

YIMIAO ZHILIANG BIAOZHUN YU SHIYONG
JIANDU GUANLI SHOUC

疫苗

主编 范天吉

质量控制标准与使用 监督管理手册



吉林音像出版社

疫苗质量控制标准与使用 监督管理手册

(第三卷)

吉林音像出版社

辣根过氧化物酶标记免疫球蛋白 结合物制造及检定要求

1 定义、组成及用途

本品系用冻干辣根过氧化物酶（HRP）经过碘酸盐氧化法或其他适宜方法标记抗人或抗动物 Ig 制造而成，供 ELISA 等试验用。

2 制 造

2.1 基本要求

2.1.1 设备与生产质量管理

按中国《药品生产质量管理规范》要求实施。

2.1.2 原料及辅料

应符合现行《中国药典》或《中国生物制品主要原辅材料质控标准》要求。未纳入上述标准的化学试剂，应不低于化学纯。

2.1.3 动物

使用具有实验动物等级合格证的动物。

2.2 抗-Ig 的制备

按本版规程《人免疫球蛋白 G、A、M、D、E 诊断血清制造及检定规程》进行。

2.2.1 用于标记的免疫血清，需经中性盐沉淀，离子交换层析纯化后方可使用。

2.2.2 纯化抗体（15~20mg/ml 时）的琼脂糖双扩散效价不应低于 1:32 倍稀释。

2.2.3 纯化后的抗体应保存于 -20℃ 备用。

2.3 HRP 标记

2.3.1 用于标记的 HRP，RZ 应不低于 3.0。

2.3.2 标记方法为过碘酸盐氧化法或其他适宜方法。

2.3.3 标记程序

2.3.3.1 标记抗体前，HRP 应先经过碘酸钠或其他试剂活化。

2.3.3.2 待标记的抗体调整到适当的浓度，然后再以适当比例加入到酶液中。

2.3.3.3 HRP 的处理及偶联抗体应在避光、温和搅拌下进行。

2.3.3.4 偶联抗体的温度应保持在 25℃ 以下，pH 值应维持在 9.0 ~ 9.5。

2.3.3.5 标记后，应在偶联液内加入硼氢化钠 (NaBH_4)，使其成为稳定的标记物。

2.4 纯化

标记好的标记物需经 50% 饱和硫酸铵沉淀，或用国家药品检定机构认可的方法去除游离的酶。

2.5 液体标记物的保存

2.5.1 液体标记物应保存于 -20℃ 以下。

2.5.2 保存于 -20℃ 以下的标记物解冻后如出现絮状沉淀，应离心去除沉淀，重新检定后再使用。

2.6 半成品检定

2.6.1 外观

液体标记物（原液）应为棕黄色无沉淀的透明液体。

2.6.2 效价测定 (ELISA)

2.6.2.1 ELISA 用的固相载体为聚苯乙烯微孔板，使用前应先测定每批微孔板有无板间差异及孔间差异，如无明显差异方可使用。

2.6.2.2 包被

(1) 包被蛋白质浓度为 5 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，包被量为 0.20ml/孔。

(2) 包被后在适当条件充分反应。

2.6.2.3 加标记抗体

标记抗体应根据需要做不同倍数的稀释，每个稀释度不少于两孔，每孔加量 0.20ml，置适当条件下充分反应。试验应以未包被孔为对照。

2.6.2.4 加底物液显色

用邻苯二胺 (OPD) 和过氧化氢 (H_2O_2) 底物溶液，亦可用其他底物系统。底物显色 15 ~ 30 分钟后以 1mol/L 硫酸终止反应。

2.6.2.5 结果判定

用酶标仪测定 492nm 吸光值 (A 值)，当阴性对照孔 A 值被削减为 0 时，待检标记抗体 A 值达 1.0 时的标记抗体稀释倍数，可作为该标记抗体的工作稀释度。

2.6.3 RZ 值的测定

RZ 值一般要求在 0.3 ~ 0.7。

2.6.4 物质的量比值测定

标记抗体的物质的量比值以 1.0~2.0 为宜。

2.7 分装与冻干

酶标记抗体检定合格后,经适当稀释,加入适宜保护剂后分装冻干。

3 成品检定

3.1 外观

为白色疏松体,按标示量加蒸馏水溶解后应澄明,无沉淀。

3.2 水分

应不高于 3.0%。

3.3 效价测定

按 2.6.2 项进行,效价应不低于 1:50 倍稀释。

4 保存及有效期

于 2~8℃ 避光保存。自成品检定合格之日起有效期为 3 年。

5 使用说明

本品系用辣根过氧化物酶 (HRP) 经过碘酸盐氧化法或其他适宜方法标记抗-Ig 制造而成,供 ELISA 等试验用。

使用方法

使用时按标示量加蒸馏水溶解。根据试验目的选择方法及工作稀释度,供酶联免疫试验、免疫组织化学染色法等试验用。如作酶联免疫检测试验 (ELISA),可根据盒签上的稀释度加 PBS (pH7.4) - 聚山梨酯 20 (PBS-T) 适当稀释即可用。

保存

于 2~8℃ 避光保存,在有效期内使用。

生物素标记免疫球蛋白 G 制造及检定要求

1 定义、组成及用途

本品系用生物素标记于经纯化的抗 - IgG 制成, 可用于各种生物素一亲和素 (ABC) ELISA 检测技术。

2 制 造

2.1 基本要求

2.1.1 设备与生产质量管理

按中国《药品生产质量管理规范》要求实施。

2.1.2 原料及辅料

应符合现行《中国药典》或《中国生物制品主要原辅材料质控标准》要求。未纳入上述标准的化学试剂, 应不低于化学纯。

2.1.3 动物

使用具有实验动物等级合格证的动物。

2.2 起始原料

抗体制备按本版规程《人免疫球蛋白 G、A、M、D、E 诊断血清制造及检定规程》进行。

2.3 制备程序

2.3.1 透析

取一定量的纯化抗 - IgG 在碳酸氢钠溶液中透析数小时。

2.3.2 溶解

取一定量的生物素酰 - N - 羟基丁二酰亚胺 (BNHS) 溶于二甲基甲酰胺 (DMF) 中。

2.3.3 反应

将上述处理的纯化抗 - IgG 和 BNHS 以一定的比例混合, 置 22℃ 反应数小时, 然后将反应物在 PBS 中透析过夜, 即得生物素标记抗 - IgG。

2.4 保存

上述生物素标记抗 - IgG 加适量甘油, 保存于 - 20℃ 以下。

2.5 半成品检定

2.5.1 外观

为无色透明溶液。

2.5.2 ABC ELISA 试验

用经纯化的抗原包板，置 4℃ 过夜后洗涤 3 次。加待检的第一抗体反应 1 小时后洗涤，再加生物素化的第二抗体，温育后再次洗涤，然后加 ABC 复合物反应后洗涤，加底物显色。

2.5.3 特异性

与相应的抗原 ELISA 试验应呈阳性，与非相应的抗原应呈阴性。

2.6 分装

经检定合格的半成品即可分装。每支装量为 0.25ml。

3 成品检定

3.1 外观

为无色透明溶液。

3.2 ABC ELISA 试验

按 2.5.2 项进行。

3.3 特异性

按 2.5.3 项进行。

4 保存及有效期

保存于 -20℃ 以下。自成品检定合格之日起有效期为 1 年。

5 使用说明

本品系用生物素标记于经纯化的抗 - IgG 制成，可用于各种生物素 - 亲和素 ELISA 检测技术。

规格

0.250ml/安瓿。

使用方法

(1) 生物素经活化后，可与高比度偶联抗体等反应物质和酶等标记材料分别形成生物素标记抗体和生物素衍生物，可分别用于以动物或人源性抗体为第一抗体的免疫反应系统检测。

(2) 加稀释液到标示量，根据试验目的选择适宜的工作稀释度。

保存

于 -20℃ 以下保存，切勿反复冻融。在有效期内使用。

荧光标记免疫球蛋白制造及检定要求

1 定义、性状及用途

本品系用异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记于经纯化后的抗 - Ig 制成, 用于各种免疫荧光技术。

2 制 造

2.1 基本要求

2.1.1 设施与生产质量管理

按中国《药品生产质量管理规范》要求实施。

2.1.2 原料及辅料

应符合现行《中国药典》或《中国生物制品主要原辅材料质控标准》要求。未纳入上述标准的化学试剂, 应不低于化学纯。

2.1.3 动物

使用具有实验动物等级合格证的动物。

2.2 抗 - Ig

2.2.1 抗 Ig 的制备

参照《人免疫球蛋白 G、A、M、D、E 诊断血清制造及检定规程》及《抗免疫球蛋白 G 血清制造及检定要求》进行。

2.2.2 抗 Ig 经纯化后即可用于标记。

2.3 标记

2.3.1 将抗体蛋白质用 0.010mol/L pH9.5 碳酸盐缓冲液稀释成适宜浓度。

2.3.2 称取荧光素 (应不高于蛋白质质量的 2% ~ 3%), 用 0.20mol/L Na_2HPO_4 充分溶解。

2.3.3 将荧光素溶液在搅拌下缓缓滴入抗体蛋白液中, 并用 0.10mol/L 磷酸钠调 pH 值至 9.0 ~ 9.5。在标记过程中维持 pH 值稳定。

2.3.4 标记应在 18 ~ 25℃ 进行, 标记时间为 2 小时。若在 2 ~ 5℃ 进行, 搅拌 2 小时后放置 4℃ 过夜。

2.3.5 将标记抗体液过 Sephadex G-25 柱, 以去除游离荧光素。收集

第一峰保存于 2~8℃。

2.4 半成品检定

2.4.1 物理检查

本品为黄绿色澄明液体，无不溶物。

2.4.2 荧光素与抗体蛋白质的比值 (F/P)

以 1~2 为宜。

2.4.3 效价测定

2.4.3.1 免疫双扩散试验

用 10~15g/L 琼脂制板，中心孔加入 Ig (1.0mg/ml) 10 μ l，周围各孔加 2 倍系列稀释的荧光抗体 10 μ l，于湿盒中，置 37℃ 20~24 小时。以出现肉眼可见的清晰沉淀线的最高稀释度为其效价。荧光抗体免疫双扩散效价应在 1:4 以上。

2.4.3.2 免疫荧光法

将荧光抗体作倍比稀释后，滴加于相应抗原标本上，于 37℃ 反应。每次试验都应以阴性血清为对照。反应后经 PBS 浸洗，吹干后于荧光显微镜下观察，并以“-”及“+”、“++”、“+++”、“++++”判定结果。以出现“++”的最高稀释度为抗体效价，应不低于 1:8。

2.4.4 特异性

按效价稀释的荧光标记抗体做间接染色检查，与以相应血清为第一抗体的抗原片呈强荧光，与非相应的其他动物血清为第一抗体的抗原片应无荧光。

2.5 分装与冻干

液体制品半成品经检定合格后，加 1.0g/L 叠氮钠 (NaN₃) 为防腐剂，即可进行分装。冻干制品在冻干前，荧光抗体需经高速离心除去沉淀，加适宜保护剂及 1.0g/L 叠氮钠防腐剂，装量为 0.50ml/安瓿或 2ml/安瓿，进行冻干。

3 成品检定

3.1 物理检查

3.1.1 外观

液体制品为淡黄色澄明液体；冻干制品为淡黄色疏松体。

3.1.2 溶解时间

冻干制品加水后应在 1 分钟内溶解。

3.2 水分

应不高于 4.0%。

3.3 效价测定

按 2.4.3 项进行。

3.4 特异性

按 2.4.4 项进行。

4 保存及有效期

于 2~8℃避光保存。自成品检定合格之日起，液体制品有效期为 1 年，冻干制品有效期为 3 年。

5 使用说明

本品系用异硫氰酸荧光素（FITC）标记于经纯化后的抗-Ig 制成，适用于各种免疫荧光检测技术。

使用方法

使用时每瓶按标示量加蒸馏水溶解，荧光抗体稀释度见盒签所载。

染色方法

按间接荧光法进行，将标本涂片，固定，然后在标本上滴加特异性抗体，及其他非特异性抗体，并设阴性对照片，置湿盒内反应后冲洗，晾干，再滴加荧光抗体，方法同上，最后用蒸馏水冲洗几遍，晾干标本，加甘油封片镜检。

荧光抗体和特异性抗体稀释度须适当，应染成明亮的特异性荧光，与非特异性荧光可明显区别。

注意事项

- (1) 本品若有少量沉淀或轻微混浊，可离心除去沉淀，不影响使用。
- (2) 荧光抗体诊断血清的稀释液及冲洗玻片的缓冲液为 0.01mol/L pH7.0~7.4PBS。

保存

于 2~8℃避光保存，在有效期内使用。

抗鼠免疫球蛋白 G 及其亚类血清制造及检定要求

1 定义、性状及用途

本品系从分泌单克隆抗体 IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}和 IgG₃ 杂交瘤细胞的培养上清或细胞诱生的腹水, 分别提取纯化鼠 IgG 亚类抗原免疫动物所得抗血清, 经固相吸收除去其中非特异组分制成。供免疫双扩散试验检测鼠 IgG 及其亚类用。

2 制 造

2.1 基本要求

2.1.1 设备与生产质量管理

按中国《药品生产质量管理规范》要求实施。

2.1.2 原料及辅料

应符合现行《中国药典》或《中国生物制品主要原辅材料质控标准》要求。未纳入上述标准的化学试剂, 应不低于化学纯。

2.1.3 动物

使用有实验动物等级合格证的动物。

2.2 细胞库的建立

2.2.1 杂交瘤细胞库的来源

经检定合格的分泌鼠 IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}和 IgG₃ 4 个亚类的单克隆抗体细胞株需由国家药品检定机构分发或认可。

2.2.2 原始细胞库

杂交瘤细胞株经几次克隆筛选, 以 100% 克隆孔上清相应抗体阳性的作为原始细胞株。

2.2.3 主细胞库

原始细胞株经传代, 稳定分泌特异性抗体的杂交瘤细胞株, 经无菌试验、支原体检查为阴性者, 冻存为主细胞库。

2.2.4 工作细胞库

主细胞库细胞经扩增、冻存为工作细胞, 生产时取出扩增, 不得重新冻存使用。

2.3 制备程序

2.3.1 鼠 IgG 及其亚类抗原的制备

2.3.1.1 诱生腹水

扩种细胞配制成细胞悬液，注射于经石蜡油等处理的纯种鼠腹腔，数天后抽取腹水。

2.3.1.2 鼠 IgG 及其亚类抗原的纯化

诱生之腹水中的鼠 IgG 及其 IgG 亚类抗原可用亲和层析法或国家药品检定机构认可的方法纯化。

2.3.2 鼠 IgG 及其亚类抗原的鉴定

2.3.2.1 纯度

纯化的 IgG 4 个亚类抗原用免疫电泳和免疫扩散法测定。与抗鼠全血清、抗鼠 IgG 均有沉淀线，各亚类抗原与相应的抗鼠 IgG 亚类抗血清呈单一沉淀线，与其他亚类及鼠的其他血清蛋白抗体无交叉反应。

2.3.2.2 蛋白质含量

纯化的 4 个亚类抗原用紫外分光光度计于 280nm 波长处测定，应不低于 0.50mg/ml。

2.4 抗鼠 IgG 亚类血清的制备

2.4.1 免疫

上述纯化的 4 个亚类抗原，分别免疫健康家兔或其他动物。

2.4.2 采血

试血效价合格后采血，分离血清，加入适宜防腐剂。

2.4.3 抗血清的纯化

经粗提的抗血清，可用亲和层析法或国家药品检定机构认可的方法纯化。

2.4.4 除菌过滤

抗血清用 0.22 μ m 膜除菌过滤。

2.5 半成品检定

2.5.1 效价测定

用免疫双扩散测定各亚类血清，其效价应不低于 1:8 倍稀释。

2.5.2 纯度

各抗血清用免疫电泳和免疫扩散法测定。与正常鼠全血清及相应 IgG 亚类抗原呈单一沉淀线，对其他亚类抗原、正常人血清、牛血清应无沉淀线。

2.5.3 无菌试验

按本版规程通则《生物制品无菌试验规程》A3.2.3 项进行。

2.6 分装与冻干

经半成品检定合格后即可分装，亦可加入适宜保护剂后分装冻干。

3 成品检定

3.1 物理检查

3.1.1 外观

液体组分应澄清。冻干组分为疏松体。

3.1.2 溶解时间

冻干组分加入蒸馏水后完全溶解，不得出现絮状沉淀物。

3.2 水分

应不高于 3.0%。

3.3 效价测定

按 2.5.1 项进行。

3.4 纯度

按 2.5.2 项进行。

4 保存及有效期

液体制品保存于 2~8℃，自成品检定合格之日起有效期为 2 年。冻干制品有效期为 3 年。如冻干制品保存于 -20℃ 以下，有效期为 5 年。

5 使用说明

本品系从分泌 IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b} 和 IgG₃ 的单克隆抗体杂交瘤细胞的培养上清或细胞诱生的腹水，分别提取纯化鼠 IgG 亚类免疫动物所得抗血清，经固相吸收除去其中非特异抗体组分制成。供免疫双扩散试验检测鼠 IgG 亚类用。

规格

0.50ml/安瓿。

使用方法

每支抗鼠 IgG 亚类血清用标示量蒸馏水溶解，用 PBS 或 0.06mol/L pH8.6 巴比妥钠 - 盐酸缓冲液配制免疫双扩散试验用琼脂糖，或加 30.0g/L PEG (MW6000)，置 4℃ 扩散 24 小时，观察结果（使用时也可自行调整合适的抗原、抗体比例）。检测分泌单克隆抗体的鼠 IgG 及其亚类时，可将培养液浓缩 5 ~ 10 倍。

保存

于 2 ~ 8℃ 避光保存，在有效期内使用。切勿反复冻融。

含钙凝血活酶制造及检定要求

1 定义、组成及用途

本品是含氯化钙的凝血活酶冻干制品，供一期法凝血酶原时间测定用。

2 制 造

2.1 基本要求

2.1.1 设施与生产质量管理

按中国《药品生产质量管理规范》要求实施。

2.1.2 原料及辅料

应符合现行《中国药典》或《中国生物制品主要原辅材料质控标准》要求。未纳入上述标准的化学试剂，应不低于化学纯。

2.1.2.1 含糖钙溶液

以蒸馏水配制含适量蔗糖的氯化钙溶液。

2.1.2.2 脑组织匀浆

取兔脑或其他动物脑组织，剥去脑膜血管，洗净脑组织，用组织粉碎器捣碎成糊状匀浆，放低温冷冻保存。

2.1.3 动物

使用具有实验动物等级合格证的动物。

2.2 含钙凝血活酶制备

预温脑匀浆与适量糖钙液相混，置 35 ~ 37℃，使酶充分释放，离心去沉淀，上清即为含钙凝血活酶原液。

2.3 半成品检定

凝血酶原时间（PT）测定

原液加等量生理氯化钠稀释后，用标准人血浆（附录 1）按附录 2 测定，PT 值在 9 ~ 12 秒者为合格。

2.4 分装与冻干

用 5ml 安瓿定量分装 1.10ml，立即按适宜条件进行冻干。

3 成品检定

3.1 物理检查

3.1.1 外观

为微红色或微黄色疏松体，无干缩、融化现象。

3.1.2 溶解时间

每安瓿加蒸馏水 2.20ml 后，应在 1 分钟内完全溶解，溶解后呈黄白色均匀的混悬液。

3.2 水分

应不高于 3.0%。

3.3 pH 值

为 6.0~7.0。

3.4 凝血酶原时间

取 3.1.2 项溶液按附录 2 检测，PT 值应为 9~12 秒。

4 保存及有效期

于 2~8℃ 避光保存，自成品检定合格之日起有效期为 2 年。

5 使用说明

本品是含氯化钙的凝血活酶冻干制品。用于一期法凝血酶原时间测定，供术前检查、抗凝疗法监护、药物疗效观察及血液病和可引起出血的某些疾病（严重肝病，出血热等传染病和弥漫性血管内凝血等）的诊断和鉴别诊断用。

使用方法

- (1) 本品每安瓿加蒸馏水 2.20ml 溶解，置 37℃ 水浴中 10 分钟。
- (2) 取小试管加入待检（或标准）血浆 0.10ml，置 37℃ 1~2 分钟。
- (3) 快速加入已预温的本品 0.20ml，同时启动秒表；并立即充分摇匀，置 37℃，仔细观察，当管内液体一旦出现凝固，立即停表，并记录凝固时间，此即为 PT 值（重复 2~3 次，取平均值）。
- (4) 用本试剂测定正常人血浆的 PT 值范围为 9~12 秒。

注意事项

- (4) PT 值正常范围为 9~12 秒，仅 3 秒之差，试验条件必须严格控制，每步要仔细、准确、标准，否则结果可相差甚大。
- (2) 整个试验保持在 37℃ 水浴中进行操作观察。
- (3) 观察时要将试管充分倾斜，使管内液体呈流动状。
- (4) 作本试验时，用 0.20ml 加样器，或用 0.20ml 刻度吸管，以控制加

液量和速度。

保存

于2~8℃避光保存，在有效期内使用。

6 附 录

附录1 标准血浆的制备及检定

附录2 凝血酶原时间测定方法