



团 体 标 准

T/CSCB 0010—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	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	2
5 技术要求	2
6 检验方法	3
7 检验规则	3
8 使用说明	4
9 标签	4
10 包装、储存及运输	5
11 废弃物处理	5
附录 A (规范性) 细胞标志性蛋白和纯度检测 流式细胞测定法	6
附录 B (规范性) CD107a 脱颗粒、颗粒酶 B、穿孔素合成水平检测 流式细胞测定法	7
附录 C (规范性) NK 细胞杀伤功能检测 流式细胞测定法	8
附录 D (规范性) NK 细胞 ADCC 功能检测 流式细胞测定法	9



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

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。

本文件由中国细胞生物学学会干细胞生物学分会提出。

本文件由中国细胞生物学学会归口。

本文件起草单位：北京干细胞与再生医学研究院、中国科学院动物研究所、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、四川大学、中国农业大学、华中科技大学、清华大学、中国医学科学院血液学研究所、中盛溯源生物科技有限公司、北京泽辉辰星生物科技有限公司、中国标准化研究院、中国计量科学研究院、军事科学院军事医学研究院、华南干细胞与再生医学研究中心、苏州大学、中山大学中山医学院、广东省中医院（广州中医药大学第二附属医院）。

本文件主要起草人：王金勇、赵同标、周琪、郝捷、马爱进、胡宝洋、胡洪波、于舒洋、武宁、董忠军、周家喜、牛帅帅、夏成祥、黄德浩、俞君英、张颖、吴骏、王柳、彭耀进、魏军、裴雪涛、南雪、胡士军、梁灵敏、王磊、曹佳妮、王长林、傅博强、曹楠、陈曲波。





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

人自然杀伤细胞

1 范围

本文件规定了人自然杀伤细胞的技术要求、检验方法、检验规则、使用说明、标签、包装、储存及运输和废弃物处理要求。

本文件适用于人体组织分离的或干细胞分化或转分化获得的人自然杀伤细胞的质量控制。

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

T/CSCB 0002—2020 人胚干细胞

中华人民共和国药典(2020年版)

全国临床检验操作规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

人自然杀伤细胞 human natural killer cells

人体组织分离的或干细胞分化或转分化获得的，具有非特异性杀伤、抗体依赖性细胞毒性、免疫调节功能的固有淋巴细胞。

3.2

非特异性杀伤 non-specific killing

指免疫细胞可在不需要体细胞基因重排，不表达特异性抗原识别受体，无需预致敏即可直接杀伤肿瘤细胞或病毒感染细胞的细胞杀伤功能。

3.3

抗体依赖性细胞毒性 antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC

表达抗体 Fc 受体的细胞通过识别抗体的 Fc 段，从而对抗体结合的靶细胞杀伤的机制。

3.4

NK 细胞的免疫调节功能 immunomodulation of natural killer cells

NK 细胞通过释放大量细胞因子和趋化因子，与机体其他多种免疫细胞相互作用，调节机体的免疫状态和免疫功能。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ADCC:抗体依赖细胞毒性(Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity)

CFSE:羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯(Carboxyfluorescein succinimidyl ester)

HLA:人类白细胞抗原(Human Leukocyte Antigen)

NK:自然杀伤(Natural Killer)

STR:短串联重复序列(Short Tandem Repeat)

5 技术要求

5.1 细胞形态

体外培养呈悬浮状,活化后体积变大或形状变为不规则。

5.2 染色体核型

正常细胞核型应为 46, XX 或 46, XY。

5.3 细胞标志蛋白

CD56 阳性率 $\geq 90\%$, CD45 阳性率 $\geq 90\%$, CD16 阳性率 $\geq 10\%$ 。

5.4 细胞纯度

具有 CD3 标志蛋白阳性表达细胞含量 $\leq 5\%$ 。

5.5 细胞活性与功能

对 HLA-I 分子表达下调或丢失的细胞应具有杀伤功能,激活后应释放颗粒酶、穿孔素、干扰素,联合抗体可增强细胞杀伤功能。

注:如 NK 细胞对 HLA-I 分子表达下调的实体肿瘤细胞(卵巢癌细胞)、血液肿瘤细胞(髓系白血病肿瘤细胞)具有细胞溶解活性。

5.6 细胞存活率

新鲜制备未冻存细胞 $\geq 70\%$;冻存细胞复苏后应用前 $\geq 50\%$ 。

5.7 微生物

真菌、细菌、支原体、衣原体、病毒等均应为阴性。

5.8 内毒素

内毒素应 ≤ 1 EU/mL。

5.9 细胞 STR 鉴定

人体组织分离的或干细胞分化或转分化获得的人自然杀伤细胞,应进行 STR 检测及分型鉴定,无样品间的交叉污染。

6 检验方法

6.1 细胞形态

体外二维悬浮培养条件中,静息状态下呈不规则形悬浮生长;激活后形态变大变长,用倒置显微镜进行观察。

6.2 染色体核型

按照《中华人民共和国药典(2020年版)》检验。

注:根据目的样本特性确定应有的核型结果。正常细胞核型为 46, XX 或 46, XY。

6.3 细胞标志性蛋白

按照附录 A 的方法检验。

6.4 细胞纯度

按照附录 A 的方法检验。

6.5 细胞活性与功能

NK 细胞激活后颗粒酶、穿孔素检测按照附录 B 的方法检验。NK 细胞激活后释放干扰素检测按照附录 B 的方法检验。NK 细胞杀伤功能检测按照附录 C 的方法检验。NK 细胞 ADCC 功能检测按照附录 D 的方法检验。

6.6 细胞存活率

按照 T/CSCB 0002—2020 检验。

6.7 微生物

真菌、细菌和支原体按照《中华人民共和国药典(2020年版)》检验。人类免疫缺陷病毒按照 WS 293 检验。乙型肝炎病毒、人类嗜 T 细胞病毒、人类疱疹病毒、人巨细胞病毒按照《全国临床检验操作规程》检验。丙型肝炎病毒按照 WS 213 检验。梅毒螺旋体按照 WS 273 检验。

6.8 内毒素

内毒素按照《中华人民共和国药典(2020年版)》检验。

6.9 细胞 STR 鉴定

按照 T/CSCB 0002—2020 检验。

7 检验规则

7.1 批

在一个生产周期中,同一生产线、同一来源、同一代次、同一工艺制备出来的产品为一批。

7.2 抽样

在同一批的产品中随机抽取 3 个最小包装单元。

7.3 出厂检验

7.3.1 每批产品应进行出厂检验,并附检验报告。

7.3.2 出厂检验项目应包括第 5 章规定的所有项目。

7.4 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。

7.5 判定规则

7.5.1 出厂检验项目全部符合第 5 章规定,判为合格品;有 1 项及以上不符合本标准规定,则判为不合格品。

7.5.2 复核检验项目全部符合第 5 章规定,判为合格品;有 1 项及以上不符合本标准规定,则判为不合格品。

8 使用说明

应至少包括以下内容:

- a) 产品名称;
- b) 细胞代次;
- c) 细胞数量;
- 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。

9 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。

10 包装、储存及运输

10.1 包装

应选择对人自然杀伤细胞关键质量属性无影响的材料和容器。

10.2 储存

10.2.1 应符合 T/CSCB 0001—2020 要求。

10.2.2 应在不高于 $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下储存。

10.3 运输

10.3.1 应符合 T/CSCB 0001—2020 要求。

10.3.2 冻存的细胞应在干冰或不高于 $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下运输,非冻存细胞建议在 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下运输。

11 废弃物处理

人自然杀伤细胞生产和检测过程中产生的废弃物应建立废弃细胞管理文档,严格执行管理规范并详细记录。

人自然杀伤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。

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

附录 A

(规范性)

细胞标志性蛋白和纯度检测 流式细胞测定法

A.1 仪器和设备

A.1.1 流式细胞仪。

A.1.2 离心机。

A.2 试剂

A.2.1 PBS 溶液。

A.2.2 2%胎牛血清溶液(2%FBS)。

A.2.3 抗体。

A.2.4 按照相应要求配制流式检测所需的液体;洗涤液、抗体稀释液。

A.3 样品保存

洗涤液和染色后的样品于 2℃~8℃保存。相关抗体按说明书保存。

A.4 检测步骤

A.4.1 样品准备和抗体孵育

收集单细胞,250g,离心 3 min。弃上清,加入适量稀释后的抗体进行孵育(按照抗体说明书进行稀释使用)。

A.4.2 流式细胞术分析

用洗涤液重悬细胞,然后通过 40 μm 滤网转移到流式管中,按流式细胞仪应用手册上机检测。

A.4.3 圈门设定原则

首先根据前向角散射光信号(FSC)和侧向角散射光信号(SSC)设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 的基础上标记出阳性细胞群 2,排除没有被荧光抗体标记的阴性细胞。抗体同型对照作为阴性对照。

A.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。

附录 B

(规范性)

CD107a 脱颗粒、颗粒酶 B、穿孔素合成水平检测 流式细胞测定法

B.1 仪器和设备

B.1.1 流式细胞仪。

B.1.2 离心机。

B.1.3 细胞培养箱。

B.2 试剂

B.2.1 PBS 溶液。

B.2.2 2%胎牛血清溶液(2%FBS)。

B.2.3 抗体。

B.2.4 按照相应要求配制流式检测所需的液体;洗涤液、抗体稀释液。

B.2.5 靶细胞,如人类髓性白血病细胞系 K562 等。

B.3 样品保存

洗涤液和染色后的样品于 2 °C~8 °C 保存。相关抗体按说明书保存。

B.4 检测步骤

B.4.1 效应细胞与靶细胞收集

分别收集效应细胞 NK 细胞与靶细胞,如 K562 细胞,制备单细胞悬液,并计数。

B.4.2 效应细胞与靶细胞共孵育

按照效应细胞(E):靶细胞(T)=1:3 的比例(例:E:T=2×10⁵:6×10⁵) 在细胞培养板或培养皿中充分混匀,培养 1 h,培养条件为 CO₂ 浓度 5%,温度 37 °C。

B.4.3 流式细胞术检测

按照流式细胞术的检测流程,分别检测 NK 细胞的 CD107a(脱颗粒能力)、颗粒酶 B(Granzyme B) 和穿孔素(Perforin)合成水平。其中,CD107a 为胞外染色,颗粒酶 B 和穿孔素均为胞内染色。

B.4.4 圈门设定原则

首先根据前向角散射光信号(FSC)和侧向角散射光信号(SSC)设门圈出目标细胞分群 1,然后根据同型对照组荧光强度,在分群 1 的基础上标记出阳性细胞群 2,排除没有被荧光抗体标记的阴性细胞。抗体同型对照作为阴性对照,根据 CD3⁻CD45⁺CD56⁺ 可界定 NK 细胞群,随后从 NK 细胞中分析 CD107a、颗粒酶 B、穿孔素的阳性比例。

B.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。

附录 C

(规范性)

NK 细胞杀伤功能检测 流式细胞测定法

C.1 仪器和设备

C.1.1 流式细胞仪。

C.1.2 离心机。

C.1.3 细胞培养箱。

C.2 试剂

C.2.1 RPMI 1640 完全培养液。

C.2.2 PBS 溶液。

C.2.3 2%胎牛血清溶液(2%FBS)。

C.2.4 CFSE 检测试剂盒。

C.2.5 靶细胞,如人类髓性白血病细胞系 K562 等。

C.3 检测步骤

C.3.1 CFSE 标记靶细胞

收集靶细胞,如 K562 细胞,制备单细胞悬液,并计数。按照使用说明准备 CFSE 染色工作液,并用染色工作液重悬靶细胞,置于 37 °C 培养箱中避光孵育 30 min 进行 CFSE 标记。

C.3.2 效应细胞与靶细胞共孵育

分别收集效应细胞和 CFSE 标记的靶细胞,按照试验组 0 : 1/1 : 1/5 : 1/10 : 1 的细胞数比例配制效应细胞(E)和靶细胞(T)的混合物,在 96 孔培养板中充分混匀,孵育 4 h,培养条件为 CO₂ 浓度 5%,温度 37 °C。然后,收取 96 孔培养板中的细胞,用 PBS+2%FBS 溶液重悬细胞,按照使用说明加入 7-AAD 染色液在 2 °C~8 °C 避光孵育 15 min 后进行流式检测。

C.3.3 流式细胞术检测

按照流式细胞术的检测流程,流式细胞仪检测共孵育细胞中 CFSE 阳性靶细胞中 7-AAD 阳性细胞比例。

C.3.4 圈门设定原则

首先根据前向角散射光信号(FSC)和侧向角散射光信号(SSC)设门圈出目标细胞分群 1,然后在分群 1 的基础上根据 CFSE⁺可界定出靶细胞群 2。随后分析 CFSE 阳性靶细胞中 7-AAD 阳性细胞比例。

C.4 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。

附录 D

(规范性)

NK 细胞 ADCC 功能检测 流式细胞测定法

D.1 仪器和设备

D.1.1 流式细胞仪。

D.1.2 离心机。

D.1.3 细胞培养箱。

D.2 试剂

D.2.1 RPMI 1640 完全培养液。

D.2.2 利妥昔单抗(Rituximab)。

D.2.3 CFSE 检测试剂盒。

D.2.4 靶细胞,如 Raji(NK 细胞非敏感型 CD20 阳性淋巴瘤细胞系)。

D.3 检测步骤

D.3.1 CFSE 标记靶细胞

收集靶细胞,如 Raji 细胞,制备单细胞悬液,并计数。按照使用说明准备 CFSE 染色工作液,并用染色工作液重悬靶细胞,置于 37 °C 培养箱中避光孵育 30 min 进行 CFSE 标记。

D.3.2 效应细胞与靶细胞共孵育

分别收集效应细胞和 CFSE 标记的靶细胞,按照试验组 0 : 1/5 : 1/10 : 1 的细胞数比例配制效应细胞(E)和靶细胞(T)的混合物,同时按照加入的抗体进行分组,分为无抗体组、加 Rituximab 共两个组别。在 96 孔培养板中充分混匀,孵育 4 h,培养条件为 CO₂ 浓度 5%,温度 37 °C。然后,收取 96 孔培养板中的细胞,用 PBS+2%FBS 溶液重悬细胞,按照使用说明加入 7-AAD 染色液在 2 °C~8 °C 避光孵育 15 min 后进行流式检测。

D.3.3 流式细胞术检测

按照流式细胞术的检测流程,流式细胞仪检测共孵育细胞中 CFSE 阳性靶细胞中 7-AAD 阳性细胞比例。

D.3.4 圈门设定原则

首先根据前向角散射光信号(FSC)和侧向角散射光信号(SSC)设门圈出目标细胞分群 1,然后在分群 1 的基础上根据 CFSE⁺ 可界定出靶细胞群 2。随后分析 CFSE 阳性靶细胞中 7-AAD 阳性细胞比例。

D.4 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。
