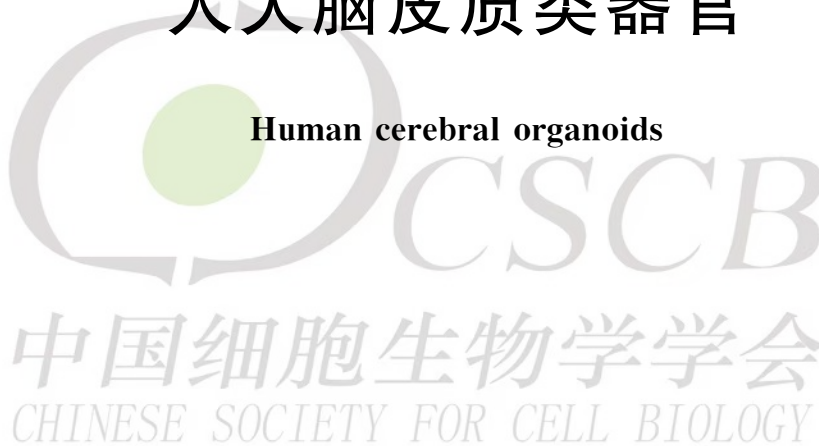


团 体 标 准

T/CSCB 0030—2024

人大脑皮质类器官

Human cerebral organoids



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

目 次

前言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 缩略语 2

5 一般要求 2

6 技术要求 2

7 检验方法 3

8 使用说明 4

9 标签 4

10 运输..... 5

附录 A（资料性） 细胞类型标志基因检测 实时荧光定量 PCR 法 6

附录 B（资料性） 细胞组成比例检测 免疫荧光染色法 7

附录 C（资料性） 类器官电生理活性检测 膜片钳实验（仲裁法） 8

附录 D（资料性） 类器官电生理活性检测 微电极阵列实验 9

附录 E（资料性） 类器官 STR 鉴定 10

参考文献 12

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

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：中国科学院动物研究所、北京干细胞与再生医学研究院、瓯江实验室、中国计量科学研究院、北京工商大学、上海科技大学、同济大学、南京医科大学、中国医学科学院医学实验动物研究所、中国医学科学院北京协和医院、深圳华大生命科学研究院（国家基因库）、南昌大学、中国科学院苏州纳米所、复旦大学脑科学转化研究院、昆明理工大学、中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心、北京大学、中国科学院北京基因组研究所（国家生物信息中心）、深圳官芯生物科技有限公司、郑州大学第一附属医院、首都医科大学宣武医院、苏州大学、齐鲁制药有限公司、山东伯桢生物科技有限公司、北京泽辉辰星生物科技有限公司、北京拓界生物医药科技有限公司、中国科学技术信息研究所、中国食品药品检定研究院、中国标准化研究院、金凤实验室。

本文件主要起草人：刘长梅、赵同标、周琪、徐雅洁、唐铁山、王昱凯、傅博强、马爱进、胡宝洋、罗振革、章小清、刘妍、滕兆乾、郝捷、魏强、吴志宏、张勇、赵冰、边杉、张京钟、彭勃、李天晴、陈跃军、刘京、段春慧、王磊、赵扬、张维绮、彭耀进、张博雅、包新杰、王燕琳、唐毅、胡士军、李骞、朱高翔、张愚、付锐、朱礼军、李启沅、纳涛、赵琳、平铁芳、赵红玲、牛帅帅。

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

人大脑皮质类器官

1 范围

本文件规定了人大脑皮质类器官的一般要求、技术要求、检测方法、检验规则、使用说明、标签、运输。

本文件适用于人多能干细胞或神经干细胞来源的大脑皮质类器官的体外制备和检测。

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。

中华人民共和国药典（2020 年版 三部）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

类器官 organoids

由于细胞或前体细胞体外培养形成的，包含组织器官特异性的多种细胞，能自我更新，具有特定器官关键结构和功能特性的三维（3D）细胞培养物。

[来源：T/CSCB 0013—2022, 3.1, 有修改]

3.2

人大脑皮质类器官 human cerebral organoids

人多能干细胞或神经干细胞来源，在体外培养和自组装，并分化产生多种大脑皮质细胞类型（皮层神经元、中间祖细胞、放射性胶质细胞）的类器官。

3.3

神经分化 neural differentiation

多能干细胞逐渐生成形态结构、基因表达、功能特征各不相同的，包括放射性胶质细胞、中间祖细胞、中间神经元、皮层神经元等细胞类群的过程。

3.4

放射性胶质细胞 radial glia cell

在人类皮质中普遍存在的、起源于神经管周围的神经上皮细胞，在发育过程中通过不对称分裂与对称分裂产生神经元或神经胶质细胞的一类神经干细胞。

3.5

中间祖细胞 progenitor cell

来源于放射状胶质细胞，能产生中枢神经系统中的大多数成熟神经元的一类细胞。

注：中间祖细胞的特点是表达脱中胚蛋白（EOMES），这是一种调节神经干细胞增殖和分化的多功能转录因子。

3.6

皮层神经元 cortical neuron

一种具有短轴突的、位于大脑皮质中的神经元胞体,包含兴奋性神经元、可能包含自身产生或腹侧迁移来的抑制性中间神经元。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

3D:三维(Three Dimension)

Ct:循环数的荧光阈值(Cycle-threshold)

DAPI:4,6-二氨基-2-苯基吲哚(4,6-diamino-2-phenylindole)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Saline)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)

RNA:核糖核酸(Ribonucleic Acid)

STR:短串联重复序列(Short Tandem Repeat)

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,人脑皮质类器官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 应对人脑皮质类器官的原材料获取、制备、检测、运输和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 形态

人脑皮质类器官为类球状,在光学显微镜下应边缘清晰,可见内部多个层状“玫瑰花环样”结构。

6.2 染色体核型

应与供体核型一致。

6.3 标志基因

人脑皮质类器官应检测到神经干/祖细胞标志基因:FOXG1/PAX6、FOXG1/SOX2;人脑皮质类器官应检测到大脑皮质中 II-VI 层皮层神经元标志基因:REELIN、TBR1、CTIP2、CUX1、SATB2、BRN2、GLUT2、TUJ1。

6.4 细胞组成

6.4.1 人脑皮质类器官中应同时包含 SOX2 及 PAX6 双阳性的放射状胶质细胞、EOMES 阳性的中

间前体细胞、REELIN 阳性的皮层神经元细胞。人大脑皮质类器官中应包含大脑皮质中 II-VI 层皮层神经元细胞：CUX1 阳性的皮层 III-II 神经元细胞、TBR1 及 CTIP2 阳性的皮层 VI-IV 神经元细胞、SATB2 阳性的皮层 IV-II 神经元细胞、BRN2 阳性的皮层 II-III 及 V 神经元细胞、TUJ1 阳性的神经元细胞，各层神经元细胞有序且分层排列。

6.4.2 人大脑皮质类器官分化大于 72 d 时，TBR1 阳性的皮层神经元细胞应不低于 20%；CTIP2 阳性的皮层神经元细胞应不低于 20%；BRN2 阳性的皮层神经元细胞应不低于 3%；SATB2 阳性的皮层神经元细胞应不低于 3%。

6.5 功能指标

大脑皮质类器官应具备成熟神经元的电生理活性。

6.6 细胞活率

人大脑皮质类器官分化 60 d 时，类器官中的细胞存活率应不低于 70%。

6.7 微生物

应对真菌、细菌、支原体、病毒进行检测并记录。

6.8 STR

应与供体 STR 一致。

7 检验方法

7.1 形态

体外三维培养类器官，使用光学显微镜观察。

7.2 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。

7.3 标志基因

参照附录 A 的方法检测。

7.4 细胞组成

参照附录 B 的方法检测。

7.5 功能指标

参照附录 C 或者附录 D 的方法检测。

7.6 细胞活率

参照附录 B 的方法检测。

7.7 微生物

7.7.1 真菌及细菌

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。

7.7.2 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。

7.7.3 外源病毒因子

按照《中华人民共和国药典(2020 年版 三部)》中“3302 外源病毒因子检查法”检测。

7.8 STR

参照附录 E 的方法检测。

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，提供内毒素结果。

9 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。

10 运输

10.1 根据人脑皮质类器官的使用要求,选择合适的运输方式和运输条件,保证人脑皮质类器官生物学特性、安全性、稳定性和有效性。

10.2 人脑皮质类器官的运输宜考虑但不限于人脑皮质类器官特性、承载人脑皮质类器官的容器、运输路线、运输时间、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 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。

10.4 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。

10.5 应在必要时检查运输中的包裹,保持适宜的运输温度。



附录 A

(资料性)

细胞类型标志基因检测 实时荧光定量 PCR 法

A.1 仪器和设备

A.1.1 聚合酶链式反应 PCR 仪。

A.1.2 实时荧光定量 PCR 仪。

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 商品化 RNA 提取试剂盒。

A.2.3 商品化 RNA 反转试剂盒。

A.2.4 商品化荧光定量 PCR 扩增试剂盒。

A.2.5 GAPDH 及目标基因 qPCR 引物。

A.3 检测步骤

A.3.1 类器官样品制备

体外培养类器官,吸去培养基。加入与培养基等体积的磷酸盐缓冲液(A.2.1),吸去缓冲液。重复一次。

A.3.2 类器官 RNA 提取

按照商品化 RNA 提取试剂盒(A.2.2)进行类器官 RNA 提取,操作按照试剂盒说明书进行。

A.3.3 类器官 cDNA 制备

取 1 μg 类器官 RNA,利用聚合酶链式反应 PCR 仪(A.1.1),按照商品化 RNA 反转试剂盒(A.2.3)进行类器官 RNA 反转。操作按照试剂盒及仪器说明书进行。

A.3.4 基因表达情况确定

取 A.3.3 类器官 RNA 反转产物,利用实时荧光定量 PCR 仪(A.1.2),结合商品化荧光定量 PCR 扩增试剂盒(A.2.4)和 GAPDH 及目标基因 qPCR 引物(A.2.5),按照试剂盒说明书进行实时荧光定量检测。参照检测曲线确定 Ct 值,得到 GAPDH 的表达值 CtG 及目标基因表达值 CtM。

A.3.5 目标基因表达情况分析

以 GAPDH 表达作为参照,得到目标基因的表达水平为: $X = \text{CtM}/\text{CtG}$

A.4 计算与分析

按照步骤 A.3.1~A.3.5 再重复两次。计算三次类器官目标基因的表达水平,记为类器官目标基因的平均表达水平。

A.5 精密度

在重复性条件下获得的三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 B

(资料性)

细胞组成比例检测 免疫荧光染色法

B.1 仪器和设备

激光共聚焦显微镜。

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 商品化免疫荧光染色试剂盒。

B.2.3 目标蛋白质抗体。

B.3 检测步骤

B.3.1 类器官样品制备

体外培养类器官,吸去培养基。加入与培养基等体积的磷酸盐缓冲液(B.2.1),吸去缓冲液。重复一次。

B.3.2 类器官免疫荧光染色

通过商品化免疫荧光染色试剂盒(B.2.2)及目标蛋白质抗体(B.2.3),进行类器官免疫荧光染色,操作按照试剂盒说明书进行。

B.3.3 免疫荧光染色阳性细胞观察

按照激光共聚焦显微镜进行观察及拍照。

B.3.4 目标基因表达情况分析

统计 DAPI 数量为类器官中细胞总数 M ,统计目标蛋白质阳性信号的细胞数量 N ,得到目标蛋白质阳性的细胞比例为 $X = N/M$ 。

B.4 计算与分析

统计至少 30 个类器官中目标蛋白质阳性的细胞比例,平均后记为类器官中目标细胞类型的比例。

附 录 C

(资料性)

类器官电生理活性检测 膜片钳实验(仲裁法)

C.1 仪器和设备

C.1.1 振动切片机。

C.1.2 单细胞分析膜片钳。

C.2 试剂

C.2.1 低熔点琼脂糖。

C.2.2 脑脊液。

C.3 样品保存

在类器官分化期间的第 120 d~200 d,将类器官嵌入 4%低熔点琼脂糖中。

C.4 检测步骤

C.4.1 样品切片制备

将含有以下物质(以 mmol/L 计,pH 调节至 7.4)的 4℃溶液混合氧充气 15 min:92 NMDG、1.3 NaH₂PO₄、5 KCl、0.5 CaCl₂、26 NaHCO₃、10 MgCl₂、5 抗坏血酸钠、2 硫脲和 25 D-葡萄糖。将嵌入 4%低熔点琼脂糖中的类器官置于 4℃溶液中,4℃溶液填充振动切片机缓冲室,设置类器官所需厚度 200 μm 并将切割速度调整至所需设置(0.1 mm/min)。切好的类器官在室温下至少保存 1 h,让类器官从切片的机械冲击中恢复。

C.4.2 mEPSC 记录

在记录过程中,将类脑体切片浸泡在含有以下物质(以 mmol/L 计)的外部溶液中:124 NaCl、1.5 MgCl₂、3.3 KCl、26 NaHCO₃、1.3 NaH₂PO₄、11 葡萄糖和 2.5 CaCl₂,pH 7.4。用 95%O₂ 和 5%CO₂ 连续平衡外部溶液。

记录微电极(电阻为 5 MΩ~6 MΩ)充满含有以下物质(单位:mmol/L,pH 7.4)的细胞内溶液:115 甲磺酸铯、15 CsCl、2 MgCl₂、10 HEPES、10 EGTA、4 ATP Mg 和 1 QX-314。

在 mEPSC 记录期间,细胞被电压钳制在 -60 mV。使用多钳位 700B 放大器和 Axon Digidata 1440A 数字转换器记录类器官。将瓜氨酸(10 μmol/L)、河豚毒素(1 μmol/L)和 APV(2-氨基-5-磷酸盐,50 μmol/L)添加到细胞外溶液中,以分离 AMPA 受体介导的 mEPSC。所有试验均在室温(23℃)下进行。电池电容和串联电阻得到补偿。使用生理学数据采集和分析程序进行数据采集和分析。

C.5 结果分析

所有记录的神经元在去极化后产生超过 -30 mV 的瞬时内向电流,该电流被河豚毒素阻断。这种向内电压门控的 Na⁺ 电流之后是更持续的 K⁺ 电流的激活。重要的是,去极化电流注入显示这种向内电压门控的 Na⁺ 电流之后是更持续的 K⁺ 电流的激活。重要的是,去极化电流注射显示,所有记录的神经元都可靠地产生动作电位。

附录 D

(资料性)

类器官电生理活性检测 微电极阵列实验

D.1 仪器和设备

D.1.1 MEA 多孔培养板。

D.1.2 Maestro MEA 设备。

D.2 试剂

Matrigel 基质胶。

D.3 样品保存

在类器官分化期间的第 120 d~200 d,将类器官接种到 MEA 多孔培养板。

D.4 检测步骤

D.4.1 样品切片制备

使用 Matrigel 基质胶于培养箱过夜包被 MEA 多孔培养板,移除 Matrigel 基质胶,将皮质类器官放置在电极中心,培养 5 min~20 min,确保皮质类器官黏附于表面。将类器官表面铺少量培养基 (10 μL ~20 μL), 孵育 2 h 后,加入至少 200 μL 培养基。

D.4.2 数据记录

皮质类器官贴片后 24 h,7 d~14 d 为最佳记录时间。将 MEA 多孔培养板放入 Maestro MEA 设备,测量场电位(FP),环境控制条件设为 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2 ,在放板(平衡/稳定)10 min 后记录 3 min~5 min 的基线数据。

D.5 结果分析

原始数据由 AxIS Navigator 采集后,导入 Cardiac Analysis Tool 和 AxIS Metric Plotting Tool 进行参数统计。数据指标同膜片钳实验一致。

附 录 E
(资料性)
类器官 STR 鉴定

E.1 仪器和设备

- E.1.1 离心机。
- E.1.2 PCR 仪。
- E.1.3 毛细管电泳仪。
- E.1.4 微量紫外分光光度计。

E.2 试剂

- E.2.1 细胞 DNA 抽提试剂盒。
- E.2.2 STR 细胞鉴定试剂盒。

E.3 样品保存

样品制备好后,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

E.4 检测步骤

E.4.1 样品制备

离心收集类器官,弃上清。

E.4.2 DNA 提取

DNA 提取如下:

- a) 按细胞 DNA 抽提试剂盒说明书对类器官基因组 DNA 进行提取;
- b) 微量紫外分光光度计检测提取后的 DNA 的吸光度 A_{260}/A_{280} 的比值在 1.8~2.0 之间;
- c) DNA 样本要求:DNA 体积 $\geq 20\text{ }\mu\text{L}$,浓度 $\geq 50\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

E.4.3 PCR 扩增

PCR 扩增如下:

- a) 按照标准 PCR 扩增方法对 STR 位点进行扩增,也可按照经过质检合格的商业化试剂盒说明书进行;
- b) 设置阴性对照组、样本检测组和阳性对照组,阴性对照组采用无菌水为模板进行 PCR 扩增,样本检测组以类器官和类器官所来源的细胞提取的 DNA 为模板进行 PCR 扩增,阳性对照组采用 DNA 模板进行扩增;
- c) 采用琼脂糖凝胶电泳确认 PCR 扩增产物、阴性对照组和阳性对照组。阴性对照组无目的条带,阳性对照组有清晰的目的条带。

E.4.4 STR 基因分型检测

使用毛细管电泳基因分析仪对 PCR 扩增产物进行检测,并得到 STR 遗传图谱数据。阳性对照组有清晰的目的条带。类器官和类器官所来源的细胞的扩增条带应一致。

E.5 结果分析

E.5.1 当 STR 位点的等位基因含有相同重复次数时,图谱仅出现 1 个等位基因峰;当含有不同重复次数时,图谱会出现 2 个等位基因峰。当阴性对照组无等位基因峰出现,阳性对照组检测结果与其标准基因分型数据一致时视为有效检测。

E.5.2 在检测有效的前提下,若受检样本 STR 位点出现 2 个以上的等位基因峰,经过重复试验排除引物结合区突变等干扰因素后,判定受检样本存在交叉污染。



参 考 文 献

- [1] GB/T 37864—2019 生物样本库质量和能力通用要求
- [2] GB/T 42466—2023 生物样本库多能干细胞管理技术规范
- [3] T/CSCB 0001—2020 干细胞通用要求
- [4] T/CSCB 0013—2022 人肠道类器官
- [5] 涉及人的生物医学研究理论审查办法(中华人民共和国卫生和计划生育委员会令 第11号)
- [6] 涉及人的生命科学和医学研究伦理审查办法(国卫科教发〔2023〕4号)
- [7] 国际医学科学组织理事会,世界卫生组织.涉及人的生物医学研究的国际伦理准则,2002.
- [8] Gordon, A., et al. Long-term maturation of human cortical organoids matches key early postnatal transitions[J]. *Nat Neurosci*, 2021. 24(3): 331-342.
- [9] Lancaster, M.A. and J.A. Knoblich. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells[J]. *Nat Protoc*, 2014. 9(10): 2329-40.
- [10] Pasca, A.M., et al. Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture[J]. *Nat Methods*, 2015. 12(7): 671-8.

