



团 体 标 准

T/CSCB 0011—2022

人中脑多巴胺能神经前体细胞

Human midbrain dopaminergic progenitor

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

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 术语和定义 1

4 缩略语 1

5 技术要求 2

6 检验方法 3

7 检验规则 4

8 使用说明 5

9 标签 5

10 包装、储存及运输 5

11 废弃物处理..... 6

附录 A（规范性） 细胞存活率检测 细胞计数法 7

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） 8

附录 C（规范性） 多巴胺分泌检测 高效液相色谱法 10

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。

本标准由中国细胞生物学学会标准工作委员会提出。

本标准由中国细胞生物学学会归口。

本标准起草单位：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、北京工商大学、中国干细胞与再生医学协同创新平台、中盛溯源生物科技有限公司、中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心、首都医科大学宣武医院、南京医科大学、北京泽辉辰星生物科技有限公司、中山大学、中国标准化研究院、中国医学科学院血液学研究所血液病医院、昆明理工大学、中国计量科学研究院、中国科学院微生物研究所、中国科学技术信息研究所。

本标准主要起草人：王昱凯、赵同标、周琪、胡宝洋、马爱进、郝捷、张颖、陈跃军、陈志国、俞君英、刘妍、刘长梅、张愚、项鹏、王长林、滕兆乾、周家喜、李天晴、王柳、傅博强、付钰、朱礼军、梁灵敏、曹佳妮、冯琳、王磊。





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

人中脑多巴胺能神经前体细胞

1 范围

本文件规定了人中脑多巴胺能神经前体细胞的技术要求、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。

本文件适用于人中脑多巴胺能神经前体细胞的生产和检测。

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（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

人中脑多巴胺能神经前体细胞 **human midbrain dopaminergic progenitor**

一类成熟后可以变为具有合成并释放多巴胺递质能力的神经元的神经前体细胞。

注：包括具有人大脑黑质致密区（SNc）A9 型和腹侧被盖区（VTA）A10 型多巴胺能神经元特征的前体细胞。

3.2

中脑 **midbrain**

脊椎动物早期胚胎中神经管的中间部分，位于间脑和后脑之间，并与它们相连接。发育后期形成上丘脑、下丘脑、黑质和红核等核团。

3.3

多巴胺 **dopamine**

一种神经传导物质，去甲肾上腺素的前体，是帕金森病患者脑中缺失的一种关键神经递质。

4 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）

HCV：丙型肝炎病毒（Hepatitis C Virus）

HCMV:人巨细胞病毒(Human Cytomegalovirus)
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)

5 技术要求

5.1 原材料和辅料

5.1.1 原材料的获取应符合国内认可的伦理和当地的法律法规。

5.1.2 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机制。

5.1.3 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)分型资料。

5.1.4 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。

5.1.5 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。

5.1.6 使用动物血清时,应无特定动物源性病毒污染。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。

5.1.7 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

二维培养条件下,单个细胞呈不规则形状,光镜下细胞核不明显。

5.2.2 染色体核型

正常核型应为46,XX或46,XY。

5.2.3 细胞存活率

未冻存 $\geq 80\%$,冻存复苏后 $\geq 30\%$ 。

5.2.4 细胞标志蛋白

FOXA2和LMX1A双阳性率 $\geq 70\%$ 、LMX1A和EN1双阳性率 $\geq 15\%$ 。

5.2.5 细胞功能指标

经培养后可形成多巴胺能神经元,并具有以下特征。

- 细胞形态:部分细胞聚团生长,有较长的神经纤维。
- 细胞标志蛋白:FOXA2阳性率 $\geq 50\%$ 、LMX1A阳性率 $\geq 50\%$ 、TH阳性率 $\geq 10\%$ 。
- 多巴胺释放:KCl刺激后分泌多巴胺 ≥ 0.5 ng/mL/30 min/ $2\sim 4\times 10^6$ 细胞。

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 分化

5.3.1.1 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相同的分化细胞群。

5.3.1.2 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。

5.3.2 冻存

5.3.2.1 冻存的细胞应记录细胞名称,培养条件,代次,操作人名字或首写字母和冻存日期等。

5.3.2.2 应符合冻存规则,并做好对应细胞冻存记录。

5.3.3 复苏

5.3.3.1 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。

5.3.3.2 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。

5.3.4 细胞 STR 鉴别

细胞 STR 检测结果应与供者或起始细胞保持一致。

6 检验方法

6.1 细胞形态

体外二维贴壁培养条件下,用倒置显微镜进行细胞形态。

6.2 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。

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(仲裁法)或流式细胞分析法检验。

6.5 细胞功能指标

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(2020 年版)》中的“1101 无菌检查法”检测。

6.6.2 细菌

按照《中华人民共和国药典(2020 年版)》中的“1101 无菌检查法”检测。

6.6.3 支原体

按照《中华人民共和国药典(2020 年版)》中的“1101 无菌检查法”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) 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,可标注内毒素含量。

9 标签

应至少包括以下内容:

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

10 包装、储存及运输

10.1 包装

应选择对多巴胺神经前体细胞关键质量属性无影响的材料和容器。

10.2 储存

10.2.1 应选择不影响细胞质量性状的保护剂。

10.2.2 应在低于-130℃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。

10.3.4 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 人中脑多巴胺能神经前体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。

11.2 人中脑多巴胺能神经前体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(参照 GB/T 6682)。

- 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 mm² 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 μL 混合液(A.3.2)滴在一侧计数室的盖玻片边缘,另取 10 μL 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 mm² 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:

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

- 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得超过算术平均值的 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

荧光显微镜。

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。

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、防淬灭剂于一20℃ 保存。Triton-X100、无色指甲油室温保存。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。

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 拍照

随机取至少 3 个不同视野,在荧光显微镜(B.1.1)下拍照。

B.4.8 计算与分析

随机对至少 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。

细胞标志蛋白阳性比例按公式(B.1)进行计算:

$$Q = N/M \times 100\% \quad \dots\dots\dots (B.1)$$

式中:

Q ——标志蛋白阳性比例;

N ——抗体阳性的细胞总数;

M ——Hoechst 阳性细胞总数,≥1 500。



附 录 C

(规范性)

多巴胺分泌检测 高效液相色谱法

C.1 仪器和设备

高效液相色谱仪。

C.2 试剂

C.2.1 Hanks 平衡盐溶液(Hanks' balanced salt solution, HBSS)

C.2.2 56 mmol/L 氯化钾(KCl)溶液。

C.2.3 多巴胺标准品。

C.3 试验分组

C.3.1 对照组:56 mmol/L 氯化钾溶液。

C.3.2 实验组:56 mmol/L 氯化钾溶液 37 °C 条件下处理细胞 30 min。

C.4 检测步骤

C.4.1 样品准备

收集分化细胞,计数后接种到培养皿中。

C.4.2 样品处理

待细胞贴壁后,弃掉培养上清,用 HBSS 清洗一遍。用 56 mmol/L KCl 溶液 37 °C 条件下处理 30 min。

C.4.3 样品收集与保存

收集处理后的上清,—80 °C 冰箱保存或者干冰条件下送样。注意避光保存,防止多巴胺分解。

C.4.4 样品检测

高效液相色谱仪检测不同浓度梯度多巴胺标准品、对照组和实验组样品的多巴胺峰面积。

C.4.5 计算

根据标准品浓度和峰面积拟合换算见公式(C.1):

$$y = kx + b \quad \dots\dots\dots (C.1)$$

式中:

y ——该标准品测得的峰面积;

k ——换算系数;

x ——标准品浓度;

b ——常量。

样品多巴胺浓度按公式(C.1)进行计算,多巴胺分泌量按公式(C.2)进行计算:

$$R = 4 \times 10^6 X / vn \quad \dots\dots\dots (C.2)$$

式中：

R ——多巴胺分泌量；

X ——样品多巴胺浓度；

v ——处理细胞样品所用的 KCl 溶液体积；

n ——接种的细胞总数。

