



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 38506—2020

---

## 动物细胞培养过程中生化参数的测定方法

Determination of biochemical parameters in animal cell culture process

2020-03-06 发布

2020-03-06 实施

---

国家市场监督管理总局  
国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国生化检测标准化技术委员会(SAC/TC 387)提出并归口。

本标准起草单位:中国测试技术研究院生物研究所、信达生物制药(苏州)有限公司、华派生物工程集团有限公司、上海市计量测试技术研究院、上海张江生物技术有限公司、四川大学、成都柏奥特克生物科技股份有限公司、上海迈泰君奥生物技术有限公司、泰州迈博太科药业有限公司、上海百迈博制药有限公司。

本标准主要起草人:周李华、周凯松、宋航、邱文英、李剑凤、刘刚、黄林、马丽侠、李振华、杨坤、李妍、蒋子敬、方鹏飞、崔利凯、郝伟伟、叶德萍、梁智杰、张大鹏、张丽燕、郭怀祖、徐进、郭清城、戴建新。



# 动物细胞培养过程中生化参数的测定方法

## 1 范围

本标准规定了动物细胞规模培养过程中细胞密度、细胞活率、pH 值、溶解氧、渗透压、葡萄糖含量、细菌内毒素、乳酸含量的测定方法。

本标准适用于中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、小鼠骨髓瘤细胞(NSO、SP2/0)、非洲绿猴肾细胞(Vero)、乳仓鼠肾细胞(BHK-21)、犬肾表皮细胞(MDCK)、猪睾丸细胞(ST)规模培养过程中生化参数的检测,其他真核细胞规模培养过程中生化参数的检测也可参考使用。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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。

WS/T 350 血清葡萄糖测定参考方法

中华人民共和国药典(2015年版)二部(国家药典委员会)

中华人民共和国药典(2015年版)三部(国家药典委员会)

## 3 术语和定义、缩略语

### 3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1.1

**细胞密度 cell density**

细胞通过培养后,单位体积样品中细胞的总数。

#### 3.1.2

**细胞活率 cell viability**

细胞培养过程中,活细胞数目占总细胞数目的百分比。

### 3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ATP:腺苷三磷酸(Adenosine triphosphate)

NADH:还原型辅酶 I (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸,还原态)(Nicotinamide adenine dinucleotide)

NAD(P):烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

NAD(P)H:还原型辅酶 II (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸,还原态)(Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

OPC:开放平台通信(Open Platform Communications)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline)

#### 4 一般要求

4.1 除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯或药用级的试剂及符合《中华人民共和国药典》(2015年版)二部中规定的纯化水或注射用水。

4.2 试验使用的试剂质量应避免过期造成的试剂性能改变。因此测定前应根据试剂说明书或产品质量报告验证试剂质量。

注:荧光染料、缓冲液等试剂不宜长时间保存。台盼蓝会由于错配导致死细胞测量结果过高或过低。

4.3 为减少或避免取样可能导致的污染风险,细胞培养过程中各参数测定宜采用在线检测。

4.4 在线检测时,相关设备应根据生产厂商的安装确认方案、操作确认方案进行确认,并将其形成文件。在测定前,生产厂商和/或使用用户应进行设备性能确认。

4.5 在线检测时电极直接插入细胞发酵液中检测,无需取样。离线检测时,应按照无菌操作要求进行取样,取样后按照检测参数和检测方法要求,进行离心、稀释等样品处理后立即检测,不能立即检测的样品应放置于 2℃~8℃并在不超过 6 h 内检测。

#### 5 细胞密度的测定

##### 5.1 悬浮细胞密度的测定



###### 5.1.1 血球计数法

###### 5.1.1.1 原理

将待测样品悬浮液置于血球计数板上,于显微镜下直接计数,进而推算出细胞数目。

###### 5.1.1.2 试剂和材料

PBS 缓冲液:可自行配制亦可购买商业化产品。

###### 5.1.1.3 仪器设备及器具

5.1.1.3.1 血球计数板:16 格×25 格或 25 格×16 格。

5.1.1.3.2 倒置显微镜:放大倍数×400。

5.1.1.3.3 微量移液器:20 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL。

###### 5.1.1.4 测定步骤

取 900 μL PBS 缓冲液至离心管中,加入细胞悬液 100 μL,依次进行 10 倍系列稀释,取适宜稀释度进行计数,使得细胞数量每大方格为 100 个~300 个。将盖玻片盖于计数板中心上方,上下吹打,轻轻混匀,用微量移液器将细胞悬液沿盖玻片边缘缓缓加入,不留气泡,不外溢,静置 2 min~3 min。在显微镜下对大方格的细胞进行计数,重复计数三次,取平均数。

注:实际检测过程中,可根据预计细胞密度调整所需 PBS 缓冲液和细胞悬液用量。

###### 5.1.1.5 结果计算

16 格×25 格的血球计数板按式(1)计算,25 格×16 格的血球计数板按式(2)计算。

$$N = \frac{A \times 10^4 \times d \times 400}{100} \dots\dots\dots(1)$$

$$N = \frac{A \times 10^4 \times d \times 400}{80} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

$N$  ——每毫升悬浮液中细胞数，单位为个；

$A$  ——计数板观察细胞数，单位为个；

$d$  ——细胞溶液的总稀释倍数。

计算结果表示为整数。

## 5.1.2 自动图像分析法

### 5.1.2.1 原理

将采集的源图像数据进行平滑处理，通过直方图阈值处理，再经过腐蚀去填充孔洞，图像灰度化、对比度增强、边缘检测、二值化变换以及数学形态学和修正一系列图像处理计数和分析，得出细胞的确切数量。

### 5.1.2.2 试剂

台盼蓝溶液(0.4%，W/V)：称取 4.00 g 台盼蓝，加少量水研磨，用水溶解后定容至 100 mL，用定性滤纸过滤，4℃存放。使用时，用 PBS 溶液稀释至 0.4%。根据需要可直接购买商业化商品。

### 5.1.2.3 仪器设备

自动细胞计数仪：主要由图像处理系统、图像预处理系统、图像分割和图像计数四部分组成。

### 5.1.2.4 分析步骤

启动自动细胞计数仪，设定细胞类型。根据仪器的线性范围和上样体积要求取适量细胞悬液加至台盼蓝染料中(细胞悬液和台盼蓝染料按照 1：1 比例混匀)，上下吹打，轻轻混匀。取适量样本混合物加至计数池中，按照仪器操作说明，通过高清图像分析系统，自动分析细胞密度、活率及形态。

注：可使用其他等效染料，如噻唑蓝等。

## 5.1.3 电容法

### 5.1.3.1 原理

根据测定时的细胞悬液浓度建立细胞悬液浓度与电容值线性关系，计算出  $K$  值。将常数  $K$  值输入在线细胞检测仪检测系统中，得到细胞密度。

### 5.1.3.2 设备

电容法在线细胞检测仪：测量范围，0 pF~400 pF；精度，0.01 pF。

### 5.1.3.3 测定步骤

#### 5.1.3.3.1 在线细胞检测仪的电容“0”点校准

接通电源，开机稳定 30 min，将电极放入空白细胞培养液中，并设置合适的温度、搅拌转速以及 pH，各参数需与细胞培养过程中的参数保持一致，待电容数据稳定后进行电容“0”点校准。

注：具体校准操作依据厂家要求进行相应调整。

#### 5.1.3.3.2 细胞密度与在电容值正相关常数“ $K$ ”确定

向生物反应器内加入细胞培养接种的细胞悬液(其浓度为  $M$ )，检测得到细胞电容值  $P$ 。连续使用

4 个批次细胞悬液浓度与细胞电容值数据统计,统计结果做出线性关系图,绘制标准曲线,根据线性关系结果可得出式(3)中常数  $K$  的数值。

### 5.1.3.3.3 测定和结果计算

将常数  $K$  值输入在线细胞检测仪检测系统中,即可依据式(3)在线得到活细胞密度:

$$M = KP \dots\dots\dots(3)$$

式中:

$M$  ——细胞悬液密度,单位为个每毫升(个/mL);

$P$  ——细胞电容值,单位为皮法(pF);

$K$  ——细胞密度与电容值正相关常数。

计算结果表示到小数点后两位。

## 5.1.4 拉曼光谱法

### 5.1.4.1 原理

单色光照射到样品上后,只与散射分子本身的结构有关。对与入射光频率不同的散射光谱进行分析,得到分子振动、转动方面信息,进行分子结构研究和定性定量检测。

### 5.1.4.2 设备

5.1.4.2.1 拉曼光谱仪,主要由控制系统、激光光源、探头、光学组件和成像系统组成。

5.1.4.2.2 生物反应器。

### 5.1.4.3 测定步骤和结果统计

#### 5.1.4.3.1 光强度校正

按照仪器操作说明要求,将拉曼探头通过光纤与拉曼光谱仪相连,进行光强度校正。

#### 5.1.4.3.2 灭菌

将校正后的拉曼探头安装在生物反应器上,与生物反应器一起灭菌。一次性反应器可直接将探头插在相应孔里面。

#### 5.1.4.3.3 测定

按照仪器操作说明,启动拉曼光谱仪,加入培养基,接种,运行拉曼光谱采集程序,设定曝光时间 10 s,扫描 75 次,一个样品测量大概需要 15 min。

注:曝光时间和扫描次数可依据不同品牌仪器要求做相应调整。

#### 5.1.4.3.4 结果统计



导入细胞密度数学模型,拉曼光谱仪每测量一次自动将光谱保存在制定文件夹,通过数学模型计算出工艺参数结果,相应结果显示在屏幕上,可通过 OPC 传输到数据库系统或工艺控制系统。

## 5.2 贴壁细胞密度的测定

### 5.2.1 微球载体等作为细胞培养载体的贴壁细胞密度测定

用适量消化液(可用 0.25% 的胰蛋白酶等)消化细胞,使细胞完全悬浮,然后按 5.1.1 或 5.1.2 测定。

### 5.2.2 片状载体作为细胞培养载体的贴壁细胞密度测定

用结晶紫染色液完全浸没片状载体,在 37 ℃裂解 30 min~60 min,使细胞裂解,然后按 5.1.1 或 5.1.2测定。

## 6 细胞活率的测定

### 6.1 原理

活细胞的细胞膜是一种选择性的膜,只允许物质选择性的通过,而细胞死亡之后,细胞膜受损,通透性增加。根据活细胞和死细胞的细胞膜通透性差异,加入染料后,死细胞着色,活细胞不着色,从而可得出活细胞数目占总细胞数百分比。

### 6.2 试剂和材料

同 5.1.1.2 和 5.1.2.2。

### 6.3 设备

同 5.1.1.3。

### 6.4 测定步骤和结果计算

吸取适量细胞悬液,加入 0.4%台盼蓝溶液,使得台盼蓝终浓度为 0.04%,在 3 min 内按 5.1.1 或 5.1.2进行计数,被染色成蓝黑色的细胞计为死细胞数  $D$ 。细胞活率按式(4)计算:

$$X = \frac{C - D}{C} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(4)$$

式中:

$X$  ——细胞活率;

$C$  ——细胞总数,单位为个;

$D$  ——死细胞数,单位为个。

计算结果表示到小数点后两位。

## 7 pH 的测定

### 7.1 原理

通过测量细胞培养液中氢离子活性,根据能斯特方程,离子活度与电极电位成正比,对待测细胞悬液建立起电极电位与活性的关系曲线,得出待测细胞培养液酸性、中性和碱性的数值。

### 7.2 试剂

pH 校准液:可根据需要选择不同 pH 校准液。

注: pH 校准液可用 pH 4.01 标准缓冲液(邻苯二甲酸氢钾)、pH 7.00 标准缓冲液(混合磷酸盐)和 pH 9.18 标准缓冲液(硼砂)等。

### 7.3 设备

7.3.1 在线 pH 电极以及离线台式 pH 计:精度 0.1。

7.3.2 微量移液器:20  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ ~1 000  $\mu\text{L}$ 。

## 7.4 测定步骤

### 7.4.1 总则

pH 在线检测可与离线检测同时进行,离线检测的结果可用于在线检测结果的复核、校准。

### 7.4.2 在线检测

在线检测前,需对 pH 电极进行校准,校准完成后将电极安装到反应器,再进行检测。

### 7.4.3 离线检测

离线检测前,应对离线 pH 计进行校准。取 5 mL~10 mL 细胞培养液至 15 mL 离心管中,按《中华人民共和国药典》(2015 年版)三部中的物理检查法(通则 0631)进行检测。检测过程中避免晃动培养液。在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 5%,否则,应重新测定;所取样品应及时检测,避免长时间暴露空气中,导致样品 pH 变化带来的测量误差。

## 7.5 结果计算

检测后直接读数。计算结果表示到小数点后两位。

## 8 溶解氧的测定

### 8.1 原理

氧透过隔膜被工作电极还原,产生与氧浓度成正比的扩散电流,通过测量此电流,得到细胞培养悬液中溶解氧的浓度。溶氧检测离线后偏移较大,一般采用在线检测。

### 8.2 设备

在线溶氧电极。

### 8.3 测定步骤

#### 8.3.1 仪器校准

使用溶氧电极对培养过程中溶解氧进行在线实时测定,在检测前需对安装溶氧电极的设备进行灭菌。灭菌结束后需根据培养条件设定起始培养参数,控制稳定后维持溶氧电极活化 2 h 以上再进行校正。根据不同厂家和型号要求,可进行 100%一点或 0、100%两点校准。

#### 8.3.2 测定

灭菌、校准完成后,按照仪器操作说明设定条件,实时监测细胞培养过程中培养液的溶解氧含量。样品在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值未超过算术平均值的 5%,否则,应重新测定。

### 8.4 结果计算

在线检测后直接读数。计算结果表示到小数点后两位。



## 9 渗透压的测定

### 9.1 原理

根据溶液的渗透压摩尔浓度与冰点温度下降值呈线性关系为基础,测量溶液的冰点来测定溶液渗透压。

### 9.2 设备

冰点渗透压仪。

### 9.3 测定步骤

渗透压采用离线检测。取 2 mL 细胞悬液,150 g~300 g 离心 5 min~10 min,取上清液。按《中华人民共和国药典》(2015 年版)三部中的物理检查法(通则 0632)渗透压摩尔浓度测定法进行测定。在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 5%,否则,需重新测定。

### 9.4 结果计算

按《中华人民共和国药典》(2015 年版)三部中的物理检查法(通则 0632)计算结果,结果表示为整数。

## 10 葡萄糖的测定

### 10.1 原理

在己糖激酶催化下,葡萄糖和 ATP 发生磷酸化反应,生成葡萄糖-6-磷酸在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶催化下脱氢,生成 6-磷酸葡萄糖酸,同时使 NAD(P)还原成 NAD(P)H,在 NAD(P)转化成 NAD(P)H 的同时,伴有 340 nm 处摩尔消光系数的上升,摩尔消光系数变化与葡萄糖含量成正比,通过检测 339 nm 处的摩尔消光系数即可测定细胞悬液中葡萄糖含量。

### 10.2 试剂

10.2.1 6-磷酸葡萄糖脱氢酶试剂。

10.2.2 0.11 mol/L 饱和 Ba(OH)<sub>2</sub> 溶液。

10.2.3 1.5% Tris-HCl 原液。

10.2.4 1.2% Tris-Base 原液。

10.2.5 0.2% Tris-白蛋白原液。

10.2.6 1 g/L 安息香稀释液。

10.2.7 22 g/L ZnSO<sub>4</sub> 溶液。

10.2.8 10 g/L 葡萄糖标准原液:精密称取 105 °C 干燥至恒重的葡萄糖标准品 1.00 g,溶解稀释后定容于 100 mL 容量瓶中。

10.2.9 0.5% 酚酞指示剂:精密称取 0.5 g 酚酞,用无水乙醇溶解、定容至 100 mL。亦可购买商业化产品。

### 10.3 设备

10.3.1 紫外可见分光光度计。

10.3.2 微量移液器:20  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ ~1 000  $\mu\text{L}$ 。

10.3.3 天平:感量 0.01 g。

#### 10.4 测定步骤

取 2 mL 细胞培养液,150 g~300 g 离心 10 min,取上清液。按照 WS/T 350 的方法或使用生物传感器进行检测。在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 5%。否则,需重新测定。

#### 10.5 结果计算

计算结果表示到小数点后两位。

### 11 细菌内毒素的测定

#### 11.1 原理

当细菌死亡或自溶后便会释放内毒素,通过用鲎试剂与细菌内毒素产生凝集反应来定性检测或半定量检测细菌内毒素。

#### 11.2 试剂

凝胶法鲎试剂。

#### 11.3 设备

11.3.1 恒温箱。

11.3.2 微量移液器:20  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ ~1 000  $\mu\text{L}$ 。

11.3.3 旋涡混合器。

#### 11.4 测定步骤

取 2 mL 细胞培养液,150 g~300 g 离心 5 min~10 min,取上清液。按照《中华人民共和国药典》(2015 年版)三部中的微生物检查法(通则 1143)细菌内毒素检查法进行。

#### 11.5 结果计算

按照《中华人民共和国药典》(2015 年版)三部中的微生物检查法(通则 1143)计算结果,计算结果表示到小数点后一位。

### 12 乳酸含量测定

#### 12.1 原理

乳酸在乳酸脱氢酶的作用下生成丙酮酸,同时使烟酰胺腺嘌呤二核苷酸还原生成 NADH 和  $\text{H}^+$ ,检测生产底物计算发酵液中乳酸含量。

#### 12.2 试剂

乳酸检测试剂盒或设备,不同检测设备配套不同试剂。



### 12.3 设备

根据检测机理不同,所用设备包括生化分析仪、分光光度计等。

### 12.4 测定步骤

取适量细胞培养液,150 g~300 g 离心 10 min,取上清液按试剂盒或设备操作说明进行检测。在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 5%。否则,应重新测定。

### 12.5 结果计算

按试剂盒说明书计算结果,计算结果表示到小数点后两位。

## 13 试验报告

试验报告应包括如下内容:

- a) 试样名称;
- b) 细胞类型;
- c) 试样编号;
- d) 技术依据;
- e) 主要仪器设备;
- f) 测试参数;
- g) 试验温度、环境;
- h) 测试日期、试验人员。

