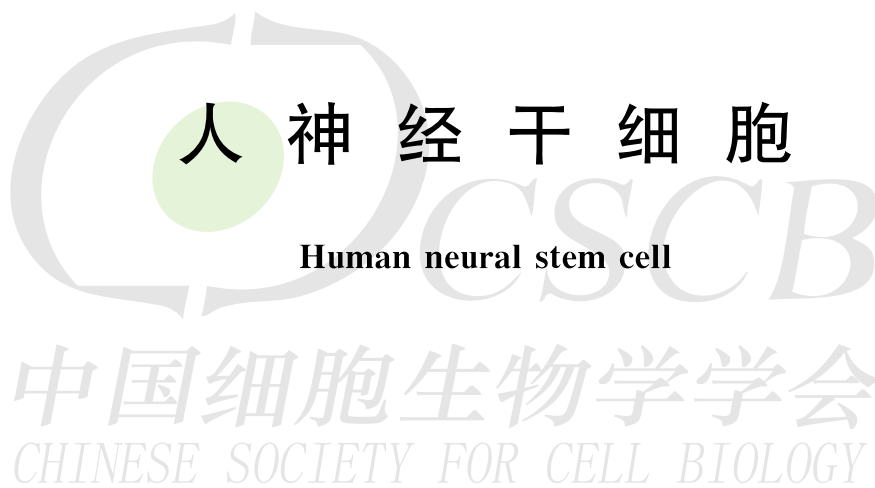


团 体 标 准

T/CSCB 0012—2022



2022-08-30 发布

2022-10-31 实施

中国细胞生物学学会 发布
中国标准出版社 出版



中国细胞生物学学会
CHINESE SOCIETY FOR CELL BIOLOGY

目 次

前言	I
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语、定义和缩略语	1
4 技术要求	2
5 检验方法	2
6 检验规则	4
7 使用说明	4
8 标签	4
9 包装、储存及运输	5
10 废弃物处理	5
附录 A（规范性） 细胞存活率检测 细胞计数法	6
附录 B（规范性） 细胞标志蛋白检测 免疫荧光染色计数法（仲裁法）	7
附录 C（规范性） 细胞标志蛋白检测 流式细胞术	9

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。

本文件由中国细胞生物学学会标准工作委员会提出。

本文件由中国细胞生物学学会归口。

本文件起草单位：中国科学院动物研究所、北京干细胞与再生医学研究院、国家干细胞资源库、中国干细胞与再生医学协同创新平台、北京工商大学、中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心、南京医科大学、北京泽辉辰星生物科技有限公司、中国标准化研究院、中国合格评定国家认可中心、中山大学、昆明理工大学、华中科技大学同济医学院附属同济医院、北京协和医院、郑州大学第一附属医院、首都医科大学附属北京天坛医院、浙江霍德生物工程有限公司、中国医学科学院血液学研究所血液病医院、中国计量科学研究院、中国科学院微生物研究所。

本文件主要起草人：王昱凯、赵同标、周琪、胡宝洋、马爱进、郝捷、陈跃军、刘长梅、刘妍、张愚、王长林、翟培军、项鹏、李天晴、唐铁山、陈红、包新杰、王燕琳、贺文艳、范靖、滕兆乾、王柳、周家喜、傅博强、付钰、冯琳、曹佳妮、梁灵敏、于娟、王磊。

中国细胞生物学学会
CHINESE SOCIETY FOR CELL BIOLOGY



中国细胞生物学学会
CHINESE SOCIETY FOR CELL BIOLOGY

人神经干细胞

1 范围

本文件规定了人神经干细胞的技术要求、检验方法、检验规则、使用说明、标签、包装、储存、运输和废弃物处理等要求。

本文件适用于原代及多能干细胞分化来源的人神经干细胞的质量控制。

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。

WS 213 丙型肝炎诊断

WS 273 梅毒诊断

WS 293 艾滋病和艾滋病病毒感染诊断标准

T/CSCB 0001—2020 干细胞通用要求

中华人民共和国药典(2020年版)

全国临床检验操作规程

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

人神经干细胞 human neural stem cell

人中枢神经系统中具有自我更新能力、同时具有分化成星形胶质细胞、神经元和少突胶质细胞潜能的细胞。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

EBV:人类疱疹病毒(Epstein-Barr Virus)

HBV:乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus)

HCMV:人巨细胞病毒(Human Cytomegalovirus)

HCV:丙型肝炎病毒(Hepatitis C Virus)

HIV:人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus)

HTLV:人类嗜T细胞病毒(Human T-lymphotropic Virus)

STR:短串联重复序列(Short Tandem Repeat)

TP:梅毒螺旋体(Treponema Pallidum)

4 技术要求

4.1 原材料和辅料

4.1.1 原材料的获取应符合相关要求。

4.1.2 应符合 T/CSCB 0001—2020 要求。

4.1.3 原材料不应携带 HIV、HBV、HCV、HTLV、EBV、HCMV、TP。

4.2 关键质量属性

4.2.1 细胞形态

细胞单层贴壁生长时,细胞核不明显,细胞体呈单层或者多层柱状(镜下观察);3D 培养时,可自发形成致密透亮的球形。

4.2.2 染色体核型

正常核型应为 46,XX 或 46,XY。

4.2.3 细胞存活率

未冻存 $\geq 80\%$,冻存复苏后 $\geq 60\%$ 。

4.2.4 细胞标志蛋白

NESTIN 阳性率 $\geq 80.0\%$,SOX1、SOX2 双阳性率 $\geq 70.0\%$ 。

4.2.5 分化细胞特征

经培养后可分化为神经元和胶质细胞(星形胶质细胞和/或少突胶质细胞)。

细胞形态:含有胞体呈多极或双极,有较长的神经突起的神经元。

细胞标志蛋白:可分化为含有 GFAP 和/或 S100 β 阳性星形胶质细胞、MAP2 和/或 NeuN 和/或 TUJ1 阳性神经元、PDGFR α 和/或 A2B5 和/或 O4 阳性少突胶质细胞。

4.2.6 微生物

真菌、细菌、支原体、人类免疫缺陷病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类嗜 T 细胞病毒、人类疱疹病毒、人巨细胞病毒、梅毒螺旋体应为阴性。

4.3 过程控制

4.3.1 冻存、复苏等过程控制应符合 T/CSCB 0001—2020 要求。

4.3.2 细胞 STR 检测结果应与供体细胞保持一致。

5 检验方法

5.1 细胞形态

二维培养条件下,用明视场细胞显微镜进行观察。

5.2 染色体核型

按照《中华人民共和国药典(2020年版)》中的“染色体检查”检验。

5.3 细胞存活率

按照附录 A 的方法检验。

5.4 细胞标志蛋白

按照附录 B 或附录 C 的方法检验。

5.5 微生物

5.5.1 真菌

按照《中华人民共和国药典(2020年版)》中“1101 无菌检查法”检测。

5.5.2 细菌

按照《中华人民共和国药典(2020年版)》中“1101 无菌检查法”检测。

5.5.3 支原体

按照《中华人民共和国药典(2020年版)》中“3301 支原体检查法”检测。

5.5.4 HIV

按照 WS 293 核酸法检验。

5.5.5 HBV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

5.5.6 HCV

按照 WS 213 核酸法检验。

5.5.7 HTLV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

5.5.8 EBV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

5.5.9 HCMV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

5.5.10 TP

按照 WS 273 核酸法检验。

5.6 体外分化能力检测

按照附录 B 或附录 C 的方法检验。

6 检验规则

6.1 抽样方法和数量

6.1.1 在一个生产周期中,同一生产线、同一来源、同一代次、同一方法制备出来的产品为一批。

6.1.2 在同一批的产品中随机抽取 3 个最小包装单元。

6.2 出厂检验

6.2.1 每批产品应进行出厂检验,并附检验报告。

6.2.2 出厂检验项目应包括 4.2 规定的所有项目。

6.3 复核检验

根据需要,应由专业细胞检验机构/实验室进行复核检验。

6.4 判定规则

6.4.1 出厂检验项目全部符合 4.2 规定,判为合格品;有 1 项及以上不符合本文件规定,则判为不合格品。

6.4.2 复核检验项目全部符合 4.2 规定,判为合格品;有 1 项及以上不符合本文件规定,则判为不合格品。

7 使用说明

应至少包括以下内容:

- a) 名称;
- b) 代次;
- c) 数量;
- d) 生产日期;
- e) 生产批号;
- f) 生产组织;
- g) 储存条件;

- h) 运输条件；
- i) 联系方式；
- j) 使用方法；
- k) 执行标准号；
- l) 生产地址；
- m) 邮政编码；
- n) 注意事项。

注：根据用户需求，提供内毒素结果。

8 标签

应至少包括以下内容：

- a) 名称；
- b) 代次；
- c) 数量；
- d) 生产批号；
- e) 生产组织；
- f) 生产日期。

9 包装、储存及运输

9.1 包装

应选择对人神经干细胞关键质量属性无影响的材料和容器。

9.2 储存

9.2.1 应符合 T/CSCB 0001—2020 要求。

9.2.2 应在低于 $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ 液氮环境下储存。

9.3 运输

9.3.1 应符合 T/CSCB 0001—2020 要求。

9.3.2 应在干冰或低于 $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下运输。

10 废弃物处理

10.1 人神经干细胞生产和检测过程中产生的废弃物应建立废弃物细胞管理档案，严格执行管理规范并详细记录。

10.2 人神经干细胞研究和生产中不合格的细胞、剩余废弃的细胞或捐赠物，应进行合法、妥善并符合伦理的处理。

附 录 A

(规范性)

细胞存活率检测 细胞计数法

A.1 仪器和设备

A.1.1 显微镜。

A.1.2 血球计数板。

A.2 试剂

除特别说明外,所有试剂均为分析纯,检测用水均为去离子水。

A.2.1 磷酸盐缓冲液:pH 为 7.4。

A.2.2 台盼蓝染液。

A.3 检测步骤

A.3.1 细胞悬液制备

收集待检测细胞,用磷酸盐缓冲液(A.2.1)配制细胞悬液,稀释至合适的浓度。每个 1 mm^2 的方格中的细胞的数量应为 20 个~50 个细胞。如果高于 200 个细胞,则需要进行稀释。

A.3.2 细胞染色

按 1:1 的体积比将台盼蓝染液(A.2.2)与细胞悬液(A.3.1)混合均匀。

A.3.3 细胞计数

将盖玻片盖在血球计数板(A.1.2)计数槽上,取 $10\ \mu\text{L}$ 混合液(A.3.2)滴在一侧计数室的盖玻片边缘,另取 $10\ \mu\text{L}$ 混合液,滴在另一侧计数室的盖玻片边缘,使混合液充满盖玻片和计数板之间,静置 30 s,将计数板置显微镜(A.1.1)下对被染色的细胞和细胞总数分别进行计数。

对 16×25 规格的计数室,按对角线位,取左上、右上、左下、右下 4 个 1 mm^2 的中格(即 100 个小格)计数。对 25×16 规格的计数室,按对角线位,取左上、右上、左下、右下和中央 5 个中格(即 80 个小格)计数。当遇到位于大格线上的细胞,一般只计数大方格的上方和左线上的细胞(或只计数下方和右方线上的细胞)。

A.4 计算与分析

细胞存活率按公式(A.1)进行计算。

$$S = (M - D) / M \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

S——细胞存活率;

M——细胞总数;

D——染色的细胞数。

细胞存活率为 2 个样品的平均值。计算两次计数活细胞比率结果的平均值,记为细胞平均存活率。

A.5 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的 10%。

附 录 B

(规范性)

细胞标志蛋白检测 免疫荧光染色计数法(仲裁法)

B.1 仪器和设备

激光共聚焦显微镜。

B.2 试剂

B.2.1 PBS。

B.2.2 4%多聚甲醛(PFA)。

B.2.3 Triton-X100。

B.2.4 牛血清白蛋白 BSA。

B.2.5 Hoechst33342。

B.2.6 防淬灭剂。

B.2.7 无色指甲油或封片剂。

B.2.8 抗体。

B.2.9 按相应要求配制检测所需的液体:封闭液、抗体稀释液。

B.3 样品保存

固定后的样品、PBS、4%多聚甲醛、Hoechst33342 于 2℃~8℃ 保存,牛血清蛋白、防淬灭剂于-20℃ 保存。Triton-X100、无色指甲油或封片剂室温保存。抗体按说明书保存。

B.4 检测步骤

B.4.1 样品准备和固定

将无菌玻璃片放在细胞培养皿底部中央,接种细胞。待细胞生长到合适密度时,弃掉培养液,用 4%PFA 室温下固定细胞 15 min~30 min。PBS 洗 3 次。

B.4.2 通透封闭

用含 0.3% Triton-X100 和 2% BSA 的 PBS 室温下通透封闭细胞 1 h~2 h。

B.4.3 抗体孵育

按照抗体说明书进行稀释使用。

B.4.4 洗涤

用 PBS 洗 3 次,每次洗涤 5 min~10 min。

B.4.5 染核

弃去 PBS,用 PBS 1:1 000 稀释 Hoechst33342 染液处理细胞 15 min。

B.4.6 封片

每张玻璃片加 5 μ L 防淬灭剂,用盖玻片盖于组织上,避免产生气泡,用无色指甲油小心地在盖玻片

四周轻涂,使盖玻片与玻璃片黏合。

B.4.7 激光共聚焦显微镜拍照

10 倍或 20 倍镜下随机取至少 3 个不同视野拍照,如果细胞分多层,需进行层扫后叠加(每层间隔 $1.5\ \mu\text{m}\sim 2.5\ \mu\text{m}$)。

B.4.8 计数

对 3 个不同视野的照片中 Hoechst 阳性细胞进行计数,每个视野至少计 500 个细胞,总数不少于 1 500 个细胞。并统计其中相应抗体阳性的细胞数。计算标志物抗体阳性比例。

细胞标志物阳性比例按公式(B.1)进行计算。

$$P = B/H \times 100\% \quad \dots\dots\dots (B.1)$$

式中:

P ——细胞标志物阳性比例;

B ——抗体阳性细胞总数;

H ——Hoechst 阳性细胞总数, $\geq 1\ 500$ 。



附录 C

(规范性)

细胞标志蛋白检测 流式细胞术

C.1 仪器和设备

- C.1.1 细胞流式分析仪。
- C.1.2 水平离心机。
- C.1.3 制冰机。
- C.1.4 带盖离心管:1.5 mL、50 mL 和 15 mL。
- C.1.5 40 μm 滤网。
- C.1.6 流式管。

C.2 试剂

- C.2.1 生理盐水。
- C.2.2 多聚甲醛(PFA):纯度 95%。
- C.2.3 氢氧化钠(NaOH):分析纯。
- C.2.4 直标抗体。
- C.2.5 固定液:称取多聚甲醛 4 g 于烧杯中,加入适量生理盐水及 2 滴 1 mol/L 的 NaOH(pH 7.4),60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴磁力搅拌,溶解后用生理盐水定容至 100 mL。

C.3 试样制备和保存

固定后的样品于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏,固定液放入分装容器中,密封并标记,于-20 $^{\circ}\text{C}$ 以下冷冻存放。相关抗体遵照说明书保存。

C.4 检测步骤

C.4.1 样品准备

取造血干细胞置于 15 mL 离心管中,加入生理盐水洗涤两次,300g,离心 10 min。

C.4.2 抗体孵育

用 95 μL 生理盐水重悬细胞,并转移至 1.5 mL 离心管中,分别加入 5 μL CD34、CD90 荧光抗体,或 5 μL 同型对照荧光抗体,置于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光孵育 30 min,每隔 5 min~10 min 轻弹混匀。最后用生理盐水洗涤两次,300g,离心 10 min。

C.4.3 染色后样品检测

用 200 μL ~300 μL 洗涤液重悬细胞,然后通过 40 μL 滤网转移到流式管中,按细胞流式分析仪应用手册上机检测。

在 FSC/SSC 散点图中,调试 FSC、SSC 的 PMT 值,使所有细胞群均可见,调试各荧光通道的 PMT 值在目标值的范围内。随后进行各荧光通道间的补偿调节,完成后再行灵敏度调节。

C.4.4 圈门设定原则

首先根据颗粒度和透光性画门圈出目标细胞分群 1,排除死细胞和其他杂细胞,然后根据同型对照

组荧光强度,在分群 1 的基础上画出阳性细胞群 2,排除没有被荧光抗体标记的阴性细胞。

C.5 结果分析

得到的检测结果用软件综合分析,具体参考其软件使用说明。





中国细胞生物学学会
CHINESE SOCIETY FOR CELL BIOLOGY