

3537 人生长激素生物学活性测定法

本法系依据大鼠淋巴瘤细胞 (Nb2-11 细胞) 在不同效价人生长激素刺激下生长和增殖状况不同, 且细胞数量与三磷酸腺苷 (ATP) 含量成正比关系, 采用 ATP 生物发光法检测得到反应体系的荧光强度, 从而能够测定人生长激素的生物学活性。

试剂 (1) 完全培养液 取 Fischer's 培养液 395 ml, 灭能胎牛血清 50 ml、热灭能马血清 50 ml、7.5%碳酸氢钠溶液 5 ml 和 55mmol/L β -巯基乙醇溶液 0.455 ml, 混匀。2~8℃保存。

(2) 工作培养液 取 Fischer's 培养液 490 ml, 灭能马血清 5 ml、7.5%碳酸氢钠溶液 5 ml 和 55mmol/L β -巯基乙醇溶液 0.455 ml, 混匀。2~8℃保存。

(3) 磷酸盐缓冲液 取氯化钠 8.0g、氯化钾 0.20g、无水磷酸二氢钠 1.44g 和磷酸二氢钾 0.24g, 加水使溶解并稀释至 1000ml, 调 pH 至 7.2, 摇匀, 121℃灭菌 15 分钟; 或采用商品化的磷酸盐缓冲液。

(4) 三磷酸腺苷生物发光法检测试剂盒 商品化试剂盒, 一般包含提取液、检测试剂、和稀释液等。

标准品溶液 在无菌条件下操作。取人生长激素标准品, 加磷酸盐缓冲液溶解并制成每 1ml 含人生长激素 1mg 的溶液, 用工作培养液稀释成每 1ml 含人生长激素 60ng 或适宜浓度。在 96 孔培养板中做 3 倍系列稀释 (系列稀释的起始浓度与稀释倍数可根据细胞状态进行适当调整), 共 10 个稀释度, 每个稀释度做 3 个孔。

供试品溶液 在无菌条件下操作。取供试品, 加磷酸盐缓冲液溶解并制成每 1ml 含人生长激素 1mg 的溶液 (注射用人生长激素), 或取供试品 (人生长激素注射液), 用工作培养液稀释成每 1ml 约含人生长激素 60ng 或与标准品溶液相当的适宜浓度。在 96 孔培养板中做 3 倍系列稀释, 共 10 个稀释度, 每个稀释度做 3 个孔。供试品溶液的起始浓度和稀释倍数应与标准品溶液一致。

测定法 取 Nb2-11 细胞, 用完全培养液于 37℃、5%二氧化碳条件下培养, 传代接种细胞浓度为每 1ml 含 1×10^5 个细胞, 传代 48 小时; 也可采用其他经验证的培养方式。取培养物, 离心并收集 Nb2-11 细胞, 用磷酸盐缓冲液洗 2 次, 用工作培养液制成每 1ml 含 1.0×10^5 个细胞的混悬液 (细胞密度可根据细胞状态进行适当调整)。

将上述细胞悬液接种于不透光的 96 孔板中, 每孔 50 μ l; 分别将标准品溶液和供试品溶液加入已接种细胞悬液的孔中, 交叉上样, 每孔 50 μ l, 于 37℃、5%二氧化碳条件下培养 30 ± 2 小时。按三磷酸腺苷生物发光法检测试剂盒说明书操作, 每孔均加入适量提取液使 ATP

充分释放，加适量按说明书配制的检测试液，混匀，放置适宜时间。用具有化学发光检测功能的酶标仪或化学发光检测仪分别测定标准品溶液和供试品溶液的荧光强度，记录测定结果。

以标准品溶液或供试品溶液浓度的对数为横坐标，以其相应的荧光强度为纵坐标，照生物检定统计法（通则 1431）中的四参数回归算法处理实验数据，计算供试品相对效价及 95%置信区间：

供试品相对效价 $=\frac{Er}{Es} \times 100\%$

式中：Er 为约束模型中标准品的 50%效应浓度；

Es 为约束模型中供试品的 50%效应浓度。

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、下渐近线应各至少包含一个浓度点，线性部分至少包含两个浓度点；标准品和供试品的剂量反应曲线的上下渐近线比值应不小于 3，拟合度 R^2 应不小于 0.98，每一剂量组的荧光强度的相对标准偏差均不得大于 20%；可靠性测验中回归项应非常显著 ($P < 0.01$)，偏离平行应不显著 ($P \geq 0.01$)。供试品相对效价 95%置信区间应为测定值的 75%~133%。