

ICS 11.100

CCS C00/09

团 体 标 准

T/SBIAORG 0003—2022

人体细胞及组织培养用无血清培养基标准

Specification of serum-free medium for human cell and tissue culture

2022 – 12 – 01 发布

2022 – 12 – 01 实施

上海市生物医药行业协会发布

目 录

1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 基本要求	2
5 原料要求	2
6 技术要求	3
7 检验方法	4
8 运输和贮存	5
9 标识要求	5
10 参考文献	6
附录 1: 支原体 PCR 测试方法	7

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2020《标准化工作指导第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规则起草。

本标准由华东理工大学提出，上海市生物医药行业协会发布。

本标准起草单位：华东理工大学、上海倍谙基生物科技有限公司。

本标准主要起草人：谭文松、赵亮、史克昱、冯嘉炜。

本标准为首次发布。

人体细胞及组织培养用无血清培养基标准

1 范围

本文件规定了人体细胞及组织培养用无血清培养基的基本要求，包括原料要求、相关技术要求、检验方法、运输、贮存和包装、标识要求及注意事项等。

本文件所指无血清培养基，系指用于制备人体干细胞及免疫效应细胞等人体细胞制品（包括组织工程化产品）的细胞培养用无血清培养基。

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。

《中国药典2020年版四部0631pH值测定法》

《中国药典2020年版四部0632渗透压摩尔浓度测定法》

《中国药典2020年版四部0902澄清度检查法》

《中国药典2020年版四部0861残留溶剂测定法》

《中国药典2020年版四部0832水分测试法》

《中国药典2020年版四部0982粒度和粒度分布测定法》

《中国药典2020年版四部1143细菌内毒素检查法》

《中国药典2020年版四部3301支原体检查法》

《中国药典2020年版四部1105非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法》

《中国药典2020年版四部1101无菌检查法》

3 术语和定义

3.1 人体细胞及组织培养用无血清培养基 Serum-free medium for human cell and tissue culture

应用于人体细胞及组织培养，不含有血清血浆等就可以维持细胞在体外较长时间生长繁殖的合成培养基。

3.2 细胞毒性 Cytotoxicity

由产品、材料及其浸出物等化学物质所造成的细胞死亡、细胞溶解、细胞生长抑制和（或）功能的紊乱等不良反应。

3.3 外源因子 Exogenous factor

存在于接种物、细胞基质及（或）生产制品所用的原材料及制品中的污染物，包括细菌、真菌、支原体和外源性病毒等。

3.4 杂质 Impurity

在产品中所含有的不是产品实体的任何成分，主要包括有机杂质、无机杂质、残留溶剂。

3.5 粉体培养基 Powder medium

形态为粉末固体状的培养基。

3.6 液体培养基 Liquid medium

形态为液体状的培养基。

3.7 D90 值

一个样品的累计粒度分布数达到90%时所对应的粒径。

4 基础要求

4.1 无血清培养基应无细胞毒性，不对细胞生长产生不良影响^[1]。

4.2 无血清培养基中应无外源因子污染，以避免污染应用端的细胞及其产品。

4.3 无血清培养基中的组分应均一稳定，能够促进特定的细胞生长以及维持细胞生长状态或某种特定功能^[5,6]。

4.4 无血清培养基在其规定的效期内，应保持质量稳定，功能性完整。

5 原料要求

5.1 选择原材料时应考虑其使用的必要性、合理性和安全性^[3-4]。

5.2 应尽量采用已经获得批准可用于人体的或符合药典标准的原材料^[3-4]。

5.3 培养基组分原料纯度应满足中国药典 2020 年版要求，若原料不是中国药典等级的，则应提供充分的证据来证明这些化学物质有足够的纯度用于本产品^[6]。

5.4 培养基组分原料杂质应满足中国药典要求，若原料不是中国药典等级的，则应提供充分的证据来证明这些化学物质具有的杂质限度符合产品要求^[6]。

5.5 培养基组分原料应满足中国药典或相关规范中的重金属杂质和砷盐要求^[1, 4]。

5.6 应尽量避免使用动物或人来源的物质，尽可能采用组成成分明确的非动物源性物料^[2]。

5.7 应禁止使用含有抗生素及其残留的组分原料。

5.8 若必须使用人源或动物源性物料，需要提供相关的研究资料说明使用的必要性和合理性，严格控制外源因子污染和免疫原性等风险，应进行全面的外源因子检测，并应考虑到技术发展对新型外源因子的认知^[3]。

5.9 若培养基组分涉及植物来源的物料，应根据具体培养基的用途考虑其农药残留的安全性风险。

5.10 与产品直接接触的包装材料，应确认符合药品包装材料要求，在存储有效期内无细胞毒性，不会对细胞生长产生不良影响。

6 技术要求

6.1 外观

液体产品应澄清透明，不分层，无悬浮物或沉淀；

粉体产品应颜色均一，无明显结块。

6.2 基础理化参数

针对粉体培养基，其表观参数为其按照配制说明配制成培养基溶液后的基本理化参数，包括溶液pH（初始）、渗透压摩尔浓度、澄清度。

（1）pH（初始）：培养基溶液的初始pH应在具体培养基标识均值的±1.0范围之内。

（2）渗透压摩尔浓度：培养基溶液渗透压摩尔浓度应在培养基标识均值±10%范围之内。

（3）澄清度：培养基溶液应保持澄清（浊度不高于2 NTU）或几乎澄清（浊度不高于4 NTU）。

6.3 残留溶剂

残留溶剂系指在产品的生产中，以及在其制备过程中使用的，但在工艺过程中未能完全去除的有机溶剂。如产品生产制造过程中涉及溶剂的使用，除另有规定外，第一、第二、第三类溶剂的残留限度应符合《中华人民共和国药典2020年版四部：0861残留溶剂测定法》附表1中的规定。

6.4 有效成分含量

培养基中碳源及氨基酸等主要有效成分含量应在具体培养基标识均值±10%范围之内。

6.5 水分（适用于粉体培养基）

粉体培养基中的自由水含量应控制不高于6%。

6.6 粒度分布（适用于粉体培养基）

粉体培养基粒度应均一，呈正态分布。建议以D90值描述粉体粒度分布，并控制批次间D90值偏差不超过±20%。

6.7 安全性指标

安全性指标主要包括了细菌内毒素、支原体、微生物限度（需氧菌总数、霉菌及酵母菌总数）（粉体培养基适用），无菌检查（液体培养基适用）。

（1）细菌内毒素：如无特殊要求，培养基产品细菌内毒素含量应不高于1 EU/ml。对粉体培养基而言，该指标为其配方浓度下溶液的细菌内毒素含量。

（2）支原体检查：应无支原体检出。

（3）微生物限度（需氧菌总数）：粉体培养基中微生物需氧菌总数水平应不高于 2×10^2 CFU/g。

（4）微生物限度（霉菌及酵母菌总数）：粉体培养基中微生物霉菌及酵母菌总数水平应不高于50 CFU/g。

（5）无菌检查：液体培养基进行无菌检查，应无菌生长。

6.8 培养基效力

培养基效力主要指培养细胞获得产品的具体性能，应根据具体的用途，制定效力评价标准，如细胞生长的活细胞密度、比生长速率等，其批次间波动范围应不超过 $\pm 20\%$ 。

7 检验方法

7.1 外观

采用目测法进行测定。

7.2 pH（初始）

按要求浓度配制成培养基溶液后，按《中国药典2020年版四部0631pH值测定法》测定。

7.3 渗透压摩尔浓度

按要求浓度配制成培养基溶液后，按《中国药典2020年版四部0632渗透压摩尔浓度测定法》测定。

7.4 澄清度

按要求浓度配制成培养基溶液后，按《中国药典2020年版四部0902澄清度检查法》进行检查。

7.5 残留溶剂

按《中国药典2020年版四部0861残留溶剂测定法》进行测定。

7.6 有效成分含量

根据有效成分品类和特性，使用经确认有效的测试方法。

7.7 水分

按照《中国药典2020年版四部0832水分测试法》进行测试。

7.8 粒度分布

按照《中国药典2020年版四部0982粒度和粒度分布测定法》进行测定。

7.9 细菌内毒素

按照《中国药典2020年版四部1143细菌内毒素检查法》进行检查。

7.10 支原体

按《中国药典2020年版四部3301支原体检查法》或支原体PCR测试方法（附录1）

7.11 微生物限度（需氧菌总数和霉菌及酵母菌总数）

按《中国药典2020年版四部1105非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法》进行检查。

7.12 无菌检查

按《中国药典2020年版四部1101无菌检查法》进行检查。

7.13 细胞效力实验

根据培养基用途制定的具体效力评价指标特点，使用经确认有效的测试方法。

8 运输和贮存

8.1 运输

产品运输时应轻拿轻放，不得倒置，防压、防撞、防挤、防止暴晒、雨淋。运输时，应保证产品运输温度符合要求。

8.2 贮存

产品应室内存放，并满足产品标识的贮存条件。

堆放时需采取必要的防护措施，堆放高度要适当，避免包装损坏。

9 标识要求

9.1 产品说明书

产品使用说明书一般应包括以下内容：

- （1）产品名称及商标名称或图案；
- （2）产品的生产日期和保质期；
- （3）化学品安全信息；

(4) 储存要求;

(5) 溶液配制及使用说明。

10 参考文献

- [1]. 国家药典委员会.中华人民共和国药典(2020年版)三部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020: 5-7。
- [2]. 中国国家药品食品监督局. 干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)[Z]. 2015.7.31。
- [3]. 中国国家药品食品监督局. 细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行)[Z]. 2017.12.18。
- [4]. 国家药品监督管理局药品评审中心. 人源性干细胞产品药学研究与评价技术指导原则(征求意见稿)[Z]. 2021.8.17。
- [5]. The United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia: General Chapters[S]. 43th Edition. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2020: 7381.
- [6]. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Devices and Radiological Health. Tissue Culture Media for Human ex vivo Tissue and Cell Culture Processing Applications - Final Class II Special Controls Guidance Document for Industry and FDA Reviewers[Z]. 2001.5.16.
- [7]. The International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Quality Guidelines Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances[Z]. 1999.10.6

附录 1：支原体 PCR 测试方法

1. 试剂与材料

1. 50×TAE 缓冲液；
2. 琼脂糖；
3. 支原体检测试剂盒；
4. Gelsafe 核酸染料；
5. DNA Marker；
6. 薄壁 PCR 管 0.2 ml；
7. 分级微量离心管 1.5 ml。

2. 仪器

1. 核酸电泳仪；
2. 凝胶成像系统；
3. 洁净工作台；
4. PCR 扩增仪。

3. 操作步骤

3.1 缓冲液及凝胶配制

3.1.1 1×TAE 缓冲液

在烧杯中加入所需的 50×TAE 缓冲液，使用纯化水稀释，搅拌混匀，转移至量筒中按添加的 50×TAE 缓冲液的 50 倍体积进行定容，最后转移至溶剂瓶中。

3.1.2 电泳凝胶

称取琼脂糖放入 250 ml 三角烧瓶中（建议装量为 60~120 ml），加入 1×TAE 缓冲液，配制浓度为 0.01 g/ml，轻轻摇晃后放于微波炉中高火加热 1.5 min，取出摇匀。加入 0.01% 的 Gelsafe 核酸染料，晃动三角烧瓶混匀。将琼脂倒入组装完整的模具内，铺满透明制胶板，若凝胶中有杂质或气泡，用 10 μ l 枪头快速地将气泡赶至下端，室温冷却待凝胶凝固。琼脂完全凝固后，手压胶板边缘，将梳子快速拔出，凝胶上产生齿孔即为进样孔。

3.2 供试品制备

3.2.1 含脂肪酸样品

- 液体样品：取 10ml 样品置于带透气孔的离心管中，置于摇床 37°C、CO₂ 5% 条件下培养 3 天。
- 粉体样品：将粉体根据配制浓度使用无热原器皿进行溶解，过滤除菌，置于摇床 37°C、5% CO₂ 条件下培养 3 天。

3.2.2 不含脂肪酸样品

- 液体样品：直接测试。
- 粉体样品：将粉体根据配制浓度使用无热原器皿进行溶解后测试。

3.2.3 细胞液

- 贴壁细胞：细胞生长至 80% 瓶壁底面积以上，刮取细胞，取 150 μl 含 1~3×10⁵ 细胞数的细胞液至离心管。
- 悬浮细胞：细胞培养 24 h 以上，取 150 μl 1~3×10⁵ 细胞数至离心管。

3.3 PCR 样品制备

- 在洁净工作台内无菌取 500 μl 供试品（细胞液为 150 μl）至 1.5 ml 无菌离心管中，盖紧管口，沸水浴反应 10 min。
- 打开煮沸过的供试品的盖子，排除气体。在高速离心机中 12000 rpm 离心 2~5 min。
- 将支原体试剂盒中的 PCR 反应液和 Taq 酶在 2~8°C 冰箱中进行融化后用微型离心机瞬离，在洁净工作台中混匀。按下表配制混合液（N 为样品个数）并将混合液用枪头混匀，尽量不要产生气泡。

PCR 反应液	Taq 酶
$(N \times 2 + 2) \times 20 \times 1.1$	$(N \times 2 + 2) \times 1 \times 1.1$

在洁净工作台内以 21 μl 每管分装混合液至 PCR 管中，分装后应立即盖上管盖。

- 取细胞样品上清 4 μl 至上述 PCR 管中，作为样品组。取 4 μl 支原体检测试剂盒中 DNA 阳性对照至 PCR 管中，作为阳性对照。取 4 μl 内毒素检查用水至 PCR 管中作为阴性对照。取 3 μl 细胞样品上清和 1 μl DNA 阳性对照至 PCR 管中，作为样品+阳性对照组。样品制备过程需要在冰板上进行，加样顺序为阴性对照、样品、Marker、样品+阳性对照、阳性对照，每加完一个样品需立刻合上 PCR 管盖，避免交叉污染。加样完成后，应使用手指轻轻弹 PCR 管或用微型离心机离心去除气泡。

3.4 PCR 扩增

样品制备完成后，应尽快（尽量控制在 1h 以内）放入 PCR 扩增仪中扩增。扩增程序设置如下：

预变性 94°C 5min

循环	94°C 30 sec	}	30 个循环
	56°C 30 sec		
	72°C 45 sec		

延伸 72°C 5 min

3.5 电泳运行

- 向核酸电泳仪电泳槽中倒入足以浸没过胶板的缓冲液，将凝胶连带透明制胶模板一起放入电泳池中，胶板需完全浸没于缓冲液中，观察进样口是否有破损，观察胶面是否有明显不水平，应避免使用破损或泳道胶面不水平的进样口。
- 将 Marker (-20°C保存) 和样品置于带冰袋的试剂盒。将经 PCR 扩增仪扩增后的各个样品取 5 μ l 上样，阴性对照和样品组位于 Marker 左侧，阳性对照和样品阳性对照组位于 Marker 右侧，Marker 上样 5 μ l，记录样品顺序。每块胶板需有一个 Marker。
- 核酸电泳仪设置电压 120 V，恒压运行 30~60 min。

3.6 凝胶成像

使用凝胶成像系统进行凝胶成像。

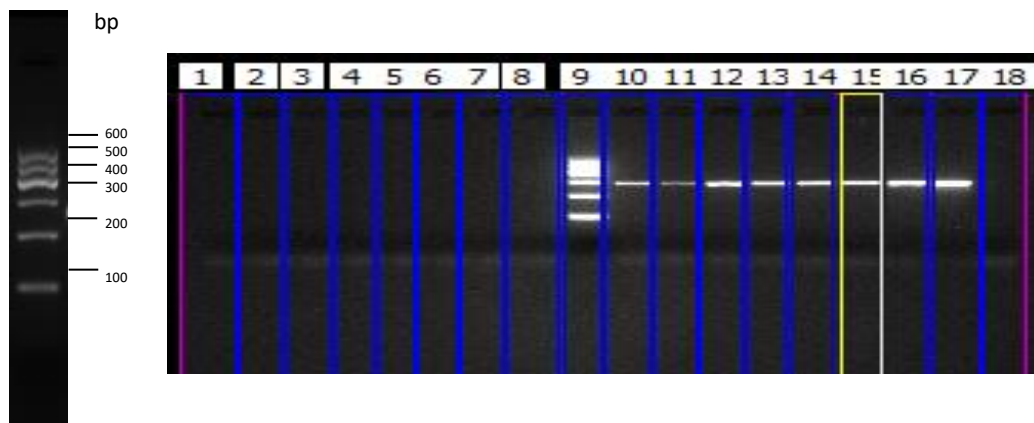
3.7 图谱分析

对电泳凝胶照片进行图谱分析。

3.8 结果判定

只有当阴性对照组无条带、阳性对照组和样品+阳性对照组有条带，且样品无条带或条带较亮，检测结果可信。符合条件时，样品无条带则无支原体检出，样品有条带则样品含支原体。

3.9 图谱示例



2: 阴性对照; 3~8: 样品; 9、Marker; 10~16: 样品+阳性对照; 17: 阳性对照