

ICS 71.080.99  
G 17  
备案号:20517—2007

# HG

## 中华人民共和国化工行业标准

HG/T 3935—2007

---

### 哺乳类动物细胞培养基

Cell culture media

2007-04-13 发布

2007-10-01 实施

---

中华人民共和国国家发展和改革委员会 发布

## 前 言

本标准附录 A 为资料性附录。

本标准由中国石油和化学工业协会提出。

本标准由全国化学标准化技术委员会有机分会(SAC/TC63/SC2)归口。

本标准由北京清大天一生物技术有限公司负责起草。

本标准主要起草人:陈文庆、罗海春。

## 哺乳类动物细胞培养基

### 1 范围

本标准规定了哺乳类动物细胞培养基的要求、试验方法、检验规则及标志、包装、运输、贮存。

本标准适用于哺乳类动物细胞培养基。该产品主要用于哺乳类动物细胞培养。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 191—2000 包装储运图示标志(eqv ISO 780 : 1997)

GB/T 1250 极限数值的表示方法和判定方法

GB/T 6679—2003 固体化工产品采样通则

中华人民共和国药典 2005 年版二部附录

中华人民共和国药典 2005 年版三部附录

中华人民共和国药典 2005 年版二部 纯化水

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

**每升标示量** **marker liter**

在产品包装上标注的配制 1 L 液体细胞培养基所需干粉细胞培养基的质量，单位为 g。

### 4 分类和命名

哺乳类动物细胞培养基按主要成分的不同分为四型，其命名及对应主要成分见表 1。

表 1 哺乳类动物细胞培养基型号命名及对应主要成分

型号命名 <sup>a</sup>	主要成分
DMEM 粉末细胞培养基	氯化钙、九水硝酸铁、氯化钾、无水硫酸镁、氯化钠、无水磷酸二氢钠、L-精氨酸盐酸盐、L-胱氨酸盐酸盐、L-谷氨酰胺、甘氨酸、L-组氨酸盐酸盐、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸盐酸盐、L-蛋氨酸、L-苯丙氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、D-葡萄糖、酚红、丙酮酸钠、D-泛酸钙、氯化胆碱、叶酸、L-肌醇、烟酰胺、盐酸吡哆醛、核黄素、盐酸硫胺
199 粉末细胞培养基	氯化钙、九水硝酸铁、氯化钾、无水硫酸镁、磷酸二氢钾、氯化钠、无水磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、L-丙氨酸、L-精氨酸盐酸盐、L-天冬氨酸、L-半胱氨酸盐酸盐、L-胱氨酸盐酸盐、L-谷氨酸、L-谷氨酰胺、甘氨酸、L-组氨酸盐酸盐、L-羟脯氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸盐酸盐、L-蛋氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、硫酸腺嘌呤、腺苷酸、脱氧核糖、D-葡萄糖、谷胱甘肽(还原型)、盐酸鸟嘌呤、次黄嘌呤、酚红、D-核糖、乙酸钠、胸腺嘧啶、尿嘧啶、黄嘌呤、维生素 C、维生素 E、维生素 H、D-泛酸钙、氯化胆碱、叶酸、L-肌醇、烟酸、烟酰胺、盐酸吡哆醛、盐酸吡哆醇、核黄素、盐酸硫胺、维生素 A 醋酸酯
MEM 粉末细胞培养基	氯化钙、九水硝酸铁、氯化钾、无水硫酸镁、氯化钠、无水磷酸二氢钠、L-精氨酸盐酸盐、L-天冬氨酸、L-天冬酰胺、L-胱氨酸盐酸盐、L-谷氨酰胺、甘氨酸、L-组氨酸盐酸盐、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸盐酸盐、L-蛋氨酸、L-苯丙氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、D-葡萄糖、酚红、丁二酸、丁二酸钠、D-泛酸钙、氯化胆碱、叶酸、L-肌醇、烟酰胺、盐酸吡哆醛、核黄素、盐酸硫胺
RPMI1640 粉末细胞培养基	四水硝酸钙、氯化钾、无水硫酸镁、氯化钠、磷酸氢二钠、L-精氨酸、L-天冬酰胺、L-天冬氨酸、L-胱氨酸盐酸盐、L-谷氨酸、L-谷氨酰胺、甘氨酸、L-组氨酸、L-羟脯氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸盐酸盐、L-蛋氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、D-葡萄糖、谷胱甘肽(还原型)、HEPES、酚红、维生素 H、D-泛酸钙、氯化胆碱、叶酸、L-肌醇、烟酰胺、对氨基苯甲酸、盐酸吡哆醇、核黄素、盐酸硫胺、维生素 B <sub>12</sub>
<sup>a</sup> 每一型号可根据配方不同分为若干亚型。	

5 性状

粉红色或类白色固体粉末。

6 要求

哺乳类动物细胞培养基应符合表 2 所示的技术要求。

表2 技术要求

项 目		指 标			
		DMEM 粉末细胞培养基	199 粉末细胞培养基	MEM 粉末细胞培养基	RPMI 1640 粉末细胞培养基
澄清度		澄清			
pH 值 <sup>a</sup> (每升标示量/L)		3.20~6.40	3.90~6.30	3.90~6.90	6.40~8.30
干燥减量的质量分数/%		≤ 5.0			
渗透压 <sup>b</sup> /(mOsm/kgH <sub>2</sub> O)		238~291	238~299	228~301	223~273
细菌内毒素/(EU/mL)		≤ 10			
微生物限度	细菌数/(CFU/g)	≤ 200			
	霉菌数/(CFU/g)	≤ 50			
细胞生长试验	细胞形态	正常			
	细胞生长试验	合格			
<sup>a</sup> 每种亚型允许的 pH 偏差范围为±0.30。					
<sup>b</sup> 每种亚型允许的渗透压偏差范围为±5%。					

## 7 试验方法

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和中华人民共和国药典 2005 年版中规定的纯化水。

### 7.1 澄清度的测定

称取每升标示量的实验室样品,置于 1 000 mL 烧杯中,加水 1 000 mL,搅拌至溶解。按中华人民共和国药典 2005 年版二部附录 IX B 进行。

### 7.2 pH 值的测定

称取每升标示量的实验室样品,置于 1 000 mL 烧杯中,加水 1 000 mL,搅拌至溶解。按中华人民共和国药典 2005 年版附录 VI H 进行。

### 7.3 干燥减量的测定

按中华人民共和国药典 2005 年版二部附录 VIII L 干燥失重测定法进行。

取两次平行测定结果的算术平均值为测定结果,两次平行测定结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 10 %。

### 7.4 渗透压的测定

称取每升标示量的实验室样品,置于 1 000 mL 烧杯中,加水 1 000 mL,搅拌至溶解。按中华人民共和国药典 2005 年版二部附录 IX G 渗透压摩尔浓度测定法进行。

取两次平行测定结果的算术平均值为测定结果,两次平行测定结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的 5 %。

### 7.5 细菌内毒素的测定

按中华人民共和国药典 2005 年版附录 XI E 细菌内毒素检查法中的凝胶法进行。

称取 1/100 每升标示量的实验室样品,精确至 0.000 1 g,加入细菌内毒素检查用水(市售)10 mL 溶解,吸取该溶液 0.1 mL 加细菌内毒素检查用水(市售)3.9 mL,混匀即得试验溶液。

### 7.6 微生物限度的测定

按中华人民共和国药典 2005 年版附录 XI J 微生物限度检查法进行,检查项目为细菌数、霉菌数。

检查法采用平皿法。

称取实验室样品 1 g,精确至 0.01 g,加入无菌纯化水 10 mL 溶解,混匀即得试验溶液。

## 7.7 细胞生长试验

### 7.7.1 方法提要

7.7.1.1 本试验所用器具及溶液均为无菌,试验操作过程均为无菌操作。

7.7.1.2 细胞在 37℃ 恒温条件下,在含体积分数为 10% 小牛血清的细胞培养液中生长 48 h~72 h,观察细胞形态并进行细胞计数;细胞生长 48 h~72 h 后,更换不含小牛血清的细胞培养液,继续培养 48 h,观察细胞形态并进行细胞计数。

### 7.7.2 试剂和材料

7.7.2.1 小牛血清:中华人民共和国药典 2005 年版三部附录 XIII D。

7.7.2.2 平衡盐溶液:称取氯化钾 0.2 g,精确至 0.01 g;无水磷酸二氢钾 0.2 g,精确至 0.01 g;氯化钠 8.0 g,精确至 0.01 g;无水磷酸氢二钠 1.15 g,精确至 0.001 g;加纯化水 1 000 mL,混匀、过滤除菌即得。

7.7.2.3 VERO 细胞:代次不超过 150 代。

7.7.2.4 细胞培养液:按产品使用说明书要求配制。

7.7.2.5 胰蛋白酶溶液:称取胰蛋白酶(活力 1:250)2.5 g,精确至 0.01 g,加 1 000 mL 平衡盐溶液,混匀、过滤除菌即得。

### 7.7.3 仪器

7.7.3.1 医用净化工作台:洁净级别为百级。

7.7.3.2 二氧化碳恒温培养箱:能通二氧化碳气体并且保持二氧化碳体积分数为  $(5 \pm 0.1)\%$ ,能在  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  恒温。

7.7.3.3 细胞培养瓶:T25 型、无菌。

7.7.3.4 显微镜:倒置、相差。

7.7.3.5 血球计数板。

7.7.3.6 盖玻片:无水乙醇浸泡并擦干。

### 7.7.4 试验步骤

#### 7.7.4.1 制备细胞悬液

7.7.4.1.1 将细胞培养液从细胞培养瓶内吸出,用平衡盐溶液洗细胞一次。

7.7.4.1.2 向细胞培养瓶内加入胰蛋白酶溶液 1 mL,于  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  消化 3 min~5 min。在显微镜下观察,当细胞变圆接近脱壁时,将胰蛋白酶溶液倒掉。

7.7.4.1.3 根据细胞密度加入一定量细胞培养液,用吸管吹打,使细胞脱壁制成细胞悬液 A。

#### 7.7.4.2 细胞培养

7.7.4.2.1 吸取一定量的细胞悬液 A,加到细胞培养瓶内。

7.7.4.2.2 向细胞培养瓶内加入 10 mL 含体积分数为 10% 小牛血清的细胞培养液,使细胞接种密度为  $5 \times 10^4$  细胞/mL。

7.7.4.2.3 将细胞培养瓶送入二氧化碳恒温培养箱,在  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  及二氧化碳体积分数为  $(5 \pm 0.1)\%$  条件下进行培养。

7.7.4.2.4 培养 48 h~72 h,观察细胞形态,并按 7.7.4.3 计数。

7.7.4.2.5 当细胞密度达到  $1 \times 10^5$  细胞/mL 时更换不含小牛血清的细胞培养液 10 mL,继续培养 48 h,观察细胞形态并计数。

#### 7.7.4.3 细胞计数

7.7.4.3.1 将需要计数的细胞按 7.7.4.1 方法制备细胞悬液 B。

7.7.4.3.2 吸取细胞悬液 B 100  $\mu\text{L}$  转移至离心管中,视细胞量确定是否稀释及稀释倍数。

**7.7.4.3.3** 将盖玻片盖于计数板中心的计数室上方。调整计数板中的细胞数量在 100 个~300 个。沿盖玻片边缘点加细胞悬液使其通过毛细作用自然渗入,不要留有气泡,不要外溢,显微镜下计数。

**7.7.4.3.4** 观察计数板四角大方格中的细胞数,细胞压中线时,一般遵循“计左不计右,计上不计下”的原则。将计数板观察细胞数代入下列公式:

$$\text{计数板观察细胞数} \times 10^4 \times \text{稀释倍数} / 4 = \text{细胞数} / \text{mL}$$

### 7.7.5 分析结果的表述

培养 48 h~72 h 的细胞形态为成纤维样,贴壁生长,正常细胞形态参见附录 A。72 h 内细胞数量应达到  $1 \times 10^5$  细胞/mL。

继续培养 48 h 的细胞形态为成纤维样,贴壁生长,正常细胞形态参见附录 A。细胞计数应不小于  $1 \times 10^5$  细胞/mL。

## 8 检验规则

**8.1** 表 2 技术要求中的所有项目均为出厂检验项目。

**8.2** 使用同一台混合设备一次混合量所生产的均质产品为一批。每批均必须检验。

**8.3** 按 GB/T 6679—2003 的规定采样。将所采样品均匀分成两份,分别装于两个清洁干燥的无菌、密闭、避光容器内,粘贴标签,注明生产企业名称、产品名称、批号、生产日期,采样日期和采样者姓名。一份供检验用,另一份作为留样保存备查。

**8.4** 产品应由生产企业的质量检验部门进行检验。生产企业应保证出厂的产品均符合本标准要求,每批出厂的产品都应附有一定格式的质量证明书,其内容包括:生产企业名称和地址、产品名称、批号、生产日期和本标准编号等。

**8.5** 检验结果的判定按 GB/T 1250 修约值比较法进行,检验结果如果有一项指标不符合本标准要求时,应重新自两倍量的包装单元中采样进行复验,复验结果即使只有一项指标不符合本标准要求,则整批产品为不合格。

## 9 标签、使用说明书

### 9.1 标签

应有产品名称、亚型代号、批号、包装规格、生产日期、有效期至、生产企业名称、配制方法、本标准编号、每升标示量。

### 9.2 使用说明书

应有产品名称、亚型代号、包装规格、有效期、生产企业名称、配制方法、使用方法、每升标示量。

## 10 标志、包装、运输、贮存

### 10.1 标志

包装容器上应有产品名称、亚型代号、批号、生产日期、有效期至、包装规格、数量、本标准编号等和 GB/T 191—2000 规定的“向上”和“堆码层数极限”标志等图形标志。

### 10.2 包装

#### 10.2.1 内包装

材料应符合国家药品包装材料标准,无析出物,不与哺乳类动物细胞培养基发生反应,可达到密封、避光效果并应采用辐照灭菌方法等。

#### 10.2.2 外包装

具有避光效果,离地面一米自由落体,包装应不破损。





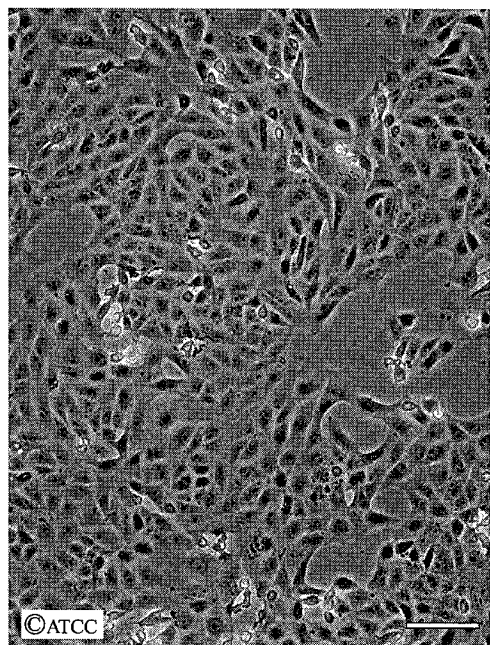
附 录 A  
(资料性附录)  
VERO 细胞正常细胞形态图

A.1 VERO 细胞正常细胞形态图见图 A.1。

美国菌种保藏中心(ATCC)号:CCL-81

形态特征:成纤维样,贴壁生长

资源网址:[www.atcc.org](http://www.atcc.org)



High Density

Scale Bar=100μm

图 A.1 VERO 细胞正常细胞形态图