

## 3526 人粒细胞巨噬细胞刺激因子生物学活性测定法

### (TF-1 细胞/MTT 比色法)

本法系依据人粒细胞巨噬细胞刺激因子 (GM-CSF) 可刺激人红细胞白血病细胞 (简称 TF-1 细胞) 的增殖, 通过比较 GM-CSF 标准品与供试品对 TF-1 细胞刺激增殖的作用, 来测定供试品中 GM-CSF 的生物学活性。

**试剂** (1) RPMI 1640 培养液 取 RPMI 1640 培养基粉末 1 袋 (规格为 1L), 加水溶解并稀释至 1000ml, 加青霉素  $10^5$  IU 和链霉素  $10^5$  IU, 再加碳酸氢钠 2.1g, 溶解后, 混匀, 经  $0.22\mu\text{m}$  滤膜滤过, 即得,  $4^\circ\text{C}$  保存。也可采用经验证的商品化试剂。

(2) 基础培养液 取 RPMI 1640 培养液 900ml, 加新生牛血清或胎牛血清 100ml, 混匀,  $4^\circ\text{C}$  保存。

(3) 完全培养液 取基础培养液适量, 加入粒细胞巨噬细胞刺激因子制成每 1ml 中含 5.0ng 或每 1ml 中含 80IU 人粒细胞巨噬细胞刺激因子的培养液。

(4) 磷酸盐缓冲液 (PBS) 取氯化钠 8g、氯化钾 0.2g, 磷酸氢二钠 1.44g 与磷酸二氢钾 0.24g, 加水溶解并稀释至 1000ml, 经  $121^\circ\text{C}$ 、15 分钟灭菌。

(5) 噻唑蓝 (MTT) 溶液 取 MTT 0.10g, 加 PBS 20ml 使溶解, 经  $0.22\mu\text{m}$  滤膜滤过, 即得。  $4^\circ\text{C}$  避光保存。

(6) 裂解液 取盐酸 14ml、Triton X-100 50ml, 加异丙醇稀释至 500ml。也可采用其他经验证的裂解液。

**标准品溶液** 取人粒细胞巨噬细胞刺激因子标准品, 按说明书复溶后, 用基础培养液稀释至每 1ml 约含 240 IU 或适宜浓度。在 96 孔细胞培养板中, 做 4 倍系列稀释 (系列稀释的稀释倍数可根据细胞状态进行适当调整), 共 8 个稀释度, 每个稀释度重复 3 孔, 每孔分别留  $50\mu\text{l}$  标准品溶液, 弃去孔中多余溶液。以上操作在无菌条件下进行。

**供试品溶液的制备** 取供试品, 按标示量复溶后, 用基础培养液稀释至每 1ml 约含 240 IU 或适宜浓度。在 96 孔细胞培养板中, 做 4 倍系列稀释 (必要时照标准品溶液项下适当调整), 共 8 个稀释度, 每个稀释度重复 3 孔, 每孔分别留  $50\mu\text{l}$  供试品溶液, 弃去孔中多余溶液。以上操作在无菌条件下进行。

**测定法** TF-1 细胞株用完全培养液于  $37^\circ\text{C}$ 、5% 二氧化碳条件下按下表推荐

30 方式进行培养。也可采用其他经验证的培养方式。

活细胞接种密度 (/ml)	传代或活性测定的时间 (小时)
$1 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$	96
$5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$	48 ~ 72
$1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$	24 ~ 48
$2 \times 10^5 \sim 7 \times 10^5$	24 ~ 36

31 将试验所用溶液预热至 37℃。取足量 TF-1 细胞培养物，离心并收集 TF-1 细  
32 胞，用基础培养液洗涤 3 次，再用基础培养液重悬制成每 1ml 中含  $4.0 \times 10^5$  个细  
33 胞的细胞悬液，置 37℃ 备用。向加有标准品溶液和供试品溶液的 96 孔细胞培养  
34 板中加入细胞悬液，每孔 50μl，于 37℃，5% 二氧化碳条件下培养 48~52 小时后，  
35 每孔加入 MTT 溶液 20μl，于 37℃、5% 二氧化碳条件下培养 5 小时，以上操作  
36 在无菌条件下进行。再向上述各孔加裂解液 100μl，混匀后，用酶标仪在参比波  
37 长 630nm，检测波长 570nm 处测定吸光度。

38 以标准品或供试品溶液对数浓度为横坐标，吸光度值为纵坐标，照生物检定  
39 统计法（通则 1431）中的四参数回归算法进行试验数据处理，计算供试品生物  
40 学活性及 95% 置信区间：

41 
$$\text{供试品生物学活性 (IU/ml)} = Pr \times \frac{Ds}{Dr} \times \frac{Er}{Es}$$

42 式中  $Pr$  为标准品生物学活性，IU/ml；

43  $Ds$  为供试品预稀释倍数；

44  $Dr$  为标准品预稀释倍数；

45  $Er$  为约束模型中标准品的 50% 效应浓度；

46  $Es$  为约束模型中供试品的 50% 效应浓度。

47 试验有效标准：标准品和供试品的四参数剂量反应曲线应当完整，上、下渐  
48 近线应各至少包含一个浓度点，线性部分应至少包含两个浓度点。标准品和供试  
49 品的剂量反应曲线的上下渐近线比值应不小于 2，拟合度  $R^2$  应不小于 0.98，可  
50 靠性测验中回归项应非常显著 ( $P < 0.01$ )、偏离平行项应不显著 ( $P \geq 0.01$ )。供试  
51 品生物学活性的 95% 置信区间应在测得生物学活性的 74% ~ 136%。

52 注：显色方法也可采用经等效验证的其他显色方法。

53

54 起草单位：上海市食品药品检验研究院

联系方式：021-50798175

55

56

## 起草说明

57

58 与欧洲和美国药典相比，现行版中国药典收载的人粒细胞巨噬细胞刺激因子  
59 (GM-CSF) 生物活性测定方法的测定原理基本一致，均是基于细胞株在不同浓度  
60 GM-CSF 作用下增殖速度不同所建立的体外活性检测方法。但是，在数据分析和  
61 结果报告方面，国内外药典则存在较大差异，主要体现在系统适用性要求设置、  
62 统计分析模型选用、可靠性测验以及限度要求设置等方面。

63 现行版中国药典 GM-CSF 生物学活性测定法中仅规定了试验数据采用计算机  
64 程序或四参数回归算法进行分析，而未设置系统适用性要求和可靠性测验要求  
65 判断试验数据的有效性，也未设置生物学活性置信区间报告要求，而通则 1431  
66 生物检定统计法新增的四参数回归算法中已提出相关要求。

67 基于上述情况，修订了通则 3526 人粒细胞巨噬细胞刺激因子子生物活性测  
68 定法，修订内容包括调整了标准品溶液和供试品溶液的配制、细化了试验用细胞  
69 培养方式、优化了测定方法、并规范了试验数据统计分析方式和要求等，从而使  
70 GM-CSF 生物学活性检测方法通则与生物检定统计法项下相关要求协调，与国际  
71 标准接轨。