

团 体 标 准

T/CSCB 0006—2021

人视网膜色素上皮细胞

Human retinal pigment epithelial 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：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、北京工商大学、中国计量科学研究院、北京市眼科研究所、清华长庚医院、中国人民解放军总医院。

本文件主要起草人：赵同标、郝捷、王磊、马爱进、傅博强、金子兵、胡运韬、吴畏、俞君英、张愚、魏军、张勇、李启沅、胡士军、周家喜、曹佳妮、祝焕新。

人视网膜色素上皮细胞

1 范围

本文件规定了人视网膜色素上皮细胞的技术要求、检验方法、检验规则、使用说明、标签、包装、储存、运输和废弃物处理要求。

本文件适用于人视网膜色素上皮细胞的生产和检测。

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 293 艾滋病和艾滋病病毒感染诊断标准

WS 213 丙型肝炎诊断

WS 273 梅毒诊断

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

人视网膜色素上皮细胞 **human retinal pigment epithelial cell**

经人视网膜原代分离或分化、转分化等方式获得的，可形成紧密连接的含有色素颗粒的六边形单层上皮细胞。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BEST1——斑菱蛋白(Bestrophin)

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)

MITF ——小眼畸形相关转录因子(Microphthalmia-Associated Transcription Factor)

OTX2 ——同源盒基因(Orthodenticle Homeobox 2)

PEDF ——色素上皮衍生因子(Pigment Epithelium Derived Factor)
RPE65 ——视网膜色素上皮细胞 65 蛋白(Retinal Pigment Epithelial Cell 65 Protein)
STR ——短串联重复序列(Short Tandem Repeat)
TP ——梅毒螺旋体(Treponema Pallidum)
VEGF ——血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor)
ZO-1 ——紧密连接蛋白(Zonula Occludens-1)

5 技术要求

5.1 原材料和辅料

5.1.1 原材料要求

5.1.1.1 原材料来源应符合国内认可的伦理和当地的法律法规。

5.1.1.2 细胞材料供者应签署书面的合法有效的知情同意书,包括但不限于,在合适条件下潜在研究及治疗的应用、意外发现的反馈、研究成果潜在的商业应用以及其他问题所适用的内容。应建立供者个人隐私保护机制。

5.1.1.3 细胞研究和生产组织应建立并执行供者评估标准,应建立采集方法、运输、交接及储存标准,保证供者和细胞的安全。原材料应具有相应的获取方式、途径以及相关的临床资料,包括但不限于供者的一般信息、既往病史及家族史等。应对既往病史和家族史遗传性疾病相关信息进行详细采集。根据情况应收集供者的 ABO 血型、人类白细胞抗原(HLA) I 类和 II 类分型资料。

5.1.1.4 细胞系起源应通过查阅相关的知情同意书及其基因组和功能性鉴定的原始数据来确证。

5.1.1.5 培养基、生长因子等辅料应符合相应的质量要求。必要时,应对辅料进行检验。

5.1.1.6 使用动物血清时,应无特定动物源性病毒污染。禁止使用海绵体状脑病流行区来源的牛血清。

5.1.1.7 若培养基中含有人血液成分,如白蛋白、转铁蛋白和各种细胞因子等,应明确其来源、批号及质量检定合格报告,并尽量采用国家已批准的相关产品。

5.1.2 供者应筛查 HIV、HBV、HCV、HTLV、EBV、HCMV、TP,并记录结果。

5.2 关键质量属性

5.2.1 细胞形态

细胞内可见色素,细胞单层贴壁生长条件下,细胞间紧密接触、呈多边形。

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 $\geq 50\%$ 。

5.2.4 细胞标志蛋白

ZO-1 阳性率 $\geq 70\%$,RPE65、OTX2、MITF、BEST1 中至少 3 个阳性率 $\geq 70\%$ 。

5.2.5 分泌功能

应具有分泌 PEDF 和 VEGF 功能。

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 扩增

5.3.1.1 细胞扩增过程中应避免细胞系之间交叉污染、混淆等,并建立风险应对措施。

5.3.1.2 细胞扩增过程应明确细胞的培养代次和细胞名称,注明操作日期、培养条件、操作人姓名或首写字母。

5.3.2 分化

5.3.2.1 细胞分化所用的起始细胞、设备、培养体系以及操作步骤应该明确,建立标准的、可重复的流程,采用相同的分化流程可以重复得到同样的分化细胞群。

5.3.2.2 细胞分化过程产生的分化细胞应有但不限于明确的形态特征、系统的标志分子鉴定。

5.3.3 冻存

5.3.3.1 冻存的细胞应标明细胞名称、培养条件、代次、操作人名字或首写字母和冻存日期等。冻存细胞应具有唯一标识,与其采集、分离、扩增等过程对应。

5.3.3.2 应符合冻存原则,并做好对应细胞冻存记录。

5.3.4 复苏

5.3.4.1 复苏过程应快速融化,最大程度地确保细胞活力和生物学活性。

5.3.4.2 应明确标明细胞信息,包括但不限于细胞名称、代次、培养条件、操作人名字或首写字母及复苏时间等。

5.3.5 细胞 STR 鉴别

细胞 STR 检测结果应与供者细胞保持一致。

6 检测方法

6.1 细胞形态

体外二维贴壁培养条件下,铺满后至少再培养 10 d,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》检验。

6.3 细胞存活率

按照附录 A 的方法检验。

6.4 细胞标志蛋白

按照附录 B 的方法检验。

6.5 分泌功能

按照附录 C 的方法检验。

6.6 微生物

6.6.1 真菌

按照《中华人民共和国药典》中“1101 无菌检查法”项检测。

6.6.2 细菌

按照《中华人民共和国药典》中“1101 无菌检查法”项检测。

6.6.3 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。

6.6.4 HIV

按照 WS 293 核酸法检验。

6.6.5 HBV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

6.6.6 HCV

按照 WS 213 核酸法检验。

6.6.7 HTLV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

6.6.8 EBV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

6.6.9 HCMV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

6.6.10 TP

按照 WS 273 核酸法检验。

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) 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) 使用方法;
- j) 执行标准号;
- k) 生产地址;
- l) 联系方式;
- m) 邮政编码;
- n) 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) 产品名称;
- 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

应选择对人视网膜色素上皮细胞关键质量属性无影响的材料和容器。

10.2 储存

10.2.1 应制定并遵守细胞储存管理原则和流程,详细记录信息,包括但不限于向细胞储存组织提出的书面申请和细胞系的具体信息等。

10.2.2 细胞的领用应由使用组织或个人提出申请,经细胞储存组织审核同意。

10.2.3 在细胞库储存的细胞应符合相应的细胞库管理要求。

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

10.3 运输

10.3.1 根据细胞的使用要求,选择合适的运输方式和运输条件,保证细胞生物学特性、安全性、稳定性和有效性。

10.3.2 细胞的运输应考虑但不限于细胞特性、承载细胞的容器、运输路线、运输条件、运输设备、运输方式、运输风险和保障措施等因素。

10.3.3 运输条件的控制应包括但不限于温度范围、振荡、无污染、设备性能和包装等。

10.3.4 细胞的运输应记录,包括但不限于细胞运输的方式和条件、路径、时间、人员、地址及细胞信息等。

10.3.5 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

11.1 人视网膜色素上皮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。

11.2 人视网膜色素上皮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。

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 $10\text{ }\mu\text{L}$ 混合液(A.3.2)滴在一侧计数室的盖玻片边缘,另取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 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

细胞存活率按式(A.1)进行计算:

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

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得超过算术平均值的 10%。

附录 B

(规范性)

细胞标志蛋白检测 流式细胞分析法

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 磷酸盐缓冲液:pH 7.4。

B.2.2 多聚甲醛(PFA):纯度 95%。

B.2.3 牛血清白蛋白(BSA):纯度 $\geq 98\%$ 。

B.2.4 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)。

B.2.5 抗人源 ZO-1、RPE65、OTX2、MITF、BEST1 蛋白的抗体及同型对照。

B.2.6 使用电子天平(B.1.3)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 样品保存

洗涤液和固定后的样品于 2℃~8℃保存。固定液放入分装容器中,密封并标记,根据相关试剂使用说明保存。相关抗体遵说明书保存。

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

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。抗体同型对照作为阴性对照。

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)
分泌功能检测 酶联免疫试剂盒法

C.1 仪器和设备

C.1.1 酶标仪。

C.2 试剂

PEDF、VEGF 酶联免疫试剂盒。

C.3 样品保存

收集的细胞培养上清液,可以储存在-20℃冰箱。试剂盒试剂应遵说明书保存。

C.4 检测步骤

遵照试剂盒说明书,使用酶标仪(C.1.1)进行检测。

C.5 结果分析

得到的检测结果用公式计算,具体参考试剂盒相关说明。

参 考 文 献

- [1] T/CSCB 0001 干细胞通用要求
-

中国细胞生物学学会
团 体 标 准
人视网膜色素上皮细胞
T/CSCB 0006—2021

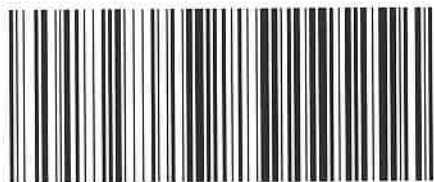
中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

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: 155066·5-2722 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 0006-2021



码上扫一扫 正版服务到