

## 3504 检验用细胞单层制备法（标准草案）

### 1 鸡胚成纤维细胞（CEF）单层的制备

选择 9~10 日龄发育良好的 SPF 鸡胚，先用碘酒棉消毒蛋壳气室部位，再用酒精棉脱碘，无菌取出鸡胚，去除头、四肢和内脏，放入灭菌的玻璃器皿内，用 M199 培养基或 PBS（0.01mol/L，pH 值 7.2~7.4，下同）洗涤胚体，用灭菌的剪刀剪成米粒大小的组织块，再用 M199 培养基或 PBS 洗 2~3 次，然后加 0.25%胰酶溶液（每枚鸡胚约加 4.0ml），置 37~38℃水浴中消化 20~30 分钟，吸出胰酶溶液，用 M199 培养基或 PBS 洗 2~3 次，再加入适量的营养液（用含 5%~10%犊牛血清 M199 培养基，加适宜的抗生素适量）吹打，用 8 层纱布（或 80~100 目尼龙网）滤过，制成每 1.0ml 中含活细胞约  $10^6 \sim 1.5 \times 10^6$  个的细胞悬液，分装于培养瓶中，置 37℃进行培养，约 24 小时后形成单层。

### 2 鸡胚皮肤细胞单层的制备

**方法 1** 选择 12~13 日龄发育良好的 SPF 鸡胚，先用碘酒棉消毒蛋壳气室部位，再用酒精棉脱碘，无菌取出鸡胚，放入灭菌的玻璃器皿内，用 M199 培养基或 PBS（0.01mol/L，pH 值 7.2~7.4，下同）洗涤胚体，再用灭菌的眼科镊子将皮肤轻轻地扒下，并将其放入灭菌的广口离心瓶中，用剪刀在广口离心瓶中剪碎，用 M199 培养基或 PBS 洗 2 次后，用 0.25%胰酶溶液（每枚鸡胚约加 4.0ml）置 37~38℃水浴中消化 20~25 分钟，然后吸出胰酶溶液，加入适量的营养液（用含 5%~10%犊牛血清 M199 培养基，加适宜的抗生素适量）吹打，用 8 层纱布（或 80~100 目尼龙网）滤过，制成每 1.0ml 中含活细胞数约 100 万个的细胞悬液，分装于培养瓶中置 37℃进行培养，约 24 小时后形成单层。

**方法 2** 选择 12~13 日龄发育良好的 SPF 鸡胚，先用碘酒棉消毒蛋壳气室部位，再用酒精棉脱碘，无菌取出鸡胚，置灭菌的烧杯中，用 M199 培养基或 PBS（0.01mol/L，pH 值 7.2~7.4）洗涤胚体，再用灭菌的镊子将胚夹入另一个放有磁棒的灭菌三角瓶中，加 37℃的 0.25%胰酶溶液（每枚鸡胚 8.0~10ml），置磁力搅拌器上以低速搅拌消化约 20~25 分钟，取出，加入适量含血清的 M199 培养基中止消化。将胰酶及消化下来的细胞（即鸡胚皮肤细胞）液倒出，底部液用 1 层纱布（或 30 目尼龙网）滤过。以 1000r/min 离心 10 分钟，吸去上清液，加入适量培养液，吹打分散细胞，用 8 层纱布（或 80~100 目尼龙网）滤过。根据细胞数加入所需的营养液（用含 5%~10%犊牛血清 M199 培养基，加适宜的抗生素适量），制成每 1.0ml 中含活细胞约 100 万个的细胞悬液，分装于培养瓶中，置 37℃进行培养，约 24 小时后形成单层。

### 3 鸡胚肝细胞单层的制备

选择 14~16 日龄发育良好的 SPF 鸡胚，先用碘酒棉消毒蛋壳气室部位，再用酒精棉脱碘。无菌取出胎儿肝脏放置在含有 PBS（0.01mol/L，pH 值 7.2~7.4）的灭菌玻璃器皿内，并用 PBS 润洗肝脏组织 2~3 次，然后用无菌剪刀将肝脏剪至 2.0mm<sup>3</sup> 的碎块，加入 0.05% EDTA-胰蛋白酶溶液，10ml/胚，放置于灭菌玻璃器皿内，加无菌的磁力搅拌棒后，置 37℃水浴磁力搅拌 5 分钟，静止 1 分钟后，弃去上清液。

肝组织中再加入 0.05% EDTA-胰蛋白酶溶液，置 37℃搅拌 5 分钟，静止 1 分钟，将上清液倒入或用无菌吸管吸至冰浴的无菌玻璃器皿中，加约 20%的胎牛血清或新生牛血清。可根据肝组织消化情况，重复用 0.05% EDTA-胰蛋白酶溶液消化 2~3 次。

收集的上清液用 8 层纱布过滤后，2~8℃条件下，以 2000r/min 离心 10 分钟，弃上清，细胞沉淀用培养基（含 10%胎牛血清或新生牛血清和适量适宜抗生素的 M199 培养基，7.5%碳酸氢钠溶液调 pH 值至 7.0）恢复至适宜浓度后进行细胞计数。

根据细胞计数结果，用培养基将细胞悬液的浓度调整至  $1.0 \times 10^6 \sim 1.4 \times 10^6$  个/ml，加入到细胞培养瓶或细胞板中置  $37^\circ\text{C}$ 、含  $5\% \text{CO}_2$  条件下培养，约 24 小时后形成单层。

#### 4 仓鼠或乳兔肾细胞单层的制备

选择 10~20 日龄仓鼠或乳兔，放血致死，无菌条件下，由仓鼠或乳兔背部摘取肾脏，用 MEM 培养基洗 2~3 次后，剖开肾脏，剔除髓质部组织，将其皮质部组织剪成  $1 \sim 2 \text{mm}^3$  小块，用 MEM 培养基洗 2~3 次后，按组织重量的 5 倍加入  $0.25\%$  胰酶溶液，置  $37^\circ\text{C}$  水浴消化 30~40 分钟，除去胰酶溶液后，加入适量的细胞生长液（用含  $10\% \sim 20\%$  胎牛血清或新生牛血清的 MEM 培养基，加适宜的抗生素适量）吹打，用 12 层纱布滤过后，以  $2000 \text{r/min}$  离心 5~10 分钟，弃上清，然后用适量含  $10\% \sim 20\%$  胎牛血清或新生牛血清的 MEM 培养基重悬细胞沉底至适宜浓度后进行细胞计数，根据细胞计数结果，用细胞生长液（含  $10\% \sim 20\%$  胎牛血清或新生牛血清的 MEM 培养基）制成每  $1.0 \text{ml}$  中含  $6 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$  个细胞的悬液。将细胞置  $37^\circ\text{C}$  培养，2~4 日后形成单层。

#### 5 鸡胚肾细胞单层的制备

选择 17~20 日龄发育良好的 SPF 鸡胚，先用碘酒棉消毒蛋壳气室部位，再用酒精棉脱碘，无菌取出鸡胚胚体放置于无菌的玻璃器皿内。将胚体剥皮去毛，打开胚体的胸腔和腹腔，小心用无菌镊子仔细分离肾脏包膜，取出肾脏放置于另一无菌玻璃器皿内，并用 PBS ( $0.01 \text{mol/L}$ , pH 值  $7.2 \sim 7.4$ ，下同) 洗 2~3 次，然后用无菌剪刀将其剪至  $1.0 \text{mm}^3$  的组织碎块。肾组织碎块继续用 PBS 洗 2 次，加入  $0.25\%$  胰酶溶液 ( $5 \text{ml/胚}$ )，置  $37^\circ\text{C}$  水浴消化 20~30 分钟，间隔 5 分钟轻轻摇晃 1 次。消化结束后静置 5 分钟，吸弃胰酶上清，加入 PBS 洗 2~3 次，每次轻轻摇晃后静置 5 分钟，吸弃上清。最后加入适量的营养液（含  $10\%$  胎牛血清和适量适宜抗生素的 M199 培养基）吹打，用 8 层纱布（或 80~100 目尼龙网）滤过，制成每  $1.0 \text{ml}$  中含活细胞约  $10^6$  个的细胞悬液，加入到细胞培养瓶或细胞板中置  $37^\circ\text{C}$ 、含  $5\% \text{CO}_2$  条件下培养。

#### 修订说明：

1. 本标准是在 2020 年《中国兽药典》三部附录 3504 的基础上修订而成。

2. 鸡胚成纤维细胞 (CEF) 单层的制备项中把“ $38^\circ\text{C}$  水浴”修订为“ $37 \sim 38^\circ\text{C}$  水浴”；将“进行培养”修订为“置  $37^\circ\text{C}$  进行培养”；将“形成单层后备用”修订为“约 24 小时后形成单层”；将“汉氏液”修订为“M199 培养基或 PBS”；将“乳含液”修订为“M199 培养基”。属于规范性修改。

3. 鸡胚皮肤细胞单层的制备项下方法 1 中把“ $38^\circ\text{C}$  水浴”修订为“ $37 \sim 38^\circ\text{C}$  水浴”；“营养液”后加上“（用含  $5\% \sim 10\%$  犊牛血清 M199 培养基，加适宜的抗生素适量）”；将“置  $30^\circ\text{C}$  温箱中培养”修订为“置  $37^\circ\text{C}$  进行培养”；删除“形成单层后即可进行病毒接种（一般在培养后 24 小时内应用）”。方法 2 中“营养液”后加上“（用含  $5\% \sim 10\%$  犊牛血清 M199 培养基，加适宜的抗生素适量）”；将“置  $30^\circ\text{C}$  温箱中培养”修订为“置  $37^\circ\text{C}$  进行培养”；将“形成单层后即可进行病毒接种（一般在培养后 24 小时内应用）”修订为“约 24 小时后形成单层”；将“汉氏液”修订为“M199 培养基或 PBS”；将“乳含液”修订为“M199 培养基”。属于规范性修改。

4. 鸡胚肝细胞单层的制备项中，将“取”修改为“选择”；将“M-199, 10% 胎牛血清或新生牛血清，适量双抗，”修订为“含  $10\%$  胎牛血清或新生牛血清和适量适宜抗生素的 M199 培养基，”将“置  $37^\circ\text{C}$  条件下培养”修订为“置  $37^\circ\text{C}$ 、含  $5\% \text{CO}_2$  条件下培养”。将“EDTA-胰蛋白酶溶液”修订为“ $0.05\%$  EDTA-胰蛋白酶溶液”。属于规范性修改。

5. 将仓鼠或乳兔肾细胞单层的制备项中操作内容进一步细化，并将“mm”修改为“ $\text{mm}^3$ ”

6. 依据生产实际发展需要增加了鸡胚肾细胞单层的制备项。

7. 依据第5次会议意见，将“细胞单层制备法”应改为“检验用细胞单层制备法”。其具体作用是适用于检验用单层细胞的制备方法；删除了“汉氏液”说法，改为“M199培养基或PBS（0.01mol/L，pH值7.2~7.4）”；标准中“多层纱布”缺少标准，依据中国兽医药品监察所检验的经验做法已经改为“8层纱布”。

8. 对部分文字进行规范性修改。

兽药标准