

团 体 标 准

T/CSCB 0024—2024

人脊髓 GABA 能神经前体细胞

Human spinal cord GABAergic neural progenitor cells



2024-10-28 发布

2024-12-31 实施

中国细胞生物学学会 发 布
中国标准出版社 出 版

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国细胞生物学学会标准工作委员会提出。

本文件由中国细胞生物学学会归口。

本文件起草单位：华中科技大学同济医学院附属同济医院、中国科学院动物研究所、北京干细胞与再生医学研究院、同济大学医学院、北京工商大学、南京医科大学药学院、复旦大学基础医学院、中山大学、中国计量科学研究院、昆明理工大学灵长类转化医学研究院、中国科学技术信息研究所、深圳华大生命科学研究院(国家基因库)、中国医学科学院医学实验动物研究所、中国食品药品检定研究院、北京泽辉辰星生物科技有限公司、复旦大学附属中山医院。

本文件主要起草人：陈红、徐佳、胡宝洋、章小清、赵同标、马爱进、郝捷、李天晴、傅博强、马丽香、刘妍、项鹏、钱坤、韩肖华、李雅洁、朱礼军、李启沅、魏强、吴婷婷、王磊、曹佳妮、李卡、赵红玲、牛帅帅。



人脊髓 GABA 能神经前体细胞

1 范围

本文件规定了人脊髓 GABA 能神经前体细胞的一般要求、技术要求、检测方法、检验规则、使用说明、标签以及运输、储存。

本文件适用于人体组织分离的或干细胞分化或转分化获得的人脊髓 GABA 能神经前体细胞的检测。

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 三部)

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

人脊髓 GABA 能神经前体细胞 **human spinal cord GABAergic neural progenitor cell**

能通过人多能干细胞体外定向诱导分化或其他方式获得的,具有生成人脊髓 GABA 中间神经元优势潜能及星形胶质细胞潜能的细胞。

3.2

人脊髓 GABA 能中间神经元 **human spinal cord GABAergic interneuron**

人类中枢神经系统中一种位于脊髓背侧、在调控神经网络兴奋和抑制的平衡中起到重要作用的抑制性中间神经元。

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)

GABA:γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid)

GAD:谷氨酸脱羧酶(Glutamic acid decarboxylase)

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)

hPSC:人多能干细胞(human Pluripotent Stem Cell)

STR:短串联重复序列(Short Tandem Repeat)

TP:梅毒螺旋体(Treponema Pallidum)

5 一般要求

5.1 原材料

5.1.1 原材料的获取及其在研究中的使用应符合国内认可的伦理和当地的法律法规。

5.1.2 根据使用目的,细胞研究和生产组织应建立相应的供者评估标准。

5.2 过程和信息管理

5.2.1 应对细胞的原材料获取、制备、检测、运输、储存等过程中影响产品质量的关键因素进行记录,并建立唯一标识,确保能够对过程进行溯源。

5.2.2 应明确记录的最短保留时间,确保记录完整性和记录存储的安全性。

6 技术要求

6.1 细胞形态

在悬浮培养的条件下,呈致密的神经球样形态,透亮度好,边缘光滑规整。

6.2 细胞标志蛋白

人脊髓标志物 Hoxb4 阳性率应 $\geq 80\%$,人脊髓 GABA 能神经前体细胞标志物 PTF1A 阳性率应 $\geq 80\%$,ASCL1 阳性率应 $\geq 80\%$ 。

6.3 细胞存活率

冻存前细胞存活率 $\geq 80\%$,复苏后细胞存活率 $\geq 50\%$ 。

6.4 细胞功能指标

6.4.1 人脊髓 GABA 能神经前体细胞在继续培养后形成人脊髓 GABA 能中间神经元,GABA 阳性率应 $\geq 70\%$,GAD65/67(谷氨酸脱羧酶 65/67,GABA 合成的关键酶)阳性率应 $\geq 70\%$ 。

6.4.2 人脊髓 GABA 能中间神经元经全细胞膜片钳电生理检测,50%以上的细胞应具有脊髓 GABA 神经元特征性的紧张放电模式。

6.5 染色体核型

正常核型应为 46,XX 或 46,XY。

6.6 微生物

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

6.7 细菌内毒素

内毒素应 <5.0 EU/mL。

6.8 STR

应符合人标准 STR 图谱,并与供者细胞保持一致,且无杂细胞污染。

7 检验方法

7.1 细胞形态

在体外培养条件下,用光学显微镜观察细胞结构。

7.2 细胞标志蛋白

参照附录 A 的方法检验。

7.3 细胞存活率

参照附录 B 的方法检验。

7.4 细胞功能指标

参照附录 B 的方法检验 GABA 和 GAD 65/67。参照附录 C 的方法检验电生理功能。

7.5 染色体核型

按照《中华人民共和国药典(2020 年版 三部)》中“生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制”检测。

7.6 微生物

7.6.1 细菌及真菌

按照《中华人民共和国药典(2020 年版 三部)》中“1101 无菌检查法”检测。

7.6.2 支原体

按照《中华人民共和国药典(2020 年版 三部)》中“3301 支原体检查法”检测。

7.6.3 HBV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

7.6.4 HCV

按照 WS 213 核酸法检验。

7.6.5 HIV

按照 WS 293 核酸法检验。

7.6.6 HTLV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

7.6.7 EBV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

7.6.8 HCMV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

7.6.9 TP

按照 WS 273 核酸法检验。

7.7 细菌内毒素

按照《中华人民共和国药典(2020 年版 三部)》中的“1143 细菌内毒素检查法”检测。

7.8 STR 鉴别

可参照 ANSI/ATCC ASN-0002—2022 进行检测。

8 检验规则

8.1 抽样方法和数量

8.1.1 在一个生产周期中,同一批次、同一来源、同一代次、同一方法制备出来的产品为一批。

8.1.2 在同一批的产品中随机抽取 3 个最小包装单元。

8.2 合格率检验

8.2.1 每批产品应进行检验,并附检验报告。

8.2.2 检验项目应包括第 6 章规定的所有项目。

8.3 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。

8.4 判定规则

8.4.1 出厂检验项目全部符合第 6 章规定,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。

8.4.2 复核检验项目全部符合第 6 章规定,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。

9 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，提供内毒素结果。

10 标签

应至少包括以下内容：

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

11 运输和储存

11.1 运输

11.1.1 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。

11.1.2 细胞的运输宜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。

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

11.1.4 应根据用户要求提供相应的随行检验文件和技术指导文件。

11.1.5 应在必要时检查运输中的包裹，并在可能的情况下添加新的冷冻源（如干冰或液氮）以保持适宜的运输温度。

11.2 储存

11.2.1 应采取优化后的冻存程序和方法以最大限度地减少冻融过程中对细胞的损伤，以确保其正常功能不过多受冻融影响。

11.2.2 应记录细胞的冻存信息，包括但不限于：

- a) 名称；
- b) 批号；
- c) 数量；
- d) 传代次数；
- e) 冷冻日期；
- f) 冻存液成分；

g) 操作者姓名。

11.2.3 应对细胞储存条件进行记录,包括但不限于:

- a) 储存条件;
- b) 储存日期;
- c) 储存期限;
- d) 储存人员。



附录 A

(资料性)

细胞标志蛋白检测 免疫荧光染色计数法

A.1 仪器和设备

A.1.1 荧光显微镜或共聚焦显微镜。激发光波 488 nm、594 nm。

A.1.2 水平离心机。

A.1.3 电子天平。

A.2 试剂

A.2.1 试验用水均为 GB/T 6682 规定的一级水。

A.2.2 磷酸盐缓冲液:pH 7.4。

A.2.3 多聚甲醛(PFA):纯度 95%。

A.2.4 牛血清白蛋白(BSA):纯度 $\geq 98\%$ 。

A.2.5 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)。

A.2.6 抗人 PTF1A 和 ASCL1 抗体等、对应的荧光二抗以及染细胞核的抗体。

A.2.7 洗涤液、固定液、封闭通透液、抗体稀释液:使用电子天平(A.1.3)按照相应要求配制。

A.2.8 抗荧光淬灭封片剂。

A.3 样品保存

将人脊髓 GABA 能神经前体细胞以及继续培养成熟为人脊髓 GABA 能中间神经元分别洗涤和固定,于 2℃~8℃保存。固定液放入分装容器中,密封并标记,应根据相关试剂使用说明保存。相关抗体按说明书保存。

A.4 检测步骤

A.4.1 样品准备和固定

收集神经球,经过消化 7 min~10 min,得到平均每个神经球约含 50 个细胞的神经球悬液,将神经球悬液接种在基质胶处理的细胞玻片(可选用 24 孔板适用的圆形细胞玻片,直径 14 mm)上贴壁培养 1 周~3 周。弃上清,加适量固定液冰上放置 20 min,然后用适量洗涤液洗涤 3 次~5 次,每次 3 min~5 min。

A.4.2 封闭和通透

用封闭通透液冰上孵育 30 min,然后用洗涤液清洗一遍。

A.4.3 抗体孵育

按照抗体说明书进行稀释使用。

A.4.4 洗涤

弃去封闭通透液,用洗涤液清洗圆形细胞玻片 3 次,每次洗涤 5 min~10 min。

A.4.5 染核

弃去洗涤液,按照染细胞核的抗体说明书进行稀释使用再按 A.4.4 洗涤。

A.4.6 封片

每张载玻片上滴加 10 μ L 抗荧光淬灭封片剂,夹取圆形细胞玻片边缘轻扣于载玻片上,避免产生气泡。

A.4.7 显微镜拍照成像

使用荧光显微镜或共聚焦显微镜进行样品的成像,根据阴性样本的信号强度调整荧光通道曝光时间,进行荧光成像。

A.4.8 计数

对不同批次、不同视野的照片中染细胞核的抗体阳性细胞进行计数,统计其中相应细胞标志蛋白抗体阳性的细胞数,计算细胞标志蛋白阳性比例。阳性比例按公式(A.1)进行计算。

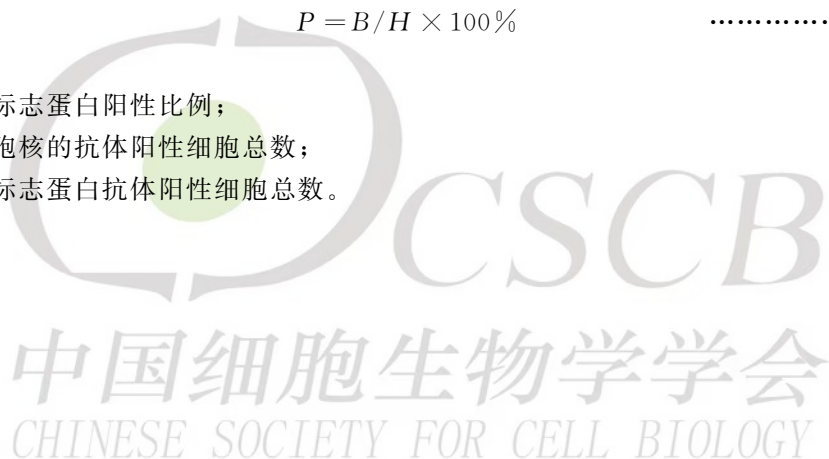
$$P = B/H \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

P ——细胞标志蛋白阳性比例;

H ——染细胞核的抗体阳性细胞总数;

B ——细胞标志蛋白抗体阳性细胞总数。



附 录 B

(资料性)

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(放大倍数 4×、10×、20×、40×)。

B.1.2 血球计数板。

B.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。

B.2.1 磷酸盐缓冲液:pH 7.4。

B.2.2 0.4% 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,将细胞球消化成单细胞或较小的细胞球或复苏神经球(包含 1 个~20 个细胞),用磷酸盐缓冲液(B.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)混合均匀静置 30 s。

B.3.3 细胞计数

将盖玻片盖在血球计数板(B.1.2)计数槽上,取 10 μL 混合液(B.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(B.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边线和左边线上的细胞(或只计数下边线和右边线上的细胞)。

B.4 计算与分析

细胞存活率按公式(B.1)进行计算:

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

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。计算两次计数细胞存活率结果的平均值,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应超过算术平均值的 10%。



附 录 C

(资料性)

细胞功能检测 全细胞膜片钳

C.1 仪器和设备

全细胞膜片钳仪器和记录系统。

C.2 试剂

C.2.1 人工脑脊液: 127 mmol/L NaCl, 1.9 mmol/L KCl, 1.4 mmol/L MgSO_4 , 1.2 mmol/L KH_2PO_4 , 26 mmol/L NaHCO_3 , 2.2 mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mmol/L glucose, pH 7.2, 282 mOsm。

C.2.2 电极填充液: 121 mmol/L K-gluconate, 20 mmol/L KCl, 10 mmol/L HEPES, 4 mmol/L Mg-ATP, 10 mmol/L BAPTA, pH 7.4, 293 mOsm。

C.3 检测步骤

C.3.1 样品准备

将人脊髓 GABA 能神经前体细胞接种到放置了爬片的培养板中,使用富含神经营养因子的培养基继续培养 3 周后形成成熟的人脊髓 GABA 能中间神经元。

C.3.2 样品处理

将具有培养细胞的爬片转移到填充有人工脑脊液的记录室中,进行全细胞膜片钳记录。

C.3.3 检测方法

电极填充液填充玻璃毛细管移液器,接近细胞表面,仪器提供负压形成密封。电压钳,保持电位为 -70 mV 。电流钳,保持电流为 0 pA 。电极的电阻为 $10\text{ M}\Omega \sim 20\text{ M}\Omega$ 。以电压钳模式记录细胞自发性动作电位。

C.3.4 结果分析

使用全细胞膜片钳仪器和 Clampfit 分析软件,记录分析细胞自发性动作电位的波形,若细胞呈现恒定频率的紧张性放电模式即为人脊髓 GABA 能中间神经元,若细胞呈现非紧张性放电模式即为其他神经细胞。

参 考 文 献

- [1] GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
 - [2] ANSI/ATCC ASN-0002—2022 Authentication of Human Cell Lines: Standardization of Short Tandem Repeat (STR) Profiling
-

