	
样品(sample) - B3	80 ×	0.1	1 638				

量大, 萤试剂用量少, 成本可控, 且符合数据完整性要求等明显优势。

随着技术的发展, 干式恒温仪器逐步取代水浴恒温箱, 酶标板式定量检测仪逐步取代试管式定量检测仪, 萤试剂检查法逐渐趋向自动化操作, 全自动的系统 and 检测专用数据软件也逐步在企业中应用, 考虑到萤资源的有限性, 新型方法和微量技术体现出越来越明显的优势<sup>[19]</sup>。

#### 参考文献

- [ 1 ] LI B, YANG C, JIA G, *et al.* Comprehensive evaluation of the effects of long - term cryopreservation on peripheral blood mononuclear cells using flow cytometry [J]. *BMC Immunol*, 2022, 23 (1) : 30
- [ 2 ] DUCAR C, SMITH D, PINZON C, *et al.* Benefits of a comprehensive quality program for cryopreserved PBMC covering 28 clinical trials sites utilizing an integrated, analytical web - based portal [J]. *J Immunol Methods*, 2014, 409 : 9
- [ 3 ] MELLMAN I, COUKOS G, DRANOFF G. Cancer immunotherapy comes of age [J]. *Nature*, 2011, 480 (7378) : 480
- [ 4 ] SUN J, GAO M, LI K, *et al.* Quality of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells recovered from the hepatitis/AIDS biobank [J]. *Biopreserv Biobank*, 2018, 16(6) : 397
- [ 5 ] TYAGARAJAN S, SCHMITT D, ACKER C, *et al.* Autologous cryopreserved leukapheresis cellular material for chimeric antigen receptor - T cell manufacture [J]. *Cytherapy*, 2019, 21 (12) : 1198
- [ 6 ] ANDERSON WB, SLAWSON RM, MAYFIELD CI. A review of drinking - water - associated endotoxin, including potential routes of human exposure [J]. *Can J Microbiol*, 2002, 48(7) : 567
- [ 7 ] EIN RJ, WOLFF SM, MCADAM KP, *et al.* Properties of reference *Escherichia coli* endotoxin and its phthalylated derivative in humans [J]. *J Infect Dis*, 1981, 144(4) : 329
- [ 8 ] CHEN H, SCHURCH CM, NOBLE K, *et al.* Functional comparison of PBMCs isolated by cell preparation tubes (CPT) *vs.* lym-

- phoprep tubes [J]. *BMC Immunol*, 2020, 21(1):15
- [ 9 ] BRENTIGENS RJ, DAVILA ML, RIVIERE I, *et al.* CD19 - Targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy refractory acute lymphoblastic leukemia [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(177):177
- [10] NALEPKA JL, GREENFIELD EM. Detection of bacterial endotoxin in human tissues [J]. *Biotechniques*, 2004, 37(3): 413
- [11] 李树馥,梁进. 微量动态显色法定量检测3种大输液的细菌内毒素[J]. *中国药师*,2014,17(6):1052
- LI SY, LIANG J. Application of micro - kinetic chromogenic method in endotoxin quantitative detection of three kinds of infusions [J]. *China Pharm*, 2014, 17(6): 1052
- [12] 袁超璐,张思师,陈绎如,等. 动态显色法检测脐带间充质干细胞悬液中细菌内毒素含量[J]. *药物分析杂志*,2022, 42(12): 2110
- YUAN CL, ZHANG SS, CHEN YR, *et al.* Dynamic chromogenic method for detection of bacterial endotoxin content in umbilical cord mesenchymal stem cell suspension [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2022, 42(12): 2110
- [13] SARZOTTI - KELSEY M, NEEDHAM LK, ROUNTREE W, *et al.* The Center for HIV/AIDS Vaccine Immunology ( CHAVI) multi - site quality assurance program for cryopreserved human peripheral blood mononuclear cells [J]. *J Immunol Methods*, 2014, 409: 21
- [14] PETSCH D, DECKWER WD, ANSPACH FB. Proteinase K digestion of proteins improves detection of bacterial endotoxins by the limulus amoebocyte lysate assay: application for endotoxin removal from cationic proteins [J]. *Anal Biochem*, 1998, 259(1): 42
- [15] 陈星,贺利民,刘戎. 细菌内毒素及分析检测方法研究进展[J]. *分析实验室*, 2023,42(9): 1242
- CHEN X, HE LM, LIU R. Progress on detection of bacterial endotoxin [J]. *Anal Lab*, 2023,42(9): 1242
- [16] SHIMIZU T, OBATA T, SONODA H, *et al.* The ability of endotoxin adsorption during a longer duration of direct hemoperfusion with a polymyxin B - immobilized fiber column in patients with septic shock [J]. *Transfus Apher Sci*, 2013, 49(3):499
- [17] ANGEL S, VON BRIESEN H, OH YJ, *et al.* Toward optimal cryopreservation and storage for achievement of high cell recovery and maintenance of cell viability and T cell functionality [J]. *Biopreserv Biobank*, 2016, 14(6):539
- [18] SCHNEIER M, RAZDAN S, MILLER AM, *et al.* Current technologies to endotoxin detection and removal for biopharmaceutical purification [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2020, 117(8): 2588
- [19] SU W, DING X. Methods of endotoxin detection [J]. *J Lab Autom*, 2015, 20(4): 354
- (本文于2023年9月19日收到)