

团 体 标 准

T/CSCB 0005—2021

人诱导多能干细胞

Human induced pluripotent stem cell

2021-01-09 发布

2021-04-09 实施

中国细胞生物学学会 发布



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：安徽中盛溯源生物科技有限公司、国家干细胞资源库、中国科学院干细胞与再生医学创新研究院、北京干细胞与再生医学研究院、中国科学院动物研究所、国家干细胞资源库创新联盟、中国计量科学研究院、北京工商大学。

本文件主要起草人：俞君英、赵同标、马爱进、张颖、张可华、程临钊、邓宏魁、康九红、金子兵、潘光锦、郝捷、张勇、傅博强、胡士军、那洁、刘妍、曹佳妮、王磊、祝焕新。

人诱导多能干细胞

1 范围

本文件规定了人诱导多能干细胞的技术要求、检测方法、使用说明、标签、包装、储存、运输和废弃物处理要求。

本文件适用于人诱导多能干细胞的生产 and 检测。

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
 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
 WS 299 乙型病毒性肝炎诊断标准
 T/CSCB 0001 干细胞通用要求
 T/CSCB 0002 人胚干细胞
 中华人民共和国药典
 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

人诱导多能干细胞 **human induced pluripotent stem cell**

由人体细胞经重编程而获得的具有自我更新能力和向三胚层细胞分化潜能的一种干细胞。

3.2

重编程 **reprogramming**

通过外源基因表达、化合物诱导、表观遗传修饰等途径来获得人诱导多能干细胞的过程。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA ——脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)
 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)

- HEBV ——人类疱疹病毒(Human Epstein-Barr Virus)
hiPSC ——人诱导多能干细胞(human induced Pluripotent Stem Cell)
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)
PCR ——聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)
STR ——短串联重复序列(Short Tandem Repeat)
TP ——梅毒螺旋体(Treponema Pallidum)

5 技术要求

5.1 原材料和辅料

- 5.1.1 应符合 T/CSCB 0001 要求。
5.1.2 应建立供者细胞采集的供者评估与筛选标准、采集方法、运输标准和交接标准,保证供者和细胞的安全。
5.1.3 供者应筛查 HIV、HBV、HCV、HTLV、EBV、HCMV 和 TP,并记录结果。

5.2 关键质量属性

5.2.1 细胞形态

应呈克隆团生长、克隆边缘清晰、核质比高、形态均一,克隆内细胞与细胞之间接触紧密。

5.2.2 染色体核型

正常核型应为 46,XY 或 46,XX。

5.2.3 细胞存活率

未冻存细胞存活率 $\geq 90\%$,冻存复苏后细胞存活率 $\geq 60\%$ 。

5.2.4 细胞标志蛋白

细胞表面标志物 SSEA3、SSEA4、TRA-1-60 和 TRA-1-81 中的任意两个阳性率 $\geq 70.0\%$;细胞内部标志物 OCT4 阳性率 $\geq 70.0\%$ 、NANOG 阳性率 $\geq 70.0\%$ 。

5.2.5 畸胎瘤形成

应具备在体内形成具有三胚层结构的畸胎瘤的能力。

5.2.6 微生物

真菌、细菌、支原体、HIV、HBV、HCV、HTLV、EBV、HCMV、TP 应为阴性。

5.3 过程控制

5.3.1 细胞鉴别

细胞产品 STR 检测结果应与供者细胞保持一致。

5.3.2 重编程方法

应记录重编程方法。

5.3.3 外源重编程基因

应检测并记录外源重编程基因的基因组整合及表达情况。

注：hiPSC 若作为功能细胞制剂原料，其外源重编程基因检测结果应为阴性。

6 检验方法

6.1 细胞形态

体外二维培养条件下，使用倒置相差显微镜观察。

6.2 染色体核型

按照《中华人民共和国药典》中“生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制”项检测。

6.3 细胞存活率

按照附录 A 的方法检测。

6.4 细胞标志蛋白

按照附录 B 的方法检测。

6.5 外源重编程基因

按照附录 C 的方法检测。

6.6 畸胎瘤形成

按照附录 D 的方法检测。

6.7 微生物

6.7.1 真菌

按照《中华人民共和国药典》中“1101 无菌检查法”项检测。

6.7.2 细菌

按照《中华人民共和国药典》中“1101 无菌检查法”项检测。

6.7.3 支原体

按照《中华人民共和国药典》中“3301 支原体检查法”项检测。

6.7.4 HIV

按照 WS 293 核酸法检验。

6.7.5 HBV

按照 WS 299 核酸法检测。

6.7.6 HCV

按照 WS 213 核酸法检测。

6.7.7 HTLV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

6.7.8 EBV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

6.7.9 HCMV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

6.7.10 TP

按照 WS 273 核酸法检测。

6.7.11 外源病毒因子检测

按照《中华人民共和国药典》中“3302 外源病毒因子检查法”项检测。

7 检验规则

7.1 抽样方法和数量

7.1.1 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。

7.1.2 在同一批的产品中随机抽取 3 个最小包装单元。

7.2 出厂检验

7.2.1 每批产品应进行出厂检验,并附检验报告。

7.2.2 出厂检验项目应包括 5.2 规定的所有项目。

7.3 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。

7.4 判定规则

7.4.1 出厂检验项目全部符合 5.2 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。

7.4.2 复核检验项目全部符合 5.2 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。

8 使用说明

应至少包括以下内容:

- a) 细胞名称;
- b) 细胞代次;
- c) 细胞数量;
- d) 重编程方法;
- e) 外源重编程基因残留检测结果;

- f) 生产日期;
- g) 生产批号;
- h) 生产组织;
- i) 储存条件;
- j) 运输条件;
- k) 使用方法;
- l) 执行标准号;
- m) 生产地址;
- n) 联系方式;
- o) 邮政编码;
- p) 注意事项。

注：根据用户需求，可标注内毒素含量。

9 标签

应至少包括以下内容：

- a) 细胞名称;
- b) 细胞代次;
- c) 细胞数量;
- 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

应选择对人诱导多能干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 和 T/CSCB 0002 要求。

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

10.3 运输

10.3.1 应符合 T/CSCB 0001 和 T/CSCB 0002 要求。

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

11 废弃物处理

人诱导多能干细胞的生产 and 检测过程中产生的废弃物应按照 T/CSCB 0001 中的规定处理。

附 录 A
(规范性)
细胞存活率 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,所用试剂均为分析纯,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:使用时,用磷酸盐缓冲液(A.2.1)稀释至 0.4%(质量浓度)。

A.3 检测步骤

A.3.1 细胞悬液制备

根据检测需求,收集待检测细胞,用磷酸盐缓冲液(A.2.1)配制细胞悬液。

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 μ L 混合液(A.3.2)滴在一侧计数室的盖玻片边缘,另取 10 μ 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。

按照步骤 A.3.2~A.3.3 再重复一次。

A.3.4 细胞存活率计算

A.4 计算与分析

细胞存活率计算公式见式(A.1):

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

式中:

- X ——细胞存活率;
- M ——细胞总数;
- S ——染色的细胞数。

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得超过算术平均值的 10%。

附录 B

(规范性)

细胞标志蛋白 细胞流式分析

B.1 仪器和设备

- B.1.1 流式细胞仪。
- B.1.2 水平离心机。
- B.1.3 电子天平。

B.2 试剂

本方法所用试剂均为分析纯,除特别说明外,实验用水均为 GB/T 6682 规定的一级水。

- B.2.1 氯化钠(NaCl):分析纯。
- B.2.2 氯化钾(KCl):分析纯。
- B.2.3 无水磷酸氢二钠(Na_2HPO_4):分析纯。
- B.2.4 无水磷酸二氢钾(KH_2PO_4):分析纯。
- B.2.5 多聚甲醛(PFA):纯度 95%。
- B.2.6 氢氧化钠(NaOH):分析纯。
- B.2.7 牛血清白蛋白(BSA):纯度 $\geq 98\%$ 。
- B.2.8 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)。
- B.2.9 抗体。
- B.2.10 使用电子天平(B.1.3)称量按照相应要求配制流式检测所需的液体,洗涤液、固定液、封闭通透液、抗体稀释液。

B.3 样品制备和保存

- B.3.1 洗涤液和固定后的样品于 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。
- B.3.2 固定液放入分装容器中,密封并标记,按照相关试剂使用说明保存。
- B.3.3 相关抗体按说明书保存。

B.4 检测步骤

B.4.1 样品准备和固定

收集单细胞,使用水平离心机(B.1.2)250g,离心 3 min。弃上清,加适量固定液冰上放置 10 min,然后使用水平离心机(B.1.2)取适量洗涤液洗涤 3 次~5 次,每次 3 min~5 min。

B.4.2 封闭和通透

用封闭通透液重悬细胞并把细胞分成两等份,分别作为实验组和同型对照抗体组,冰上孵育 20 min,然后用洗涤液清洗一遍。

B.4.3 抗体孵育

按照抗体说明书进行稀释使用。

B.4.4 过滤上机

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(B.1.1)应用手册上机检测。

B.4.5 圈门设定原则

首先根据颗粒度和透光性设门圈出目标细胞分群 1,排除死细胞和其他杂细胞,然后根据同型对照抗体组荧光强度,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。同型对照抗体作为阴性对照。

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)
外源重编程基因 定量 PCR 法

C.1 仪器和设备

C.1.1 定量 PCR 扩增仪。

C.2 试剂

C.2.1 商品化定量 PCR 扩增试剂盒。

C.2.2 商品化基因组 DNA 提取试剂盒。

C.2.3 目标基因 PCR 引物。

C.3 检测步骤

C.3.1 提取样品基因组 DNA。按照试剂盒说明书进行。

C.3.2 使用 DNA 定量标准品使用定量 PCR 扩增仪(C.1.1)进行定量 PCR 扩增,建立目标基因检测标准曲线。按照试剂盒说明书进行。

C.3.3 使用样品基因组 DNA 使用定量 PCR 扩增仪(C.1.1)进行定量 PCR 扩增,检测目标基因浓度。按照试剂盒说明书进行。

C.3.4 参照标准曲线确定目标基因浓度。

附录 D

(规范性)

分化潜能检测 畸胎瘤形成法

D.1 仪器和设备

- D.1.1 血球计数板。
- D.1.2 显微镜。
- D.1.3 水平离心机。
- D.1.4 电子天平。
- D.1.5 包埋机。
- D.1.6 切片机。
- D.1.7 展片机。
- D.1.8 载玻片。
- D.1.9 盖玻片。
- D.1.10 烘箱。
- D.1.11 通风橱。

D.2 试剂

- D.2.1 本方法所用试剂均为分析纯,除特别说明外,实验用水均为 GB/T 6682 规定的一级水。
- D.2.2 磷酸盐缓冲液。
- D.2.3 消化酶。
- D.2.4 4%台盼蓝染液。
- D.2.5 无水乙醇(C_2H_5OH):分析纯。
- D.2.6 二甲苯(C_8H_{10}):分析纯。
- D.2.7 石蜡(熔点 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$)。
- D.2.8 4%多聚甲醛。
- D.2.9 苏木素染液。
- D.2.10 伊红染液。
- D.2.11 中性树胶。

D.3 检测步骤

D.3.1 细胞样品的准备

D.3.1.1 细胞消化

离心收集细胞于离心管中,用生理盐水轻轻重悬细胞,避免形成气泡或者残留细胞团块。

D.3.1.2 细胞计数

根据附录 A 方法测定,计算细胞悬液活细胞浓度。

D.3.2 细胞移植

用注射器将 $1\times 10^6\sim 1\times 10^7$ 个人诱导多能干细胞注射到 6 周龄~8 周龄的免疫缺陷型小鼠皮下,

或肌肉,或睾丸白膜下的生精小管周隙,或肾被膜下等部位。

D.3.3 畸胎瘤收样及处理

D.3.3.1 收样

人诱导多能干细胞注射约 6 周~10 周后(确保畸胎瘤不超过荷载小鼠体重的 15%),对小鼠实施安乐死。剥离受体小鼠上的畸胎瘤并进行切割(体积不大于 5 mm×5 mm×2 mm),将畸胎瘤组织块用 4%多聚甲醛进行 4 ℃过夜固定。

D.3.3.2 石蜡切片及 HE 染色

对上述固定好的样本进行 HE 染色,镜下观察并拍照。

D.4 结果分析

观察到来源于 3 个胚层的组织,包括内胚层来源的消化道上皮腺体样组织、中胚层来源的软骨组织,以及外胚层来源神经组织等,即证明所接种的人诱导多能干细胞具有体内向 3 个胚层组织分化的多能性。

中国细胞生物学学会
团体标准
人诱导多能干细胞
T/CSCB 0005—2021

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

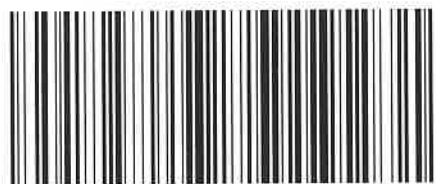
*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 24 千字
2021年1月第一版 2021年1月第一次印刷

*

书号: 155066·5-2723 定价 18.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



T/CSCB 0005-2021



码上扫一扫 正版服务到