

团 体 标 准

T/CSCB 0031—2024

人 小 胶 质 细 胞



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 检验规则 4

9 使用说明 5

10 标签 5

11 储存及运输 5

附录 A（资料性） 细胞存活率检测 细胞计数法 7

附录 B（资料性） 细胞标志蛋白检测 免疫荧光染色计数法 8

附录 C（资料性） 吞噬功能检测 流式细胞测定法 10

附录 D（资料性） 活化 荧光定量 PCR 法 12

参考文献 13

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、复旦大学脑科学转化研究院、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、深圳官芯生物科技有限公司、中国科学院苏州纳米所、中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心、昆明理工大学、北京泽辉辰星生物科技有限公司、北京协和医院、郑州大学第一附属医院、首都医科大学宣武医院、齐鲁制药有限公司、苏州大学、山东伯桢生物科技有限公司、北京拓界生物医药科技有限公司、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)、中国医学科学院医学实验动物研究所、深圳华大生命科学研究院(国家基因库)、深圳华汉基因生命科技有限公司、中国科学技术信息研究所、中国食品药品检定研究院、广东省中医院(广州中医药大学第二附属医院)、陆军军医大学。

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

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

人小胶质细胞

1 范围

本文件规定了人小胶质细胞的一般要求、技术要求、检测方法、检验规则、使用说明、标签以及运输、储存。

本文件适用于原代和干细胞分化来源的人小胶质细胞的检测。

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

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

人小胶质细胞 human microglia cells

人中枢神经系统中的常驻免疫细胞,具有监视和吞噬作用,通过释放可溶性因子等方式起免疫调节功能。

3.2

监视作用 surveillance

小胶质细胞通过延伸和缩回从胞体发出的细长而有分支的突起,监视突触功能、病原体侵入、死细胞与蛋白聚集体。

3.3

吞噬作用 phagocytosis

在大脑发育、内环境稳态维持、中枢神经系统疾病发生时,小胶质细胞能吞噬并清除外源性病原体、细胞碎片、突触、蛋白聚集体。

3.4

释放可溶性因子 releasing soluble factors

小胶质细胞分泌许多可溶性因子,如趋化因子、细胞因子和神经营养因子,参与免疫反应、神经损伤或修复。

3.5

批次 batch

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。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CD45:分化簇 45(Cluster of Differentiation 45)

CD68:分化簇 68(Cluster of Differentiation 68)

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)

IBA1:电离钙结合衔接分子 1(Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule 1)

LPS:脂多糖(Lipopolysaccharide)

P2RY12:嘌呤能受体 P2Y12(Purinergic Receptor P2Y12)

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)

TMEM119:跨膜蛋白 119(Transmembrane Protein 119)

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

二维培养体系下,为贴壁和/或半贴壁状态。单个细胞呈分枝状(贴壁)或圆形(半贴壁)。静息状态时,胞体较小、突起较长;激活状态时,胞体变大、分枝增多、突起缩短。

6.2 染色体核型

正常核型应为 46,XX 或 46,XY。

6.3 细胞存活率

未冻存细胞的存活率 $\geq 80\%$,冻存复苏后的细胞存活率 $\geq 60\%$ 。

6.4 细胞标志蛋白

TMEM119 和 IBA1 双阳性细胞占比 $\geq 90.0\%$ 、P2RY12 和 IBA1 双阳性细胞占比 $\geq 90\%$ 。

6.5 细胞功能指标

吞噬作用:小胶质细胞对异常蛋白聚集体及细胞碎片应有吞噬作用。

活化:小胶质细胞在 LPS 及细胞因子刺激或组织损伤后被活化,CD68 和 CD45 表达水平上调,而 TMEM119 和 P2RY12 表达水平下调。

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 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

二维培养条件下,用明场相差显微镜进行观察。

7.2 染色体核型

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

7.3 细胞存活率

参照附录 A 规定的方法进行细胞存活率检验。

7.4 细胞标志蛋白

参照附录 B 规定的方法进行细胞标志蛋白检验。

7.5 微生物

7.5.1 真菌及细菌

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

7.5.2 支原体

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

7.5.3 HIV

按照 WS 293 核酸法检验。

7.5.4 HBV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

7.5.5 HCV

按照 WS 213 核酸法检验。

7.5.6 HTLV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

7.5.7 EBV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

7.5.8 HCMV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

7.5.9 TP

按照 WS 273 核酸法检验。

7.6 吞噬作用

参照附录 C 规定的方法进行吞噬作用检验。

7.7 活化检测

参照附录 D 规定的方法进行活化检验。

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

在同一批次的产品中随机抽取 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 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 储存及运输

11.1 储存

11.1.1 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。

11.1.2 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。

11.1.3 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。

11.2 运输

11.2.1 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。

11.2.2 细胞的运输宜考虑但不限于细胞/类器官特性、承载细胞/类器官的容器、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。

11.2.3 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。

11.2.4 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。

11.2.5 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(如干冰和液氮)以保持适宜的运输温度。



附 录 A
(资料性)

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。

- A.2.1 磷酸盐缓冲液:pH 为 7.4。
- A.2.2 0.4%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。

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

- 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应超过算术平均值的 10%。

附录 B

(资料性)

细胞标志蛋白检测 免疫荧光染色计数法

B.1 仪器和设备

荧光显微镜(依据使用的荧光抗体选择合适的设备)。

B.2 试剂

B.2.1 杜氏磷酸盐缓冲液(DPBS):细胞培养级别。

B.2.2 4%多聚甲醛(PFA)。

B.2.3 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)。

B.2.4 牛血清白蛋白(BSA)。

B.2.5 Hoechst33342 或 DAPI。

B.2.6 防淬灭剂。

B.2.7 指甲油或封片剂。

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

固定后的小胶质细胞样品,DPBS、4%多聚甲醛、Hoechst33342 于 2℃~8℃保存,牛血清蛋白、防淬灭剂于-20℃保存。TritonX-100、无色指甲油或封片剂室温保存。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,利用 PDL 及 matrigel 包被 1 h 后接种细胞。细胞按密度 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种 24 h 贴壁伸展后,弃掉培养液,用 4% PFA 室温下固定细胞 15 min~30 min。DPBS 洗 3 次。

B.4.2 通透封闭

用含 0.3% TritonX-100 和 2%BSA 的 DPBS 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 DPBS 洗 3 次,每次洗涤 5 min~10 min。

B.4.5 染核

弃去 DPBS,用 DPBS 稀释 Hoechst33342 染液/DAPI 处理细胞。

B.4.6 封片

每张玻璃片加 5 μL 防淬灭剂,用盖玻片盖于组织上,避免产生气泡,用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 激光共聚焦显微镜拍照

10 倍或 20 倍镜下随机取至少 3 个不同视野拍照,如果细胞分多层,需进行层扫后叠加(每层间隔 1.5 μm~2.5 μm)。

B.4.8 计数

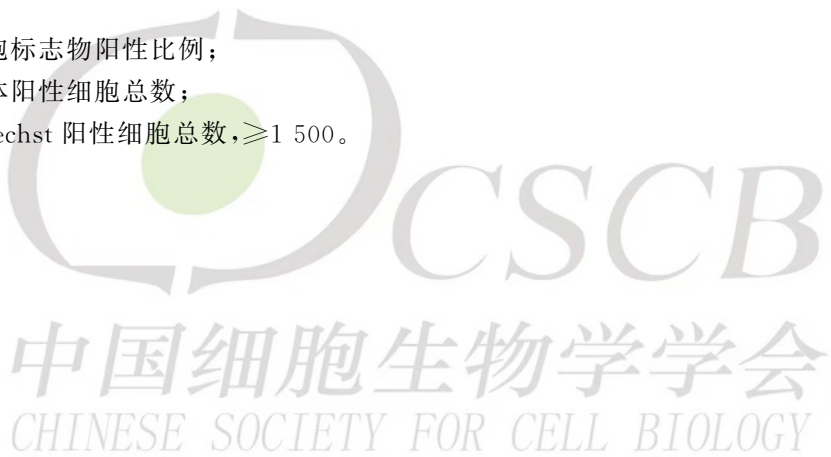
对 3 个不同视野的照片中 Hoechst 阳性细胞进行计数,每个视野至少计 500 个细胞,总数不少于 1 500 个细胞,并统计其中相应抗体阳性的细胞数。计算标志物抗体阳性比例。

细胞标志物阳性比例按公式(B.1)进行计算。

$$P = \frac{B}{H} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (B.1)$$

式中:

- P ——细胞标志物阳性比例;
- B ——抗体阳性细胞总数;
- H ——Hoechst 阳性细胞总数,≥1 500。



附录 C

(资料性)

吞噬功能检测 流式细胞测定法

C.1 仪器和设备

C.1.1 细胞流式分析仪(依据使用的荧光抗体选择合适的设备)。

C.1.2 水平离心机。

C.1.3 制冰机。

C.1.4 带盖离心管:1.5 mL、50 mL 和 15 mL。

C.1.5 40 μ m 滤网。

C.1.6 流式管。

C.1.7 垂直混匀仪。

C.2 试剂

C.2.1 DPBS。

C.2.2 pHrodo 荧光染料。

C.2.3 Fibrillar A β (带荧光标记):荧光标记单体 A β 利用 1% NH₄OH 溶解至 1 mg/mL, 用无菌超纯水稀释至 100 ng/mL 后于 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 7 d。

C.2.4 突触体(synaptosome):神经元样本(原代大脑组织来源或体外分化培养)在含 10% DMSO 的 0.32 mol/L 蔗糖中缓慢冷冻至 -80 $^{\circ}$ C。37 $^{\circ}$ C 水浴复温后,在含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 10 mm Tris buffer (pH 7.4)中匀浆。匀浆后 4 $^{\circ}$ C 1 000g 离心 10 min,取上清 4 $^{\circ}$ C 10 000g 离心 20 min。收集沉淀,重悬于 10 mmol/L sucrose/Tris solution, -80 $^{\circ}$ C 保存。

C.2.5 直标抗体(CD45、CD11b)。

C.2.6 TrypLE。

C.2.7 FACS buffer。

C.2.8 小胶质细胞培养基。

C.3 试样制备

pHrodo 荧光染料标记突触体的制备:在 4 $^{\circ}$ C 10 000g 离心 5 min,弃上清后,将 100 μ L 0.1 mol/L Na₂CO₃ 和 1 μ L pHrodo Red(或 Green)染料加入到突触体微球沉淀中(0.3 mg),轻柔混匀 2 次后,在室温避光条件下,40 r/min 在垂直混匀仪上轻柔混匀 1 h。加入 1 mL 4 $^{\circ}$ C 预冷的 DPBS,在 4 $^{\circ}$ C 下 10 000g 离心 1 min~2 min 后弃上清。1 mL 4 $^{\circ}$ C 预冷的 DPBS 轻柔重悬沉淀,在 4 $^{\circ}$ C 下 10 000g 离心 1 min~2 min 后弃上清。重复上述步骤 6 次,以充分去除未结合的 pHrodo 荧光染料。洗涤结束后,完全去除上清,然后将 10 mmol/L sucrose/Tris solution 轻轻加入到 EP 管中,轻轻吹匀重悬, -80 $^{\circ}$ C 保存。

小胶质细胞加入 Fibrillar A β (5 mg/mL)或 pHrodo 荧光染料标记突触体(5 mg/mL)37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h, 利用 TrypLE 消化后用小胶质细胞培养基收集。

C.4 检测步骤

C.4.1 样品准备

取人小胶质细胞置于 15 mL 离心管中,加入 DPBS 洗涤两次,300g,离心 10 min。

C.4.2 抗体孵育

用 95 μL DPBS 重悬细胞,并转移至 1.5 mL 离心管中,分别加入 5 μL CD45 及 CD11b 荧光抗体,或 5 μL 同型对照荧光抗体,置于冰上避光孵育 30 min,每隔 5 min~10 min 轻弹混匀。最后用 DPBS 洗涤两次,4 $^{\circ}\text{C}$ 300g 离心 10 min。

C.4.3 染色后样品检测

用 200 μL ~300 μL FACS buffer 重悬细胞,然后通过 40 μL 滤网转移到流式管中,按细胞流式分析仪应用手册上机检测。

在 FSC/SSC 散点图中,调试 FSC、SSC 的 PMT 值,使所有细胞群均可见,调试各荧光通道的 PMT 值在目标值的范围内。随后进行各荧光通道间的补偿调节,完成后再行灵敏度调节。

C.4.4 圈门设定原则

首先根据颗粒度和透光性画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 CD45/CD11b 双阳性细胞。内吞 Fibrillar A β 或突触体的 CD45/CD11b 双阳性细胞占比大于 80%。

C.4.5 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
(资料性)
活化 荧光定量 PCR 法

D.1 仪器和设备

荧光定量 PCR 仪。

D.2 试剂

D.2.1 杜氏磷酸盐缓冲液(DPBS);细胞培养级别。

D.2.2 脂多糖(LPS);细胞培养级别。

D.2.3 γ 干扰素(IFN- γ);纯度大于 90%。

D.2.4 白介素 4(IL-4);纯度大于 90%。

D.2.5 商品化 qPCR 扩增试剂盒。

D.2.6 小胶质细胞培养基。

D.2.7 商品化 RNA 提取和 cDNA 反转录试剂盒。

D.2.8 目标基因和 *GAPDH* 内参基因的引物。

D.2.9 荧光定量 PCR 检测试剂盒。

D.3 检测步骤

D.3.1 制备小胶质细胞样品

利用 DPBS 润洗贴壁小胶质细胞(密度 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$),各试验组分别加入 100 ng/mL LPS、20 ng/mL IFN- γ 、20 ng/mL IL-4,37 °C 培养 24 h。

D.3.2 样品收集

收集处理 24 h 后的细胞,按照试剂盒说明书进行 RNA 提取和 cDNA 反转录。

D.3.3 荧光定量

按照试剂盒说明书进行荧光定量 PCR 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。

D.4 结果分析

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

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 0009—2022 人干细胞研究伦理审查技术规范
- [5] 涉及人的生物医学研究伦理审查办法(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] Rosa, C., et al. Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads[J]. Neuron 110 (21):3458-3483.
- [9] ANSI/ATCC ASN-0002-2022 Authentication Of Human Cell Lines: Standardization Of Short Tandem Repeat(STR)Profiling

