ICS 07.080
CCS A 40

团　　体　　标　　准

T/CSTE 0379—2023

生物活性肽的鉴别和细胞活性测定

Identification and Cytoactivity Determination of Bioactive Peptides

CSTE

2023-08-15 发布　　2023-09-01 实施

中国技术经济学会　　发布

CSTE



版权保护文件

版权所有归属于该标准的发布机构，除非有其他规定，否则未经许可，此发行物及其章节不得以其他形式或任何手段进行复制、再版或使用，包括电子版、影印版，或发布在互联网及内部网络等。使用许可可与发布机构获取。

目　　次

前言 III
1　范围 1
2　规范性引用文件 1
3　术语和定义 1
4　缩略语 1
5　概述 1
6　新建生物活性肽标准品的制备和标定 1
7　生物活性肽供试品的鉴别和细胞活性测定 3
附录 A（资料性）　生物活性肽（三肽-1）的纯度检测（HPLC 法） 5
附录 B（资料性）　生物活性肽（三肽-1）分子量和氨基酸序列测定（LC-MS/MS 法） 7
附录 C（资料性）　生物活性肽（三肽-1）标准品细胞活性标定（细胞增殖法/MTT 比色法） 11
附录 D（资料性）　生物活性肽（三肽-1）供试品细胞活性测定（细胞增殖法/MTT 比色法） 14

CSTE

前　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国技术经济学会提出并归口。

本文件起草单位：珠海金肽生物科技有限公司、中国人民解放军总医院第七医学中心、珠海亿胜生物制药有限公司、上海昊海生物科技股份有限公司、珠海市第三人民医院、浙江大学、广州先进技术研究所。

本文件主要起草人：周守山、杨蓉娅、戴稳平、吴锐、林晓、郑赞顺、宋冠瑛、周庆玮、夏洁敏、黄明星、李晓亮、姚之侃、王希。

本文件为首次发布。

CSTE

生物活性肽的鉴别和细胞活性测定

1 范围

本文件规定了生物活性肽的鉴别和细胞活性测定方法。

本文件适用于具有特定氨基酸序列且具有特定细胞活性的生物活性肽的鉴别和细胞活性测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 16631 高效液相色谱法通则

GB/T 38790.1 生物活性肽的功效评价 第一部分：总则

GB/T 39100 多肽抗氧化性测定 DPPH法和ABTS法

GB/T 39101 多肽抗菌性测定 抑菌圈法

中华人民共和国药典（2020年版）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 生物活性肽 bioactive peptides，BAP

生物活性肽是对生物体的生命活动具有特定调控作用的肽类化合物。

3.2 细胞活性 cytoactivity

细胞活性是指生物活性肽对特定靶细胞的增殖、抑制和相关生理活动的调节能力。

3.3 细胞活性单位 cytoactive unit，CU

本文件中，一个细胞活性单位对应为生物活性肽通过特定方法测定的EC_{50}（μg/mL）值。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

EC_{50}：半数有效浓度（Half Maximal Effective Concentration）

HPLC：高效液相色谱（High Performance Liquid Chromatography）

LC-MS/MS：液相色谱串联质谱（Liquid Chromatography--Mass Spectrometry /Mass Spectrometry）

5 概述

本文件以生物活性肽标准品作为对照品，对生物活性肽供试品进行鉴别和细胞活性测定。生物活性肽标准品应进行必要的分析鉴别，参照《中华人民共和国药典》（2020年版）三部生物制品国家标准物质制备和标定的相关要求，对标准品的纯度、分子量、氨基酸序列、细胞活性等进行分析。

本文件附录根据相关规定，以三肽-1为实例，从生物活性肽的纯度检测、分子量测定、氨基酸序列测定、新建生物活性肽标准品细胞活性标定和生物活性肽供试品细胞活性测定等方面，对本文件进行了进一步说明。

6 新建生物活性肽标准品的制备和标定

6.1 新建生物活性肽标准品的要求

（1）纯度不低于95.0%；
（2）测定分子量与理论值差值在5 ppm以内；
（3）氨基酸序列与理论序列一致。

6.2 新建生物活性肽标准品的鉴别

6.2.1 纯度确认

参照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部通则0512高效液相色谱法进行检测，按面积归一化法计算纯度，其结果应符合本文件6.1（1）要求。

6.2.2 分子量确认

采用LC-MS/MS法进行检测，测定新建生物活性肽标准品分子量，其结果应符合本文件6.1（2）要求。

6.2.3 氨基酸序列确认

采用LC-MS/MS法进行检测，测定新建生物活性肽标准品氨基酸序列，其结果应符合本文件6.1（3）要求。

6.3 新建生物活性肽标准品的分装、冻干和包装

根据各种标准物质的要求进行配制、稀释，经质量检验合格后，精确分装，分装后立即进行冻干和包装。

6.4 新建生物活性肽标准品的检测项目

根据新建生物活性肽标准品的特性和使用目的，进行分装精度、水分、无菌、残留溶剂、炽灼残渣检测和细胞活性标定，以及稳定性研究，并根据需要增加其他必要的检测项目。

6.4.1 分装精度

按照《中华人民共和国药典》（2020年版）三部生物制品国家标准物质制备和标定的相关要求，精确度应在±1%以内。

6.4.2 水分

按照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部通则0832水分测定法第一法（费休氏法）测定，结果应不高于3%。

6.4.3 无菌

按照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部通则1101无菌检查法进行检测，结果需无菌。

6.4.4 残留溶剂

按照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部通则0861残留溶剂测定法进行检测，结果应符合该方法所标示范围。

6.4.5 炽灼残渣

按照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部通则0841炽灼残渣检查法进行检测。

6.4.6 细胞活性

按照本文件6.5进行细胞活性标定。

6.4.7 稳定性研究

按照本文件6.6进行稳定性研究。

6.5 新建生物活性肽标准品的细胞活性标定

6.5.1 标定方法

不同的生物活性肽具有不同的细胞活性测定方法，应参照相关标准或验证的方法进行相应的细胞活性测定：

（1）具有促细胞增殖作用的生物活性肽，参照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部通则3527牛碱性成纤维细胞生长因子生物学活性测定法（细胞增殖法／MTT比色法）和3528人表皮生长因子生物学活性测定法（细胞增殖法／MTT比色法），进行细胞活性测定；

（2）具有抗氧化活性的生物活性肽，按照GB/T 39100，用DPPH法进行细胞活性测定；

（3）具有抑菌作用的生物活性肽，按照GB/T 39101，用抑菌圈法进行细胞活性测定；

（4）具有其他功能的生物活性肽，可选用其他合适的细胞活性测定方法。

根据《中华人民共和国药典》（2020年版）四部通则1431生物检定统计法，以新建生物活性肽标准品溶液浓度的自然对数值为横坐标，以增殖率、抑制率或清除率等为纵坐标，按照量反应平行线测定法建立线性方程（R^2＞0.9500），或四参数回归计算法建立逻辑斯蒂（logistic）方程（R^2＞0.9800），计算出EC_{50}（μg/mL）。根据EC_{50}值计算出新建生物活性肽标准品的CU值。

6.5.2 协作标定

本文件中新建生物活性肽标准品的标定，一般需经至少3个具备相关检测能力的单位协作进行。参加单位应采用统一的设计方案，标定结果须经统计学处理（标定结果至少需取得5次独立的有效结果）。生物活性肽标准品CU值的确定，一般采用各协作单位标定结果的均值表示。

6.6 新建生物活性肽标准品稳定性研究

参照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部通则9402生物制品稳定性试验指导原则，根据标准品性质放置不同温度（一般放置4 ℃、25 ℃、37 ℃、-20 ℃），不同时间，进行细胞活性的测定，以评估其稳定情况。标准品建立以后，应定期核查其细胞活性是否变化。

6.7 新建生物活性肽标准品的核定

（1）新建生物活性肽标准品由协作标定牵头单位对协作标定结果进行复核并认可。

（2）生物活性肽标准品替换批由协作标定牵头单位复核并认可。

（3）新建生物活性肽标准品经复核并认可后，即为生物活性肽标准品。

6.8 生物活性肽标准品的标签和说明书

（1）符合规定的合格的生物活性肽标准品由协作标定牵头单位核发标签及说明书。

（2）生物活性肽标准品标签内容一般包括名称、编号、批号、装量、CU值、用途、存储条件和参与协作标定的单位等信息。

（3）生物活性肽标准品应附有说明书。说明书除提供标签所标明的信息外，还应提供生物活性肽标准品的组成和性状、使用方法、稳定性等信息，必要时应提供相关参考文献。

6.9 生物活性肽标准品的使用发放和保管

（1）生物活性肽标准品适用性由使用者根据使用目的自行确认。

（2）生物活性肽标准品应贮存于适宜的温度、湿度等条件下，其保存条件需定期检查并记录。

（3）生物活性肽标准品由专人保管和登记发放。

7 生物活性肽供试品的鉴别和细胞活性测定

7.1 生物活性肽供试品鉴别

7.1.1 检测

选取与供试品对应的生物活性肽标准品作为对照品，参照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部通则0512高效液相色谱法进行检测。

7.1.2 鉴别

结果判定：以保留时间和色谱峰进行鉴别，供试品应与标准品一致。

7.2 生物活性肽供试品的细胞活性测定

7.2.1 生物活性肽标准品溶液的制备

取生物活性肽标准品，按说明书复溶后，预稀释至40 CU/mL，再稀释到不同倍数，得到不同浓度的生物活性肽标准品溶液。其中预稀释倍数表示为D_r。

7.2.2 生物活性肽供试品溶液的制备

取生物活性肽供试品，按标示量复溶后，预稀释至约40 CU/mL，再稀释到不同倍数，得到不同浓度的生物活性肽供试品溶液。其中预稀释倍数表示为D_s。

7.2.3 生物活性肽供试品活性测定

以生物活性肽标准品为对照，参照相关标准或验证的方法（方法选择同本文件6.5.1），对不同生物活性肽供试品进行细胞活性测定，得出不同稀释倍数对应的增殖率、抑制率或清除率等。

根据《中华人民共和国药典》（2020年版）四部通则1431生物检定统计法，分别以生物活性肽标准品和生物活性肽供试品溶液稀释倍数倒数的自然对数值为横坐标，以增殖率、抑制率或清除率等为纵坐标，按照量反应平行线测定法建立线性方程（R^2＞0.9500），或四参数回归计算法建立逻辑斯蒂（logistic）方程（R^2＞0.9800）。根据方程计算出标准品1 CU/ml的稀释倍数E_r和供试品相当于标准品1 CU/ml的稀释倍数E_s。

7.2.4 生物活性肽供试品细胞活性结果计算

按式（1）计算：

$$P_s = P_r \times \frac{D_s \times E_s}{D_r \times E_r} \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

P_s—为生物活性肽供试品CU值；

P_r—为生物活性肽标准品CU值；

D_s—为生物活性肽供试品预稀释倍数；

D_r—为生物活性肽标准品预稀释倍数；

E_s—为生物活性肽供试品相当于生物活性肽标准品1 CU/ml的稀释倍数；

E_r—为生物活性肽标准品1 CU/ml的稀释倍数。

附 录 A
（资料性）
生物活性肽（三肽-1）的纯度检测（HPLC 法）

三肽-1是具有促细胞增殖活性的生物活性肽，其氨基酸序列为甘氨酸-组氨酸-赖氨酸（Gly-His-Lys），分子量340.38Da，CAS编号为49557-75-7。本附录用HPLC法对三肽-1的纯度进行检测。

A.1 试剂及配制

试验用水为GB/T 6682-2008规定的一级水。

准确称取三肽-1，配制成溶液，浓度范围（0.05-1.00 mg/mL）。

A.1.1 三氟乙酸

色谱纯。

A.1.2 乙腈

色谱纯。

A.2 仪器

A.2.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器。

A.2.2 分析天平：感量为 0.0001 g。

A.2.3 涡旋混合器。

A.2.4 超声波清洗器：功率≥500 W。

A.2.5 恒温水浴锅：控温精度 ±1 ℃。

A.2.6 精密移液器：0.5～10 μL，10～100 μL，100～1000 μL。

A.3 色谱条件

以下HPLC操作条件是典型操作参数，可根据不同仪器的特点，对操作参数作适当调整，以获得最佳效果。

（1）色谱条件

流动相：流动相A：0.1%三氟乙酸-水溶液；流动相B：0.1%三氟乙酸-乙腈溶液；

流速：1 mL/min；

柱温：25～30 ℃；

进样量：10～30 μL；

色谱柱：十八烷基硅烷键合硅胶柱[粒径5 μm，4.6 mm×250 mm]；

建议梯度洗脱，根据不同仪器和样品优化洗脱条件。

（2）检测条件要求

理论塔板数：＞4000；

线性R^2值：≥0.99；

加标回收率：80%～120%；

精密度：样品溶液连续进样6次，测定其峰面积，计算峰面积相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。RSD可接受范围参考《中华人民共和国药典》（2020年版）四部通则9101分析方法验证指导原则中，表3（样品中待测成分的含量与精密度可接受范围关系）的数据要求。

A.4 测试

将三肽-1溶液注入液相色谱仪中，以保留时间和色谱峰进行定性，测得三肽-1的色谱峰面积（或峰高）占比。

A.5 结果计算

根据面积归一化法计算三肽-1纯度。三肽-1溶液色谱图见图A.1，检测波长214 nm。三肽-1的峰面积（峰高）占比见表A.1，纯度为98.865%。

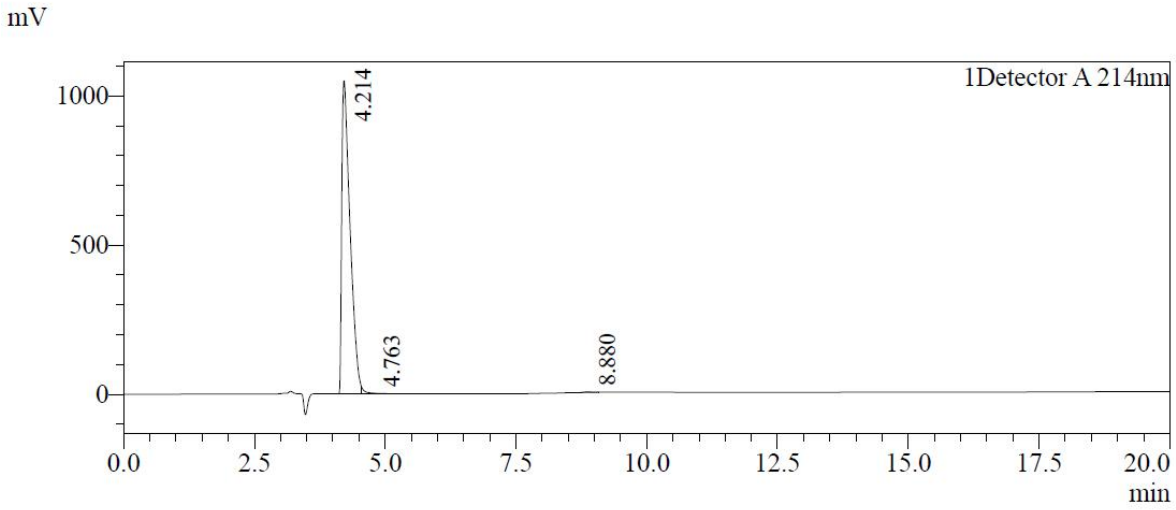


图 A.1 三肽-1 溶液色谱图

表 A.1 三肽-1 溶液色谱图保留时间、峰面积、峰高

检测波长214 nm

色谱峰	保留时间	峰面积	峰高	峰面积占比%
1	4.214	1158.3667	104.9261	98.865
2	4.763	11.4127	0.2588	0.974
3	8.880	1.8806	0.1961	0.161
总计		1171.6600	105.3810	100

A.6 精密度试验

吸取三肽-1溶液进行精密度实验，连续进样6次，测定其保留时间和峰面积，分别计算保留时间和峰面积相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为0.11%，0.72%（见表A.2）。结果表明该方法精密度良好。

表 A.2 三肽-1 进样 6 次各峰的保留时间和峰面积

测定次数	保留时间/min	峰面积
1	4.214	1158.37
2	4.215	1166.28
3	4.209	1175.56
4	4.216	1167.82
5	4.223	1179.85
6	4.217	1160.32
RSD%	0.11	0.72

附 录 B
（资料性）
生物活性肽（三肽-1）分子量和氨基酸序列测定（LC-MS/MS 法）

三肽-1是具有促细胞增殖活性的生物活性肽，其氨基酸序列为甘氨酸-组氨酸-赖氨酸（Gly-His-Lys），分子量340.38Da，CAS编号为49557-75-7。本附录用LC-MS/MS法对三肽-1的分子量和氨基酸序列进行测定。

B.1 供试品信息

表 B.1 供试品信息

名称	三肽-1
性状	类白色粉末
分子量	340.38Da
氨基酸序列	甘氨酸-组氨酸-赖氨酸（Gly-His-Lys）

B.2 试剂或材料

试验用水为GB/T 6682-2008规定的一级水。

B.2.1 乙腈

色谱纯。

B.2.2 甲酸

色谱纯。

B.3 仪器设备

B.3.1 电喷雾-组合型离子阱 质谱仪。

B.3.2 真空离心浓缩仪。

B.3.3 低温高速离心机：4 ℃，转速不小于15000 r/min。

B.3.4 涡旋振荡仪。

B.3.5 高效液相色谱仪。

B.4 样品预处理

称取样品溶解于一级水至浓度为1 mg/mL，使用自填脱盐柱脱盐，于45 ℃真空离心浓缩仪中挥干溶剂。

将样品重新溶解于500 μL样品溶解液（0.1%甲酸，2%乙腈），充分振荡涡旋，13200 rpm，离心10 min，上清液转移到上样管中，等待质谱分析。

B.5 LC-MS/MS 检测

B.5.1 液相色谱条件：

A. 分析柱：十八烷基硅烷键合硅胶柱[粒径2 μm，0.15 mm×150 mm]；
B. 流动相A：0.1%甲酸；
C. 流动相B：0.1%甲酸，80%乙腈；
D. 流速：600 μL/min；
E. 上样量：5 μL；
F. 每个组分分析时间：30 min。

表 B.2 梯度洗脱条件

时间	B 相
0	4%
1	8%
20	95%
30	95%

B.5.2 质谱条件：

表 B.3 质谱条件

一级质谱参数	分辨率：70,000 自动增益控制：3e6 最大离子注入时间：100 ms 扫描范围：100 to 1500 m/z
二级质谱参数	分辨率：17,500 自动增益控制：5e4 最大离子注入时间：50 ms TopN：20 扫描范围：200 to 2000 m/z

B.6 数据库检索

B.6.1 质谱原始文件使用与仪器配套的软件检索目标蛋白数据库，检索参数如下：

B.6.2 酶（enzyme）：unspecific

B.6.3 遗漏酶切位点（maximum missed cleavages）：2

B.6.4 一级质谱误差（peptide mass tolerance）：20 ppm

B.6.5 二级质谱误差（fragment mass tolerance）：0.02 Da

B.6.6 肽段/碎片离子质量数（mass values）：monoisotopic（单同位素）

B.6.7 显著性阈值（significance threshold）：0.01

B.7 实验结果

质谱采集数据生成raw文件，使用仪器配套软件打开，可以看到如下总离子流色谱图，图B.1 。

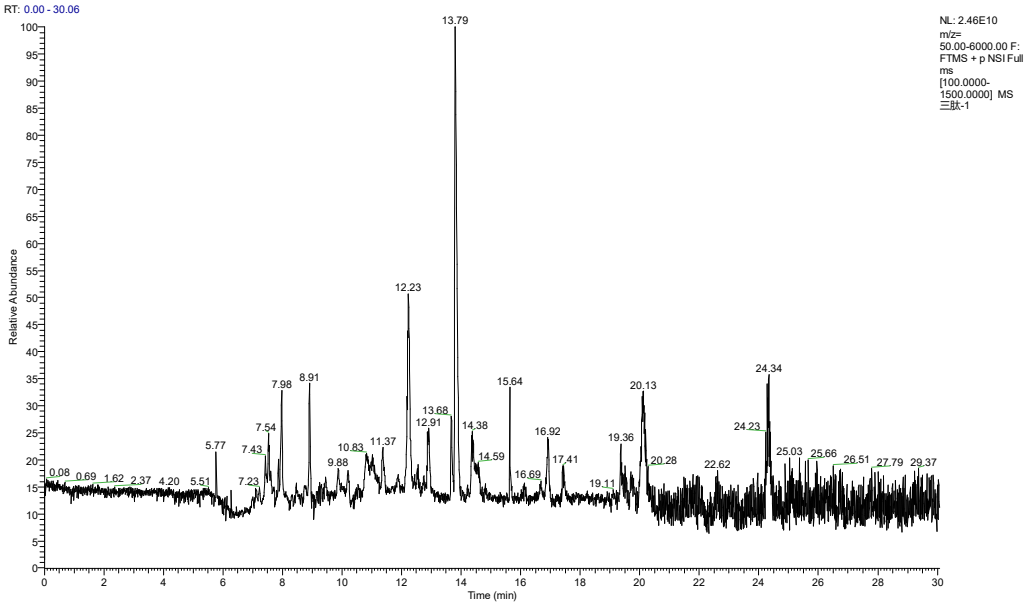


图 B.1 样品三肽-1 的总离子流色谱图

目标肽段的一级质谱图如图B.2：

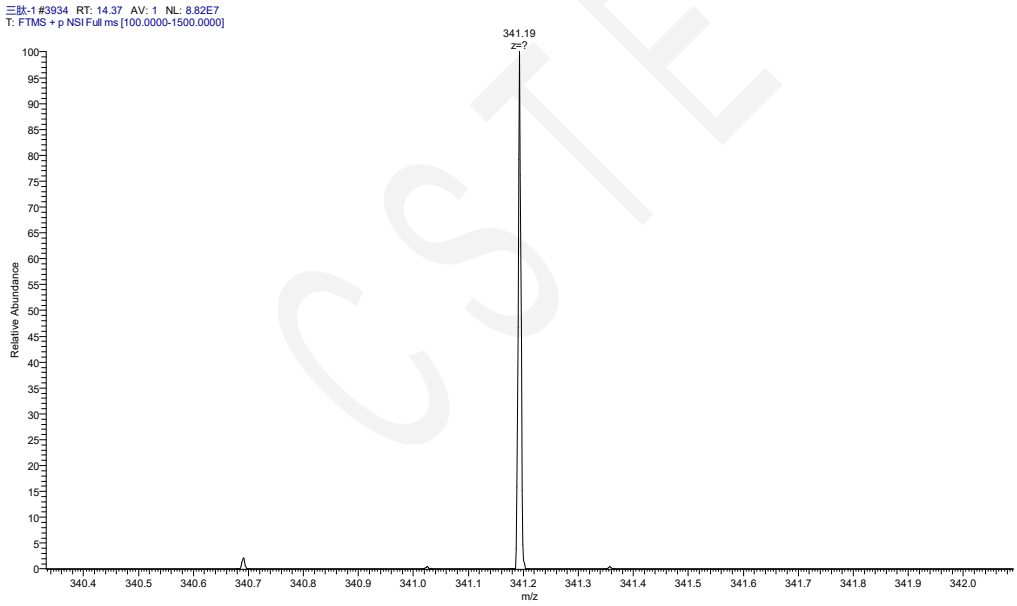


图 B.2 样品三肽-1 的一级质谱图

从一级质谱图上计算肽段的分子量如下：

表 B. 4 三肽-1 分子量

m/z	z	质量（Da）	平均质量（Da）	误差范围（ppm）
341.19	1	340.19	340.19	-0.46

以样品理论序列建立本地数据库，以仪器配套软件进行肽段二级碎裂片段的匹配，得到肽段的二级质谱图如下：

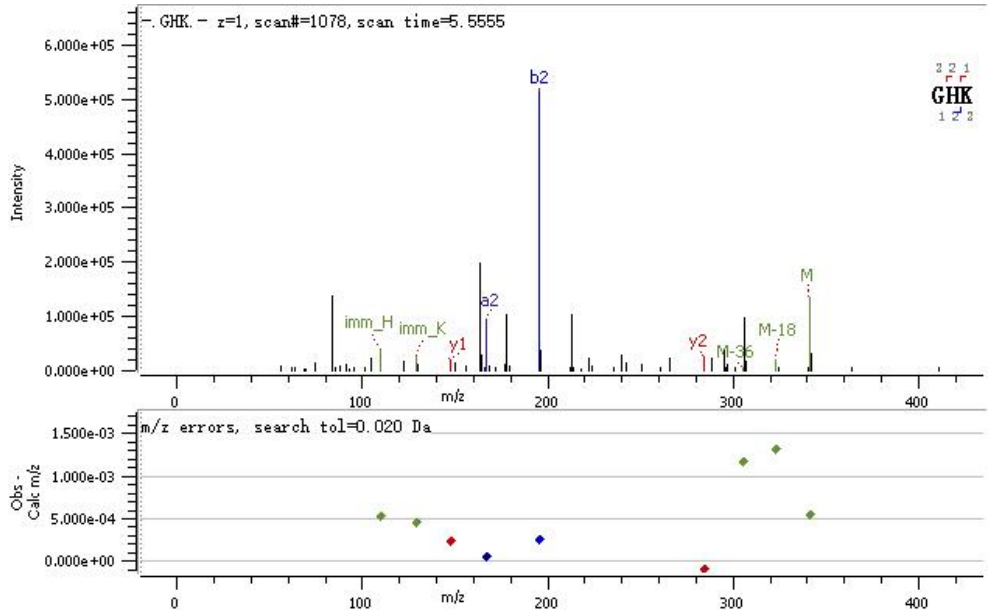


图 B.3 样品三肽-1 的二级质谱图

碎片离子匹配列表如下：

表 B.5 碎片离子匹配表

#	a calc.	b calc.	b-18 calc.	Seq.	y calc.	#
1	30.0338	58.0287	40.0182	G	/	3
2	**167.0927**	**195.0876**	177.0771	H	**284.1717**	2
3	/	/	/	K	**147.1128**	1

注：加粗标记为匹配上的碎片离子。

B.8 结论

根据实验结果，可以得出如下结论：

(1) 从一级质谱图可以计算得到肽段的分子量为340.19 Da，与目标肽段一致。

(2) 从二级质谱匹配情况可以看出，肽段二级碎裂片段与理论序列的碎片离子匹配度很高，证明肽段序列与理论序列一致。

综上所述，样品中的肽段序列为: Gly-His-Lys。

附 录 C
（资料性）
生物活性肽（三肽-1）标准品细胞活性标定（细胞增殖法/MTT 比色法）

三肽-1是具有促细胞增殖活性的生物活性肽，其氨基酸序列为甘氨酸-组氨酸-赖氨酸（Gly-His-Lys），分子量340.38Da，CAS编号为49557-75-7。本附录选用细胞增殖法/MTT比色法对三肽-1标准品的细胞活性进行标定。

C.1 原理

本法系依据三肽-1对小鼠胚胎成纤维细胞（BALB/c 3T3细胞）的增殖生长具有刺激作用，BALB/c 3T3细胞的生长状况因三肽-1的生物学活性不同而不同，以此检测三肽-1的细胞活性。

C.2 试剂

C.2.1 RPMI 1640培养液

取RPMI 1640培养基粉末1袋（规格为40 g /袋），溶解并稀释至1000 mL，加青霉素10^5 IU和链霉素10^5 IU，再加碳酸氢钠（分析纯）2.1 g，溶解后，混匀，经0.22 μm滤膜除菌过滤，4 ℃保存。

C.2.2 维持培养液

量取新生牛血清4 mL，加入RPMI 1640培养液至1000 mL。

C.2.3 完全培养液

量取新生牛血清100 mL，加入RPMI 1640培养液至1000 mL。

C.2.4 磷酸盐缓冲溶液（PBS）

称取氯化钠8 g、氯化钾0.2 g、磷酸氢二钠1.44 g、磷酸二氢钾0.24 g，用盐酸调pH至7.4后，加水溶解并稀释至1000 mL，经0.22 μm滤膜过滤除菌。也可商业购买。

C.2.5 噻唑蓝（MTT）溶液

称取MTT粉末0.10 g，加PBS 20 mL使溶解，经0.22 μm滤膜过滤除菌。4 ℃避光保存。

C.2.6 二甲基亚砜（DMSO）

分析纯。

C.3 仪器设备

C.3.1 精密移液器：0.5～10 μL，10～100 μL，100～1000 μL。

C.3.2 细胞二氧化碳培养箱。

C.3.3 冰箱（-20 ℃, 4 ℃）。

C.3.4 倒置相差显微镜。

C.3.5 酶标仪（570 nm）。

C.3.6 通风橱。

C.3.7 超净工作台。

C.3.8 抽滤器。

C.3.9 离心机。

C.4 试验步骤

C.4.1 待标定三肽-1标准品溶液的制备

取待标定三肽-1标准品，用维持培养液溶解并定容至1 mL，此时三肽-1的浓度为C（ug/mL）。根据实验室或文献报告的EC_{50}值，用维持培养液稀释，配制成40倍EC_{50}对应的浓度。在96孔细胞培养板中，做4倍系列稀释，共8个稀释度，每个稀释度做2孔。以上操作在无菌条件下进行。

C.4.2 测定方法

BALB/c 3T3细胞株用完全培养液于37 ℃、5%二氧化碳条件下培养，控制细胞浓度为每1 mL含1.0×10^5～5.0×10^5个细胞，传代后24～36 h用于生物学活性测定。弃去培养瓶中的培养液，消化并收集细胞，用完全培养液配成每1 mL含5.0×10^4～1.0×10^5个细胞的细胞悬液，接种于96孔细胞培养板中，每孔100 μL，于37 ℃、5%二氧化碳条件下培养。24 h后换成维持培养液，于37 ℃、5%二氧化碳条件下培养24 h。制备的细胞培养板弃去维持培养液，加入待标定三肽-1溶液，每孔100 μL，于37 ℃、5%二氧化碳条件下培养64～72 h。每孔加入MTT溶液20 μL（MTT会和强氧化性或强还原性受试物发生反应，应根据受试物特性判断是否在加入MTT前弃去培养液，并用PBS溶液润洗细胞后再加入含有MTT的培养液），于37 ℃、5% 二氧化碳条件下培养3～5 h。测定时应添加设置空白孔。以上步骤在无菌条件下进行。弃去细胞培养板中的液体后，向每孔中加入DMSO 100 μL，通过镜检确认MTT溶解完全后混匀，放入酶标仪，以630 nm为参比波长，在波长570 nm处测定吸光度，记录测定结果。

C.5 结果计算

C.5.1 CU值

采用四参数回归计算法，以三肽-1浓度为横坐标 ，以平均吸光度值为纵坐标 ，得到三肽-1的促细胞增殖活性回归曲线（图 C.1），从曲线中计算出三肽-1的EC_{50}（μg/mL）。

C.5.2 试验有效标准

回归相关系数R^2应不低于0.98。

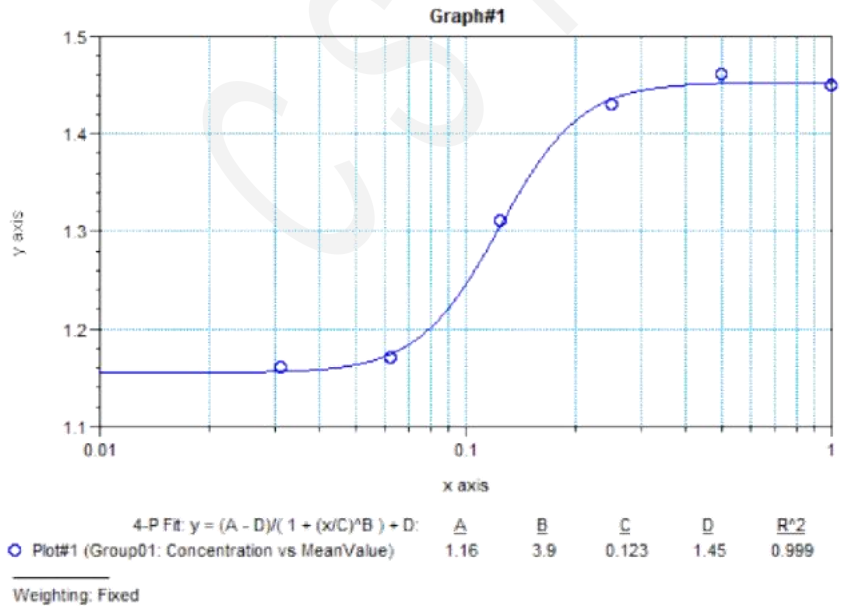


图 C.1 三肽-1 的回归曲线（根据仪器配套软件拟合）：图中 A 为吸光度下限值，代表 S 型曲线下渐近线；B 为曲线斜率；C 为 EC_{50}（μg/mL）；D 为吸光度上限值，代表 S 型曲线的上渐近线。待标定三肽-1 标准品的 EC_{50} 值为 0.123 μg/mL。

C.5.3 待标定三肽-1标准品的细胞活性计算公式

根据该EC_{50}值计算三肽-1标准品的CU值。

按式（C.1）计算：

$$P_r = C/EC_{50} \quad \text{(C.1)}$$

式中：

P_r—三肽-1标准品的CU值；

C—待标定三肽-1标准品定容至1 mL溶液的浓度（μg/mL）；

CSTE

附 录 D
（资料性）
生物活性肽（三肽-1）供试品细胞活性测定（细胞增殖法/MTT 比色法）

三肽-1是具有促细胞增殖活性的生物活性肽，其氨基酸序列为甘氨酸-组氨酸-赖氨酸（Gly-His-Lys），分子量340.38Da，CAS编号为49557-75-7。本附录选用细胞增殖法/MTT比色法对三肽-1供试品的细胞活性进行测定。

D.1 原理

同附录C.1。

D.2 试剂

同附录C.2。

D.3 仪器设备

同附录C.3。

D.4 试验步骤

D.4.1 三肽-1标准品溶液的制备

取三肽-1标准品，按说明书复溶后，用维持培养液预稀释至40 CU/mL。预稀释倍数为D_r。在96孔细胞培养板中，做4倍系列稀释，共8个稀释度，每个稀释度做2孔。以上操作在无菌条件下进行。

D.4.2 三肽-1供试品溶液的制备

取三肽-1供试品按标示量复溶后，用维持培养液预稀释至约40 CU/mL。预稀释倍数为D_s。在96孔板细胞培养板中，做4倍系列稀释，共8个稀释度，每个稀释度做2孔。以上操作在无菌条件下进行。

D.4.3 测定方法

BALB/c 3T3细胞株用完全培养液于37 ℃、5%二氧化碳条件下培养，控制细胞浓度为每1 mL含1.0×10^5～5.0×10^5个细胞，传代后24～36 h用于生物学活性测定。弃去培养瓶中的培养液，消化并收集细胞，用完全培养液配成每1 mL含5.0×10^4～1.0×10^5个细胞的细胞悬液，接种于96孔细胞培养板中，每孔100 μL，于37 ℃、5%二氧化碳条件下培养。24 h后换成维持培养液，于37 ℃、5%二氧化碳条件下培养24 h。制备的细胞培养板弃去维持培养液，分别加入三肽-1标准品溶液和三肽-1供试品溶液，每孔100 μL，于37 ℃、5%二氧化碳条件下培养64～72 h。每孔加入MTT溶液20 μL（MTT会和强氧化性或强还原性受试物发生反应，应根据受试物特性判断是否在加入MTT前弃去培养液，并用PBS溶液润洗细胞后再加入含有MTT的培养液），于37 ℃、5% 二氧化碳条件下培养3～5 h。测定时应添加设置空白孔。以上步骤在无菌条件下进行。弃去细胞培养板中的液体后，向每孔中加入DMSO 100 μL，通过镜检确认MTT溶解完全后混匀，放入酶标仪，以630 nm为参比波长，在波长570 nm处测定吸光度，记录测定结果。

D.5 结果计算

试验数据采用计算机程序或四参数回归计算法进行处理，得到三肽-1标准品1 CU/ml的稀释倍数E_r和三肽-1供试品相当于标准品1 CU/mL的稀释倍数E_s。

按式（D.1）计算：

$$P_s = P_r \times \frac{D_s \times E_s}{D_r \times E_r} \quad \text{(D.1)}$$

式中：

P_s—为三肽-1供试品CU值；

P_r—为三肽-1标准品CU值；

D_s—为三肽-1供试品预稀释倍数；

D_r—为三肽-1标准品预稀释倍数；
E_s—为三肽-1供试品相当于标准品1 CU/mL的稀释倍数；
E_r—为三肽-1标准品1 CU/mL的稀释倍数。

CSTE