

# 团 体 标 准

T/CSSCR 002—2019

---

## 人 胚 胎 干 细 胞

Human embryonic stem cell

2019-02-26 发布

2019-08-26 实施

---

中国细胞生物学学会 发布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国细胞生物学学会干细胞分会提出。

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、中国科学院干细胞与再生医学创新研究院（筹）、北京干细胞库、中国标准化研究院、中国计量科学研究院。

本标准主要起草人：周琪、赵同标、郝捷、马爱进、陈思、曹佳妮、王磊、丁进锋、王柳、傅博强、张愚、裴雪涛、项鹏、李启沅、张勇、周家喜、胡士军、俞君英、魏军。

# 人 胚 胎 干 细 胞

## 1 范围

本标准规定了人胚胎干细胞的技术要求、检验方法、检验规则、使用说明、标签、包装、储存及运输。本标准适用于人胚胎干细胞的质量控制。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

T11/CSSCR 001 干细胞通用要求

中华人民共和国药典(三部)

全国临床检验操作规程

人胚胎干细胞研究伦理指导原则

## 3 术语、定义和缩略语

### 3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1.1

**人胚胎干细胞 human embryonic stem cell**

可在体外无限制地自我更新,并且具有向三胚层细胞分化潜能的源自人着床前胚胎中未分化的初始细胞。

#### 3.1.2

**核型 karyotype**

细胞有丝分裂中期所具备的整套染色体数目、长度、着丝点位置、随体、主缢痕和次缢痕等特征。

#### 3.1.3

**畸胎瘤 teratoma**

一种含有三胚层分化组织和细胞的良性肿瘤。

#### 3.1.4

**支原体 mycoplasma**

一类缺乏细胞壁,能够独立生存的兼性厌氧原核生物。

#### 3.1.5

**内毒素 endotoxin**

革兰氏阴性菌裂解时释放的具有人体致热性的脂多糖。

### 3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)

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)

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)

## 4 技术要求

### 4.1 原材料和辅料

4.1.1 原材料的获取应符合《人胚胎干细胞研究伦理指导原则》的要求。

4.1.2 应符合 T11/CSSCR 001 的要求。

4.1.3 供体应不携带 HIV、HBV、HCV、HTLV、TP。

### 4.2 关键质量属性

关键质量属性应符合表 1 要求。

表 1 关键质量属性

项目	要求
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
细胞鉴别	应具有人的 D3S1358、vWA、FGA、D8S1179、D21S11、D18S51、D5S818、D13S317、D16S539、TH01、TPOX、CSF1PO、D7S820、AMEL、PentaE、PentaD 16 个等位基因
染色体核型	应为 46,XX 或 46,XY
细胞存活率	冷冻前 $\geq 90\%$ ,且复苏后 $\geq 60\%$
细胞标志蛋白	OCT4 阳性率 $\geq 70.0\%$ 、NANOG 阳性率 $\geq 70.0\%$ 、TRA-1-81 阳性率 $\geq 70.0\%$ 、SSEA4 阳性率 $\geq 70.0\%$
畸胎瘤形成	应形成具有三胚层结构的畸胎瘤
微生物	真菌、细菌、支原体、人类免疫缺陷病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类嗜 T 细胞病毒、人类疱疹病毒、人巨细胞病毒、梅毒螺旋体应为阴性
内毒素	$\leq 1$ EU/mL

### 4.3 过程控制

扩增、冻存、复苏等过程控制应符合 T11/CSSCR 001 要求。

## 5 检验方法

### 5.1 细胞形态

二维培养条件下,用细胞显微镜进行观察。

### 5.2 细胞鉴别

按照附录 A 检验。

### 5.3 染色体核型

按照《中华人民共和国药典(三部)》检验。

### 5.4 细胞存活率

按照附录 B 检验。

### 5.5 细胞标志蛋白

按照附录 C 检验。

### 5.6 畸胎瘤形成

按照附录 D 检验。

### 5.7 微生物

#### 5.7.1 真菌

按照《中华人民共和国药典(三部)》检验。

#### 5.7.2 细菌

按照《中华人民共和国药典(三部)》检验。

#### 5.7.3 支原体

按照《中华人民共和国药典(三部)》检验。

#### 5.7.4 内毒素

按照《中华人民共和国药典(三部)》检验。

#### 5.7.5 人类免疫缺陷病毒

按照 WS 293 检验。

#### 5.7.6 乙型肝炎病毒

按照《全国临床检验操作规程》检验。

#### 5.7.7 丙型肝炎病毒

按照 WS 213 检验。

### 5.7.8 人类疱疹病毒

按照《全国临床检验操作规程》检验。

### 5.7.9 梅毒螺旋体

按照 WS 273 检验。

## 6 检验规则

### 6.1 抽样方法和数量

6.1.1 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。

6.1.2 在同一批的产品中随机抽取 3 个最小包装单元。

### 6.2 出厂检验

6.2.1 每批产品应进行出厂检验,并附检验报告。

6.2.2 出厂检验项目应包括 4.2 规定的所有项目。

### 6.3 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。

### 6.4 判定规则

6.4.1 出厂检验项目全部符合 4.2 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。

6.4.2 复核检验项目全部符合 4.2 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 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。

## 8 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。

## 9 包装、储存及运输

### 9.1 包装

应选择对人胚胎干细胞关键质量属性无影响的材料和容器。

### 9.2 储存

9.2.1 应符合 T11/CSSCR 001 要求。

9.2.2 应在液氮环境下储存。

### 9.3 运输

9.3.1 应符合 T11/CSSCR 001 要求。

9.3.2 应在干冰或液氮冷冻条件下运输。

**附 录 A**  
**(规范性附录)**  
**细胞鉴别(PCR-毛细管电泳法)**

**A.1 仪器和设备**

- A.1.1 PCR 扩增仪。
- A.1.2 离心机。
- A.1.3 遗传分析仪。
- A.1.4 核酸含量测定仪。
- A.1.5 基因图谱分析软件。

**A.2 试剂**

STR 分型检测试剂盒。

**A.3 检测步骤**

**A.3.1 细胞 DNA 的提取**

按照试剂盒说明书进行。

**A.3.2 荧光引物扩增 STR 位点**

按照试剂盒说明书进行。

**A.3.3 PCR 产物毛细管电泳**

按照遗传分析仪操作说明进行毛细管电泳检测和分析。

**A.4 结果分析**

得到的 STR 分型图谱与人标准 STR 图谱进行比较判定。



## 附录 B

(规范性附录)

### 细胞存活率检测(细胞计数法)

#### B.1 仪器和设备

B.1.1 显微镜。

B.1.2 血球计数板。

#### B.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。

B.2.1 磷酸盐缓冲液:pH 为 7.4。

B.2.2 台盼蓝染液。

#### B.3 检测步骤

##### B.3.1 细胞悬液制备

收集待检测细胞,用磷酸盐缓冲液配制细胞悬液,稀释至合适的浓度。每个  $1 \text{ mm}^2$  的方格中的细胞的数量应为 20~50 个细胞。如果高于 200 个细胞,则需要进行稀释。

##### B.3.2 细胞染色

按 1:1 的体积比将台盼蓝染液(B.2.2)与细胞悬液(B.3.1)混合均匀。

##### B.3.3 细胞计数

将盖玻片盖在血球计数板计数槽上,取  $10 \mu\text{L}$  混合液(B.3.2)滴在一侧计数室的盖玻片边缘,另取  $10 \mu\text{L}$  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,将计数板置显微镜下对被染色的细胞和细胞总数分别进行计数。

对  $16 \times 25$  规格的计数室,按对角线位,取左上、右上、左下、右下 4 个  $1 \text{ mm}^2$  的中格(即 100 个小格)计数。对  $25 \times 16$  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)。

#### B.4 计算与分析

细胞存活率按式(1)进行计算:

$$S = \frac{M - D}{M} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

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。

## B.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 C

(规范性附录)

### 细胞标志蛋白检测(流式细胞分析法)

#### C.1 仪器和设备

- C.1.1 流式细胞仪。
- C.1.2 水平离心机。
- C.1.3 制冰机。
- C.1.4 电子天平。

#### C.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。

- C.2.1 磷酸盐缓冲液:pH 7.4。
- C.2.2 多聚甲醛(PFA):纯度 95%。
- C.2.3 牛血清白蛋白(BSA):纯度 $\geq 98\%$ 。
- C.2.4 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)。
- C.2.5 抗体。
- C.2.6 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。

#### C.3 样品保存

洗涤液和固定后的样品于 2 °C~8 °C 保存。固定液放入分装容器中,密封并标记,于-20 °C 以下保存。相关抗体按说明书保存。

#### C.4 检测步骤

##### C.4.1 样品准备和固定

收集单细胞,250 g,离心 3 min。弃上清,加适量固定液冰上放置 10 min,然后用适量洗涤液洗涤 3 次~5 次,每次 3 min~5 min。

##### C.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。

##### C.4.3 抗体孵育

按照抗体说明书进行稀释使用。

##### C.4.4 过滤上机

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

#### C.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。

#### C.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 D**  
(规范性附录)  
**畸胎瘤形成检测**

## 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 包埋机。
- D.1.5 切片机。
- D.1.6 展片机。

## D.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。

- D.2.1 磷酸盐缓冲液:pH 为 7.4。
- D.2.2 石蜡(熔点 60 ℃)。

## 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 B 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  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  个人胚胎干细胞注射到 6 至 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等部位。

### D.3.3 畸胎瘤收样及处理

人胚胎干细胞注射约 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  $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ ),将畸胎瘤组织块用 4% 多聚甲醛进行 4 ℃ 过夜固定。

### D.3.4 石蜡切片及 HE 染色

对上述固定好的样本进行石蜡包埋、切片和 HE 染色,镜下观察并拍照。

#### D.4 结果分析

观察到来源于三个胚层的组织,如: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,即证明所接种的人胚胎干细胞具有向三个胚层组织分化的多能性。

## 参 考 文 献

- [1] 干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行).中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会、国家食品药品监督管理总局.2015
-