

3503 生物制品生产和检验用牛血清质量标准（标准草案）

用于生物制品生产和检验的新生牛血清为从出生 14 小时内未进食初乳的新生小牛采血，分离血清，经滤过除菌制成；胎牛血清为经心脏采集 230~240 日龄的胎牛全血，分离血清，经滤过除菌制成。主要用于细胞培养。

1 性状 澄清稍黏稠的液体，无溶血或异物，冻融后可能存在少量絮状沉淀。

2 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

3 支原体检验 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

4 外源病毒检验 取被检血清样品 10ml，以 3000r/min 离心 10 分钟，取上清液，按附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

5 特异性抗体测定 根据血清的用途确定测定的抗体种类，采用血清学方法进行检验，应符合规定。

6 细菌内毒素测定 按《中国兽药典》一部附录进行检验，每毫升血清的内毒素含量应低于 10EU。

7 细胞增殖试验 下列方法任择其一。

7.1 Sp2/0 增殖试验法 取生长良好的 Sp2/0 小鼠骨髓瘤细胞，弃营养液，用无血清 MEM 配成每毫升 30 万~50 万细胞悬液，计数细胞后，用无血清 MEM 在 96 孔细胞板上作 1:200、1:400、1:800、1:1600 稀释，每稀释度加 8 孔，每孔 0.1ml，每孔再分别补加 0.1ml 含 20% 参考血清或 20% 被检血清 MEM 营养液，置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养至 48 小时，倒置显微镜下计数，取每孔克隆数均在 30~50 之间的稀释度的 8 个孔，求和计为总克隆数。计算被检血清和参考血清的绝对克隆形成率和相对克隆形成率。

$$\text{绝对克隆形成率}(\%) = \frac{\text{该稀释度形成的细胞克隆总数}}{\text{该稀释度接种 Sp2/0 悬液细胞总数}} \times 100\%$$

$$\text{相对克隆形成率}(\%) = \frac{\text{胎牛血清（或新生牛血清）的绝对克隆形成率}}{\text{参考血清的绝对克隆形成率}} \times 100\%$$

判定标准：参考血清的绝对克隆形成率应不低于 20%

胎牛血清的相对克隆形成率应不低于 80%

新生牛血清相对克隆形成率应不低于 50%

7.2 Vero 细胞增殖试验法 将已长成良好的单层 Vero 细胞按常规传代方法，用 0.25% 胰酶消化分散制备成悬液，300~450g 离心 10 分钟，弃去上清。将细胞沉淀用含 10% 待检血清的 MEM 细胞培养液重悬，计数后配制成 10⁴ 个细胞/ml 的细胞悬液。接种 25cm² 细胞瓶 2 个，每瓶接种 10ml。将细胞置于 37℃ 生化培养箱中连续培养 48 小时后，分别消化分散，300~450g，离心 10 分钟，弃去上清，每瓶细胞沉淀分别用 1.0ml 无血清的 MEM 吹散混匀，进行计数，计算 2 瓶细胞数的算术平均数作为该细胞的细胞数。新生牛血清培养的细胞增殖数应不低于 3.0×10⁴ 个细胞/ml，胎牛血清培养的细胞增殖数应不低于 5.0×10⁴ 个细胞/ml。