



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 106980023 B

(45)授权公告日 2018.12.21

(21)申请号 201710283822.9

(22)申请日 2017.04.26

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106980023 A

(43)申请公布日 2017.07.25

(73)专利权人 肇庆大华农生物药品有限公司

地址 526238 广东省肇庆市大旺经济开发区丰盈工业园内

专利权人 华南农业大学

(72)发明人 徐家华 陈瑞爱 刘郁夫 路静

张舒琼 吴达兴 廖世昌

(74)专利代理机构 广州市越秀区哲力专利商标

事务所(普通合伙) 44288

代理人 谢嘉舜

(51)Int.Cl.

G01N 33/96(2006.01)

(56)对比文件

CN 101497649 A, 2009.08.05, 全文.

CN 101474208 A, 2009.07.08, 全文.

刘学平等.新生牛血清促牛肾细胞生长试验测定方法的建立.《微生物学免疫学进展》.2010,第38卷(第3期),

马桂兰等.胎牛血清和新生牛血清体外培养动物细胞的比较.《黑龙江农业科学》.2014,(第2期),

审查员 王在竹

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种牛血清质量评价的方法

(57)摘要

本发明公开一种牛血清质量评价方法,包括以下步骤:1)消化:使用0.25%EDTA-胰酶溶液消化细胞,分散成单个细胞;2)加培养基:取两份单个细胞,分别加入含5%被评价牛血清的培养基10mL,混匀;3)进行1000、10000、10000倍稀释,加至96孔细胞板;4)挑选出含有单个细胞的孔;5)计数:分别在48h、72h、96h计数。该方法可以避免由于牛血清浓度差异导致细胞增殖不好,能快速高效地筛选出高品质牛血清。

1. 一种牛血清质量评价方法,包括以下步骤:

1) 消化:使用0.25%EDTA-胰酶溶液消化生长状态良好且致密的细胞,使细胞分散成单个细胞;

2) 加培养基:取两份步骤1)得到的细胞,编号A、B,向A号细胞中加入含5%被评价牛血清的培养基10mL,混匀;向B号细胞中加入10%被评价牛血清的培养基10mL,混匀;所述培养基为DMEM培养基;

3) 稀释:用5%被评价牛血清的培养基对A号细胞进行1000、10000、10000倍稀释,将细胞溶液加入96孔细胞板,每孔200 μ L;用10%被评价牛血清的培养基对B号细胞进行1000、10000、10000倍稀释,将细胞溶液加入96孔细胞板,每孔200 μ L;

4) 挑选:在显微镜下面观察细胞的状态,筛选出含有单个细胞的孔;统计A号细胞和B号细胞单个细胞的孔的数量之和;

5) 计数:分别在48h、72h、96h显微镜观察步骤4)的单个细胞的孔内的细胞状态并统计细胞增殖数量。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤1)中,所述细胞为AD293细胞。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤1)中,所述细胞为Vero细胞。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤1)中,所述细胞为PK-15细胞。

一种牛血清质量评价的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种牛血清质量评价的方法,属于兽用生物制品技术领域。

背景技术

[0002] 血清是兽用细胞疫苗生产的重要原材料。《中国生物制品主要原辅材料质控标准》(2000版)记录了牛血清的质量标准8项,并且已于2000年10月1日正式实施,必须从源头上加强生物制品生产用原辅(起始)材料的控制。粗制牛血清是整个牛血清制成品质控的基础。其中,细菌内毒素、血红蛋白、支原体、牛病毒等项目,如果在粗制血清生产过程中失控,在今后的生产过程中将没有任何技术手段清除此类污染,造成无法挽回的损失。同时,由于血清受来源地牛的品质影响,虽然在细菌内毒素、血红蛋白、支原体、牛病毒等项目合格,但从很难从外观上区分胎牛血清、新生牛血清、小牛的血清或者是混合血清的异同。但是它们在营养、细胞因子含量等方面存在显著差异。通常只能从细胞培养传代才能发现血清的品质差异。而很多细胞在正常传代时,血清差异表现不显著;只有当细胞连续传代3-5代以后才能逐渐从细胞状态的差异间接反映血清的品质。

发明内容

[0003] 为了克服现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种快速、高效的牛血清质量评价方法。

[0004] 实现本发明的目的可以通过采取如下技术方案达到:

[0005] 一种牛血清质量评价方法,包括以下步骤:

[0006] 1) 消化:使用0.25%EDTA-胰酶溶液消化生长状态良好且致密的细胞,使细胞分散成单个细胞;

[0007] 2) 加培养基:取两份步骤1)得到的细胞,编号A、B,向A号细胞中加入含5%被评价牛血清的培养基10mL,混匀;向B号细胞中加入10%被评价牛血清的培养基10mL,混匀;

[0008] 3) 稀释:用5%被评价牛血清的培养基对A号细胞进行1000、10000、10000倍稀释,将细胞溶液加入96孔细胞板,每孔200 μ L;用10%被评价牛血清的培养基对B号细胞进行1000、10000、10000倍稀释,将细胞溶液加入96孔细胞板,每孔200 μ L;

[0009] 4) 挑选:在显微镜下面观察细胞的状态,筛选出含有单个细胞的孔;

[0010] 5) 计数:分别在48h、72h、96h显微镜观察步骤4)的单个细胞的孔内的细胞状态并计数。

[0011] 作为优选,步骤1)中,所述细胞为AD293细胞。

[0012] 作为优选,步骤1)中,所述细胞为Vero细胞。

[0013] 作为优选,步骤1)中,所述细胞为PK-15细胞。

[0014] 作为优选,步骤2)中,所述培养基为DMEM培养基。

[0015] 本发明的配方设计原理如下:

[0016] 本发明使用消化好的细胞,采用两种浓度的被评价牛血清,按10倍率进行稀释,得

到含有单个细胞的孔板,进行培养,从而从中选择两种牛血清浓度下,均能较好地使超过80%的细胞正常增殖的好品质血清。

[0017] 相比现有技术,本发明的有益效果在于:本发明提供的方法可以避免由于牛血清浓度差异导致细胞增殖不好,更好更加科学更快速的评价牛血清在细胞增殖能力的差异,能快速高效地筛选出高品质牛血清。

具体实施方式

[0018] 下面,结合具体实施方式,对本发明做进一步描述:

[0019] 以下具体实施方式中,如未特殊说明,所采用的试剂或仪器均可以通过市售的途径获得。以下具体实施例中,所采用的培养基为gibco公司生产的DMEM培养基。以下具体实施方式中,如未特殊说明,所述的浓度均为重量浓度。

[0020] 实施例1:

[0021] 一种牛血清质量评价方法,包括以下步骤:

[0022] 1) 消化:使用0.25%EDTA-胰酶溶液消化1瓶T25生长状态良好且致密的AD293细胞,使细胞分散成单个细胞;

[0023] 2) 加培养基:取两份步骤1)得到的细胞,编号A、B,向A号细胞中加入含5%被评价牛血清的培养基10mL,混匀;向B号细胞中加入10%被评价牛血清的培养基10mL,混匀;

[0024] 3) 稀释:用5%被评价牛血清的培养基对A号细胞进行1000、10000、10000倍稀释,将细胞溶液加入96孔细胞板,每孔200 μ L;用10%被评价牛血清的培养基对B号细胞进行1000、10000、10000倍稀释,将细胞溶液加入96孔细胞板,每孔200 μ L;

[0025] 4) 挑选:在显微镜下面观察细胞的状态,筛选出含有单个细胞的孔,统计A号细胞和B号细胞单个细胞的孔的数量之和;

[0026] 5) 计数:分别在48h、72h、96h显微镜观察细胞状态并计数,统计细胞增殖数量。

[0027] 统计单个细胞增殖数量如下表所示,结果表明,3号的胎牛血清最适合用于培养AD293细胞。

[0028] 表1牛血清对AD293细胞培养的影响

编号	血清类别	单个细胞孔的数量	平均增值数量		
			48h	72h	96h
1 号	胎牛	20	40	58	92
	新生牛	25	39	48	60
	小牛	19	19	/	/
2 号	胎牛	23	39	50	85
	新生牛	21	25	30	/
	小牛	22	22	/	/
3 号	胎牛	30	64	85	195
	新生牛	28	35	48	75
	小牛	25	25	/	/

[0030] 实施例2:

[0031] 一种牛血清质量评价方法,包括以下步骤:

[0032] 1) 消化:使用0.25%EDTA-胰酶溶液消化1瓶T25生长状态良好且致密的Vero细胞,

使细胞分散成单个细胞；

[0033] 2) 加培养基：取两份步骤1) 得到的细胞，编号A、B，向A号细胞中加入含5%被评价牛血清的培养基10mL，混匀；向B号细胞中加入10%被评价牛血清的培养基10mL，混匀；

[0034] 3) 稀释：用5%被评价牛血清的培养基对A号细胞进行1000、10000、10000倍稀释，将细胞溶液加入96孔细胞板，每孔200μL；用10%被评价牛血清的培养基对B号细胞进行1000、10000、10000倍稀释，将细胞溶液加入96孔细胞板，每孔200μL；

[0035] 4) 挑选：在显微镜下面观察细胞的状态，筛选出含有单个细胞的孔，统计A号细胞和B号细胞单个细胞的孔的数量之和；

[0036] 5) 计数：分别在48h、72h、96h显微镜观察细胞状态并计数，统计细胞增殖数量。

[0037] 统计单个细胞增殖数量如下表所示，结果表明，1号的胎牛血清最适合用于培养Vero细胞。

[0038] 表2牛血清对vero细胞培养的影响

编号	血清类别	单个细胞的孔的数量	平均增值数量		
			48h	72h	96h
1 号	胎牛	15	30	75	195
	新生牛	12	23	53	115
	小牛	13	26	50	98
2 号	胎牛	11	22	53	132
	新生牛	15	28	60	131
	小牛	12	18	32	55
3 号	胎牛	8	15	36	89
	新生牛	11	19	42	99
	小牛	12	17	28	40

[0040] 实施例3

[0041] 一种牛血清质量评价方法，包括以下步骤：

[0042] 1) 消化：使用0.25%EDTA-胰酶溶液消化1瓶T25生长状态良好且致密的PK-15细胞，使细胞分散成单个细胞；

[0043] 2) 加培养基：取两份步骤1) 得到的细胞，编号A、B，向A号细胞中加入含5%被评价牛血清的培养基10mL，混匀；向B号细胞中加入10%被评价牛血清的培养基10mL，混匀；

[0044] 3) 稀释：用5%被评价牛血清的培养基对A号细胞进行1000、10000、10000倍稀释，将细胞溶液加入96孔细胞板，每孔200μL；用10%被评价牛血清的培养基对B号细胞进行1000、10000、10000倍稀释，将细胞溶液加入96孔细胞板，每孔200μL；

[0045] 4) 挑选：在显微镜下面观察细胞的状态，筛选出含有单个细胞的孔，统计A号细胞和B号细胞单个细胞的孔的数量之和；

[0046] 5) 计数：分别在48h、72h、96h显微镜观察细胞状态并计数，统计细胞增殖数量。

[0047] 统计单个细胞增殖数量如下表所示，结果表明，1号的胎牛血清最适合用于培养PK-15细胞。

[0048] 表3牛血清对PK-15细胞培养的影响

[0049]

编号	血清类别	单个细胞的孔 的数量	平均增值数量		
			48h	72h	96h
1 号	胎牛	8	20	45	103
	新生牛	10	15	20	35
	小牛	9	9	/	/
2 号	胎牛	7	15	33	70
	新生牛	7	10	15	25
	小牛	9	9	/	/
3 号	胎牛	9	20	44	95
	新生牛	10	22	33	45
	小牛	8	9	/	/

[0050] 注：/表示细胞死亡。

[0051] 对于本领域的技术人员来说,可根据以上描述的技术方案以及构思,做出其它各种相应的改变以及变形,而所有的这些改变以及变形都应该属于本发明权利要求的保护范围之内。