

团 体 标 准

T/CSCB 0008—2021

原 代 人 肝 细 胞

Primary human hepatocyte

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：中国科学院上海药物研究所、中国科学院分子细胞科学卓越创新中心、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、中国医药生物技术协会、中国食品药品检定研究院、南京鼓楼医院、美国康宁生命科学(吴江)有限公司、上海权洋生物科技有限公司、上海微知卓生物科技有限公司。

本文件主要起草人：潘国宇、程新、赵同标、郝捷、彭兆亮、吴佳颖、胡士军、马爱进、曹楠、张愚、李启沅、俞君英、孟淑芳、纳涛、施晓雷、李玫、柳华东、钱林广、田娥、林峰、曹佳妮、王磊、祝焕新。

原代人肝细胞

1 范围

本文件规定了原代人肝细胞的技术要求、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。

本文件适用于出生后原代人肝细胞的生产和检测。

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。

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

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、缩略语

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

原代人肝细胞 **primary human hepatocyte; PHH**

通过人体肝脏分离获得,具有合成、分泌、代谢、解毒等生理功能以及分子极性特征的肝实质细胞。

3.2

肝实质细胞 **hepatocyte**

形态呈多面体形,核大而圆,居中,常染色质丰富,部分细胞有双核或多核,具有极性,其表面可分为窦状隙面、胆小管面和肝细胞连接面,具有合成、分泌、代谢、解毒以及储存等重要生理功能,是组成肝实质的主要细胞类群。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ALB——人血清白蛋白(Albumin)

BEI——胆汁分泌指数(Biliary Excretion Index)

CYP——细胞色素 P450 代谢酶家族(Cytochrome P450)

EBV——人类疱疹病毒(Epstein Barr Virus)

HAV——甲型肝炎病毒 (Hepatitis A Virus)
HIV——人类免疫缺陷病毒 (Human Immunodeficiency Virus)
HBV——乙型肝炎病毒 (Hepatitis B Virus)
HCMV——人巨细胞病毒 (Human Cytomegalo Virus)
HCV——丙型肝炎病毒 (Hepatitis C Virus)
HTLV——人类嗜 T 细胞病毒 (Human T-lymphotropic Virus)
HNF4A——肝细胞核因子 4A (Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha)
TP——梅毒螺旋体 (Treponema Pallidum)

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细胞供者评估标准,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。细胞都应具有细胞的获取方式、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。既往病史和家族史要对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 若培养基中含有人的血液成分,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 供者建议筛查 HIV、HAV、HBV、HCV、HTLV、TP,并记录结果。

5.1.3 细胞的分离获取应在一级(或二级)生物安全实验室中操作。

5.2 关键质量属性

5.2.1 细胞形态

光镜下观察贴壁生长细胞,应具备多角形特征,直径 $20\ \mu\text{m}\sim 30\ \mu\text{m}$,核大而圆,部分细胞有双核或多核,贴壁培养细胞间可形成紧密连接。

5.2.2 细胞存活率

复苏后细胞存活率 $\geq 70\%$ 。

5.2.3 细胞标志蛋白

ALB 阳性率 $\geq 90\%$,且 HNF4A 阳性率 $\geq 90\%$ 。

5.2.4 白蛋白分泌

$\geq 800 \text{ ng}/(10^6 \text{ 细胞} \cdot 24 \text{ h})$ 。

5.2.5 药物代谢酶功能

内在清除率 $\geq 100 \mu\text{L}/(10^6 \text{ 细胞} \cdot \text{h})$ (以 CYP3A4 为代表,底物为睾酮)。

5.2.6 胆汁分泌(仅适用可贴壁细胞)

BEI 指数 $\geq 30\%$ (以 d8-TCA 为底物)。

5.2.7 微生物

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

5.3 过程控制

5.3.1 细胞分离

5.3.1.1 细胞分离过程中应避免不同供体、组织和细胞之间交叉污染、混淆等,并建立风险应对措施。

5.3.1.2 细胞分离后培养、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 细胞分离流程和细胞鉴定

5.3.2.1 细胞分离所用的设备、培养体系及操作步骤应该明确,建立标准的、可重复的流程,采用相同的分离流程可以重复得到同样的人原代肝细胞。

5.3.2.2 分离产生的人原代肝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 检验方法

6.1 细胞形态

二维培养条件下,用细胞显微镜进行观察。

6.2 细胞存活率

按照附录 A 的方法检验。

6.3 细胞标志蛋白

按照附录 B 的方法检验。

6.4 白蛋白分泌

按照附录 C 的方法检测。

6.5 药物代谢酶功能

按照附录 D 的方法检测。

6.6 胆汁分泌指数

按照附录 E 的方法检验。

6.7 微生物(微生物含量由厂家提供相应报告支持)

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 HAV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

6.7.6 HBV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

6.7.7 HCV

按照 WS 213 核酸法检验。

6.7.8 HTLV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

6.7.9 EBV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

6.7.10 HCMV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

6.7.11 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;有一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;有一项及以上不符合本文件规定,则判为不合格品。

8 使用说明

应包括但不限于以下内容:

- a) 产品名称;
- b) 细胞来源;
- 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

应包括但不限于以下内容:

- a) 产品名称;
- b) 细胞来源;
- 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

应选择对原代人肝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 原代人肝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 原代人肝细胞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 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

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 mm² 方格中的细胞数应为 20 个~50 个细胞。

A.3.2 细胞染色

按 1:1 的体积比,将台盼蓝染液(A.2.2)与细胞悬液混合均匀。

A.3.3 细胞计数(手动或细胞计数仪计数)¹⁾

手动计数方法:将盖玻片盖在血球计数板(A.1.2)计数槽上,将 10 μL 台盼蓝染液(A.2.2)与细胞悬液(A.3.1)混合液滴在计数室边缘的 V 型凹槽内,使混合液均匀分布在盖玻片和计数板之间,静置 30 s 后置于显微镜(A.1.1)下,对所有细胞以及被染色的细胞分别计数。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 mm² 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)。

按照上述步骤再重复测定一次。

A.4 细胞存活率计算

细胞存活率按式(A.1)进行计算:

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

式中:

X —— 细胞存活率;

M —— 细胞总数;

S —— 染色的细胞数。

1) 具体方案以实验报告为准。

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 20%。

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.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)。

B.2.3 牛血清白蛋白(BSA):纯度 $\geq 98\%$ 。

B.2.4 抗人 ALB 抗体、抗人 HNF4A 抗体及同型对照抗体。

B.2.5 按照相应要求配制流式检测所需的液体:固定液、洗涤液、抗体稀释液。

B.3 样品保存

洗涤液和固定后的样品于 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。相关抗体遵说明书保存。

B.4 检测步骤

B.4.1 收集单细胞

使用水平离心机(B.1.2),250g 离心 3 min,弃上清,收取 $1\times 10^5\sim 3\times 10^5$ 细胞。

B.4.2 固定

加入适量固定液固定,然后用适量洗涤液洗涤 3 次 $\sim$ 5 次,使用水平离心机(B.1.2),250g 离心 3 min,弃上清。细胞重悬后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,或直接进行检测。

B.4.3 穿膜

用适量洗涤液重悬细胞,将细胞悬液等分为两份,分别作为实验组和同型对照组。离心后加入适量穿膜液穿膜,然后用洗涤液洗涤 2 次 $\sim$ 3 次,使用水平离心机(B.1.2),250g 离心 3 min,弃上清。

B.4.4 一抗孵育

按照抗体说明,用抗体稀释液按比例稀释抗人 ALB 抗体和抗人 HNF4A 抗体(B.2.4)。按照对应的抗体亚型和浓度,配制同型对照抗体。用稀释后的抗人 ALB 抗体和抗人 HNF4A 抗体(B.2.4)和同型对照抗体分别重悬实验组和同型对照组的细胞。随后,按照抗体说明选择合适的条件孵育一抗,室温避光孵育 30 min 后用洗涤液洗涤 3 次 $\sim$ 5 次,使用水平离心机(B.1.2),250g 离心 3 min,弃上清。

B.4.5 二抗孵育

对应一抗抗体源性及亚型选择合适的二抗。按照抗体说明,用抗体稀释液稀释抗体,并分别重悬上述两组细胞,室温避光孵育 30 min。

B.4.6 过滤上机

二抗孵育完成后,用洗涤液洗涤 3 次~5 次,使用水平离心机(B.1.2),250g 离心 3 min,弃上清。用洗涤液重悬细胞,并经滤网(直径 70 μm)过滤除去细胞团块后转入流式管,上机检测。

B.5 数据处理

利用相关流式细胞分析软件处理原始数据:首先根据细胞颗粒度(SSC)和透光性(FSC)参数鉴别活细胞类群,并排除细胞碎片及多细胞聚团。根据同型对照组在特定通道的荧光强度设置阴性对照,进而分析实验组的细胞分群情况及阳性细胞比例。原代人肝细胞 ALB 阳性细胞比例应 $\geq 90\%$,同时 HNF4A 阳性细胞比例应 $\geq 90\%$ 。

附 录 C

(规范性)

细胞分泌蛋白检测 酶联免疫法

C.1 仪器和设备

C.1.1 酶标仪。

C.2 试剂

按照相应要求配制酶联免疫法(ELISA)检测所需的试剂,包括包被液、洗涤液、封闭液、样品稀释液及终止液等。

C.3 样本保存

收集贴壁培养 24 h 的原代人肝细胞培养液,离心后收集上清,并记录体积。同时,收集原代人肝细胞,计算细胞数量。培养液上清可保存于一80℃。

C.4 检测步骤

C.4.1 样品和标准品准备

根据试剂盒说明书的测试范围,适当稀释培养液上清样品。根据试剂盒说明书对试剂盒中的标准品进行系列浓度稀释。

C.4.2 一抗包被

利用包被液稀释抗体后加入 96 孔板,室温孵育。洗涤液洗 3 次~5 次,除去残留液体。

C.4.3 封闭

加入封闭液,室温孵育。用洗涤液洗 3 次~5 次,并除去残留液体。

C.4.4 样品孵育

加入待测样品和梯度稀释的标准品,室温孵育。用洗涤液洗 3 次~5 次,除去残留液体。

C.4.5 二抗孵育

利用包被液稀释抗体后加入 96 孔板,室温孵育。用洗涤液洗 3 次~5 次,除去残留液体。

C.4.6 底物显色

加入底物显色(TMB)底物溶液,室温避光孵育。

C.4.7 反应终止及检测

加入终止液,终止反应,立即利用酶标仪(C.1.1)检测吸光度。

C.5 数据处理

首先根据白蛋白酶联免疫法 ELISA 的标准品浓度及其对应的吸光度值绘制标准曲线,并根据标准

曲线读取样品白蛋白浓度 A。24 h 内原代人肝细胞分泌至细胞培养液中的白蛋白含量,见式(C.1):

$$B=A \times V \quad \cdots \cdots \cdots (C.1)$$

式中:

- B —— 白蛋白含量;
- A —— 白蛋白浓度;
- V —— 上清体积。

原代人肝细胞的 24 h 平均白蛋白分泌量,见式(C.2):

$$D=B/E \quad \cdots \cdots \cdots (C.2)$$

式中:

- D —— 白蛋白分泌量,单位为纳克每 10⁶ 细胞 24 小时[ng/(10⁶ 细胞·24 h)];
- B —— 白蛋白含量;
- E —— 细胞数。



附 录 D

(规范性)

细胞代谢功能检查 药物代谢酶功能

D.1 底物分类和质谱定性离子

底物分类见表 D.1,质谱定性离子对见表 D.2。

表 D.1 底物分类表

CYP450 酶系	底物	代谢产物
CYP1A2	非那西汀	对乙酰氨基酚
CYP3A4	睾酮	6β-OH 睾酮
CYP2B6	安非他酮	4-OH 安非他酮
注：底物及代谢产物为标准物质且纯度均大于 98%。		

表 D.2 质谱定性离子对表

底物	建议定性离子对	代谢产物	建议定性离子对
非那西汀	180/110.1	对乙酰氨基酚	152.1/11.01
睾酮	289.1/97.05	6β-OH 睾酮	305/269.2
安非他酮	240.1/184	4-OH 安非他酮	256.1/238

D.2 实验分组

见表 D.3。

表 D.3 实验分组表

组别	实验组 (n=3)	阴性对照 (n=3)
	原代人肝细胞	
化合物浓度	1 μmol/L	1 μmol/L
取样时间点	Pre-0 h、Pre-4 h、0 h、0.5 h、1 h、2 h 及 4 h	
注 1: 所有反应体系均加入 4%BSA 以减少非特异性吸附对于实验结果的影响。		
注 2: Pre-0 h 和 Pre-4 h 时间点,指从刚配置的药物中以及相同环境下放置 4 h 后取样,均属于空白对照组,以消除空白对照本底和实验环境影响。		
注 3: 0 h 和 0.5 h:从药物加入细胞后 0.5 h 内分次取样。		
由于睾酮消除较快,采样时间建议为 0 min、2 min、5 min、10 min 和 30 min(由于个体差异,代谢慢的采样时间可以根据实际情况进行调整)。		

D.3 试验步骤

D.3.1 复苏后的原代人肝细胞按不少于 1×10^6 细胞/孔铺于 12 孔板或 24 孔板,每孔 0.5 mL 培养液,三个生物学重复 (n=3)。

D.3.2 每孔各加入 0.5 mL 溶于原代人肝细胞培养基的底物(底物清除测试,终浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$,混匀后立即取 $100 \mu\text{L}$ 细胞悬液与 $300 \mu\text{L}$ 冰乙腈混合,即为 0 h 时间点。

D.3.3 其余实验样本于 37°C 恒温培养摇床中孵育,转速 100 r/min 。在相应时间点,分别取细胞上清 $100 \mu\text{L}$ 与 $300 \mu\text{L}$ 冰乙腈混合,终止反应。

D.3.4 取终止后的样品,涡旋混匀,离心后取上清 $150 \mu\text{L}$ 进行液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)分析。

D.4 数据处理

D.4.1 作图软件

推荐 GraphPad Prism 5.0 以上或者类似软件。

D.4.2 内在清除率(Intrinsic Clearance, CL_{int})的计算

将样品或阳性药的测得峰面积与内标峰面积比值取自然对数值作为纵坐标,以时间(h)为横坐标,作图并进行线性回归分析($Y=a \times x+b$)。内在清除率按式(D.1)计算:

$$CL_{\text{int}} = (0.693/T_{1/2}) \times (V/M) \quad \text{.....(D.1)}$$

式中:

CL_{int} —— 内在清除率,单位为纳克每 10^6 细胞 24 小时 [$\text{ng}/(10^6 \text{ 细胞} \cdot 24 \text{ h})$];

$T_{1/2}(\text{h})$ —— $0.693/K$;

K —— 消除速率常数;

V —— 孵育体积;

M —— 孵育细胞数目(以 10^6 cells 为单位)。

附 录 E

(规范性)

胆汁分泌指数检测

E.1 实验原理

原代人肝细胞经过贴壁培养后,形成胆小管结构。利用不含 Ca^{2+} 的汉克斯平衡(HBSS)孵育可破坏原代人肝细胞间的胆小管结构,从而诱导胆小管中药物的释放。而利用含 Ca^{2+} 的 HBSS 培养原代人肝细胞后,检测到的蓄积量为细胞药物蓄积量和胆小管内药物含量之和。 BEI 按式(E.1)计算:

$$BEI = (A_{\text{Ca}^{2+}} - A_{\text{Ca}_{\text{free}}^{2+}}) / A_{\text{Ca}^{2+}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (\text{E.1})$$

式中:

$A_{\text{Ca}^{2+}}$ ——含钙 HBSS 孵育条件下,原代人肝细胞中的底物浓度;

$A_{\text{Ca}_{\text{free}}^{2+}}$ ——不含钙 HBSS 孵育条件下,原代人肝细胞中的底物浓度。

BEI 试验一般用于评价被测药物是否为外排转运体的底物;通常情况下,当受试化合物的 BEI 指数 $>10\%$,则可认为该化合物为原代人肝细胞胆小管侧外排转运体的底物。

E.2 实验目的

测试 d8-TCA(牛磺胆酸-d8 钠盐)的 BEI 值。

E.3 仪器设备

三重四极杆液质联用仪,细胞培养箱及超净台。

E.4 试剂

按照相应要求使用细胞复苏及培养所需的细胞培养基。

E.5 实验方法

E.5.1 分离原代人肝细胞,进行三明治培养,并检测细胞的量或浓度。

E.5.2 分别配制含钙和不含钙($+/-\text{Ca}^{2+}$)的 HBSS 溶液。

E.5.3 配药:利用含 Ca^{2+} 的 HBSS 配制 d8-TCA($5 \mu\text{M}$)。

E.5.4 弃去原培养基,分别加入 $+/-\text{Ca}^{2+}$ 的 HBSS 洗 3 次。再分别加入含钙或不含钙的 HBSS 培养液, 37°C 孵育 15 min。

E.5.5 移除上清液,加入用含 Ca^{2+} 的 HBSS 配制的药物 37°C 孵育 15 min。

E.5.6 弃去药液,用冰上预冷的 PBS 洗 3 次,终止反应。

E.5.7 封口膜封口后放 -80°C 保存,或直接处理样品用于质谱分析。

E.6 数据处理方法

根据标准曲线计算各组药物浓度,并用相应蛋白浓度进行校正:

样品浓度/相应蛋白浓度 = 校正后样品浓度。

取含钙、无钙两组的平均值,计算 BEI 。

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
原 代 人 肝 细 胞
T/CSCB 0008—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

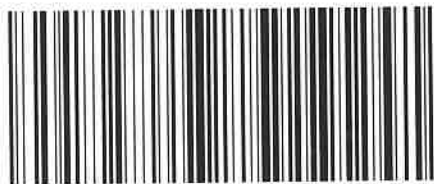
*

开本 880×1230 1/16 印张 1.5 字数 36 千字
2021年1月第一版 2021年1月第一次印刷

*

书号: 155066·5-2720 定价 24.00 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 0008-2021



码上扫一扫 正版服务到