

ICS 07.080

A 40

团 体 标 准

T/CRHA 002—2021

人多能干细胞来源的小细胞外囊泡

Human pluripotent stem cell derived small extracellular vesicles

2021-12-28 发布

2022-1-1 实施

中国研究型医院学会 发布

目 次

前 言.....	I
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语、定义及缩略语.....	1
4 技术要求.....	2
5 检测方法.....	3
6 检验规则.....	4
7 包装、使用说明、标签、储存及运输.....	4
8 废弃物处理.....	5
附录 A（规范性）人多能干细胞的培养体系.....	6
附录 B（规范性）人多能干干细胞培养上清的收集方法.....	7
附录 C（规范性）小细胞外囊泡形态检测方法（透射电镜观察法）.....	8
附录 D（规范性）小细胞外囊泡数量检测方法（纳米流式检测法）.....	9
附录 E（规范性）小细胞外囊泡粒径检测方法（纳米流式检测法）.....	11
附录 F（规范性）小细胞外囊泡蛋白检测方法（蛋白印迹法）.....	12
附录 G（规范性）小细胞外囊泡数量与蛋白量比值计算方法.....	13
附录 H（规范性）促进细胞增殖检测方法（CCK-8 法）.....	14

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。

本文件由中国研究型医院学会细胞外囊泡研究与应用专业委员会提出

本文件由中国研究型医院学会归口。

本文件起草单位：上海交通大学、南方医科大学、中山大学、江苏大学、清华大学、厦门大学、空军军医大学、浙江大学、东南大学。

本文件主要起草人：汪泱、郑磊、王前、付清玲、钱晖、许文荣、尹航、邓志锋、李海燕、颜晓梅、郝晓柯、李莉、陶志华、刘必成、李青、李博。

人多能干细胞来源的小细胞外囊泡

1 范围

本文件规定了生产人多能干细胞来源的小细胞外囊泡的技术要求、检测方法、检验规则、包装、使用说明、标签、储存及运输和废弃物处理要求。

本文件适用于人多能干细胞来源的小细胞外囊泡的生产与检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过本文件的规范性引用而成为本文件必不可少的条款。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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

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

WS 299 乙型病毒性肝炎诊断标准

T/CSCB 0001 干细胞通用要求

T/CSCB 0002 人胚干细胞

T/CSCB 0005 人诱导多能干细胞

中华人民共和国药典

全国临床检验操作规程

3 术语、定义及缩略语

3.1. 术语及定义

下列术语及定义适用于本文件。

3.1.1. 人多能干细胞 human pluripotent stem cell

具有在体外无限地自我更新和向三胚层分化潜能的干细胞，包括人胚干细胞和人诱导多能干细胞。

3.1.2. 人诱导多能干细胞 human induced pluripotent stem cell

由人体细胞经重编程而获得的具有自我更新能力和向三胚层细胞分化潜能的一种干细胞。

3.1.3. 人胚干细胞 human embryonic stem cell

可在体外无限地自我更新，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。

3.1.4. 小细胞外囊泡 small extracellular vesicles

由细胞主动分泌的具有双层膜结构的直径小于 200nm 的微小囊泡。

3.2. 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

- 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)
- HEBV ——人类疱疹病毒 (Human Epstein-Barr Virus)
- HESC ——人胚干细胞 (human Embryonic Stem Cell)
- HiPSC——人诱导多能干细胞 (human induced Pluripotent Stem Cell)
- HIV ——人类免疫缺陷病毒 (Human Immunodeficiency Virus)
- hPSC ——人多能干细胞 (human Pluripotent Stem Cell)
- HTLV ——人类嗜 T 细胞病毒 (Human T-lymphotropic Virus)
- sEVs ——小细胞外囊泡 (small Extracellular Vesicles)
- TP ——梅毒螺旋体 (Treponema Pallidum)

4 技术要求

4.1. 原材料和辅料

- 4.1.1. 生产人多能干细胞来源的小细胞外囊泡的过程中，使用的原材料和辅料应符合 T/CSCB0001、T/CSCB0002、T/CSCB0005 要求。
- 4.1.2. 生产人多能干细胞来源的小细胞外囊泡的过程中，人多能干细胞的培养体系见附录 A。

4.2. 关键质量属性

4.2.1. 人多能干细胞

小细胞外囊泡生产过程的前、中、后，人多能干细胞的 key 质量属性分别完全符合 T/CSCB 0002 和 T/CSCB 0005 文件规定的标准。

4.2.2. 小细胞外囊泡

4.2.2.1. 形态

透射电镜下应呈现不聚团的具有清晰膜结构的茶托状或杯状结构，边缘清晰。

4.2.2.2. 粒径

应分布在小于 200nm 范围内，且在范围内存在粒径峰值。

4.2.2.3. 标志蛋白

小细胞外囊泡表面标志物 CD9、CD81、CD63 中的任意两个表达阳性；小细胞外囊泡内部标志物 TSG-101、Alix 中的任意一个表达阳性。

4.2.2.4. 纯度

小细胞外囊泡阴性标志物 GM130 或 Calnexin 应为阴性；小细胞外囊泡数量与蛋白量比值不低于 1×10^8 个颗粒/微克蛋白。

4.2.2.5. 生物活性

能促进体外培养的血管内皮细胞和成纤维细胞增殖。

4.2.2.6. 微生物

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

HBV、EBV 缩略语

4.3. 过程控制

应记录小细胞外囊泡的分离方法。

5 检测方法

5.1. 人多能干细胞

按照 T/CSCB0002 和 T/CSCB0005 文件规定的关键质量属性标准进行检测。

5.2. 人多能干细胞培养上清的收集

按照附录 B 的方法收集。

5.3. 小细胞外囊泡形态

按照附录 C 的方法检测。

5.4. 小细胞外囊泡数量

按照附录 D 的方法检测。

5.5. 小细胞外囊泡粒径

按照附录 E 的方法检测。

5.6. 小细胞外囊泡标志蛋白

按照附录 F 的方法检测。

5.7. 小细胞外囊泡纯度

5.7.1. 小细胞外囊泡数量与蛋白量比值

按照附录 G 的方法计算。

5.7.2. 小细胞外囊泡阴性和阳性标志物

按照附录 F 的方法检测。

5.8. 小细胞外囊泡生物活性

5.8.1. 促进血管内皮细胞增殖

按照附录 H 的方法检测。

5.8.2. 促进成纤维细胞增殖

按照附录 H 的方法检测。

5.9. 微生物

微生物检验方法见表 1。

表 1：微生物检验方法。

项目	检验方法
真菌	按照《中华人民共和国药典》中“1101 无菌检查法”项检测
细菌	按照《中华人民共和国药典》中“1101 无菌检查法”项检测
支原体	按照《中华人民共和国药典》中“3301 支原体检查法”项检测
HIV	按照 WS 293 核酸法检测
HBV	按照 WS 299 核酸法检测
HCV	按照 WS 213 核酸法检测
HTLV	按照《全国临床检验操作规程》核酸法检测
EBV	按照《全国临床检验操作规程》核酸法检测
HCMV	按照《全国临床检验操作规程》核酸法检测
TP	按照 WS 273 核酸法检测
外源病毒因子检测	按照《中华人民共和国药典》中“3302 外源病毒因子检查法”项检测

6 检验规则

6.1. 出厂检验

6.1.1. 在同一细胞来源的同一生产周期中的同一生产线、同一细胞代次、同一工艺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 个最小包装单元进行检测。

6.1.3. 每批产品均应进行出厂检验，并附检验报告。

6.1.4. 出厂检验的项目须包括 4.2 关键质量属性规定的所有项目。

6.2. 复核检验

根据产品需要，应由专业检验机构/实验室进行复核检验。

6.3. 判定规则

6.3.1. 出厂检验项目全部符合 4.2 关键质量属性规定，即被判为合格产品；有 1 项及以上不符合 4.2 规定，则被判为不合格产品。

6.3.2. 复核检验项目全部符合 4.2 关键质量属性规定，即被判为合格产品；有 1 项及以上不符合 4.2 规定，则被判为不合格产品。

7 包装、使用说明、标签、储存及运输

7.1. 包装

多能干细胞来源的小细胞外囊泡在生产后应进行密封包装，包装满足无菌要求。包装内应附使用说明，最小包装上应附标签。

7.2. 使用说明

使用说明应包括以下内容：

- a) 来源细胞名称，代次；
- b) 产品液体体积量，小细胞外囊泡数量；
- c) 小细胞外囊泡分离方法；
- d) 生产日期，生产批号；
- e) 储存条件，运输条件；
- f) 使用方法；
- g) 执行标准号；
- h) 生产组织，生产地址；
- i) 联系方式，邮政编码；
- j) 注意事项。

7.3. 标签

标签应包括以下内容：

- a) 来源细胞名称，代次；
- b) 产品液体体积量，小细胞外囊泡数量；
- c) 生产组织；
- d) 生产日期，生产批号；
- e) 储存条件。

7.4. 储存及运输

7.4.1. 储存

应选择低吸附、对人多能干细胞来源的小细胞外囊泡关键质量属性无影响的材料和容器。小细胞外囊泡应在低于-80℃环境下储存，应避免反复冻融或温度剧烈波动。

7.4.2. 运输

冻存的小细胞外囊泡应用干冰或在低于-80℃条件下运输，非冻存的小细胞外囊泡应在2℃~8℃条件下运输。

8 废弃物处理

人多能干细胞来源的小细胞外囊泡生产和检测过程中产生的废弃物应按照 T/CSCB 0001 中的规定处理。

附录 A
(规范性)
人多能干细胞的培养体系

A.1 支持细胞

人多能干细胞应在无滋养层的培养体系中培养。

A.2 细胞基质

人多能干细胞所用的细胞基质应采用成分明确的无动物源成分的 GMP 级细胞外基质。

A.3 细胞培养基及添加剂

用于制备小细胞外囊泡的人多能干细胞培养基应采用成分明确的、无动物源成分的、不含囊泡的培养液，需达到 GMP 级。

A.4 细胞消化液

人多能干细胞所用的消化液应采用成分明确的无动物源成分的 GMP 级消化液。

附录 B
(规范性)
人多能干细胞培养上清的收集方法

B.1 仪器和设备

B.1.1 生物安全柜。

B.1.2 离心机。

B.2 操作步骤

B.2.1 收集人多能干细胞的上清液。

B.2.2 依次去除死细胞及细胞碎片，记录去除方法。

B.2.3 经过以上处理的细胞上清液即刻分离小细胞外囊泡或-80℃冰箱保存。

附录 C
(规范性)

小细胞外囊泡形态检测方法（透射电镜观察法）

C.1 仪器和设备

C.1.1 透射电子显微镜。

C.1.2 Formvar-carbon 载样铜网。

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 为 7.4。

C.2.2 1%戊二醛溶液。

C.2.3 饱和草酸双氧铀溶液。

C.3 检测步骤

C.3.1 将附录 C 方法获得的小细胞外囊泡样本滴加在 Formvar-carbon 载样铜网上，室温静置 20 分钟。

C.3.2 滴加适量磷酸盐缓冲液于样本上，清洗 3 次。

C.3.3 滴加适量 1%戊二醛溶液于样本上，固定 5 分钟，随后用超纯水清洗 8 次。

C.3.4 用饱和草酸双氧铀溶液染色 5 分钟。

C.3.5 铜网在室温下干燥 10 分钟。

C.3.6 将铜网至于透射电子显微镜样本室内，观测小细胞外囊泡的形态。按照仪器说明书进行。

附录 D
(规范性)
小细胞外囊泡数量检测方法 (纳米流式检测法)

D.1 仪器和设备

D.1.1 纳米流式仪。

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 纳米流式仪浓度标准品 (1.99×10^{10} 个颗粒/毫升)。

D.3 检测步骤

D.3.1 按照使用说明，对纳米流式仪进行液流初始化和管路气泡排出。

D.3.2 用超纯水将浓度标准品稀释 100 倍，按照使用说明进行纳米流式仪的质控，将纳米流式仪调试到最佳检测状态后（散射和荧光通道的信号均达到最强且均一），在浓度标准品的测量参数下对稀释后的标准品采集数据（在最佳状态下，质控标准品颗粒数计数值范围通常在 5000-7000）。

D.3.3 按照使用说明，依次用洗液和超纯水清洗进样毛细管。

D.3.4 在 Labelled Exo 样品测量参数下检测磷酸盐缓冲液的颗粒数，确定磷酸盐缓冲液的洁净度，颗粒数计数小于 200 的磷酸盐缓冲液才能作为空白对照的数据采集并用于后续样品稀释。如果颗粒数计数高于 200，需用 0.22 微米的滤膜过滤。

D.3.5 用洁净的磷酸盐缓冲液将小细胞外囊泡样品预稀释 100 倍，在 EXO 样品测量参数对小细胞外囊泡样本进行数据采集。纳米流式仪颗粒计数在 4000-8000 之间为准确测量范围，若样品颗粒数计数过高或过低，则需调整样品的稀释倍数，再进行测定，记下样品的最终稀释倍数。另外需注意样品上机检测时散射通道的基线和自动阈值与空白对照（磷酸盐缓冲液）检测的基线和自动阈值是否一致，若样品检测时出现基线抬升，则需重新制备更高纯度的样品。

D.4 结果分析

使用 NF Profession 软件依次进行：浓度标准品设置、样品阈值设置、空白对照设置、待测样品浓度报告生成，最终得到待测样品浓度检测报告。计算小细胞外囊泡样本数量的公式如下：

$$X=(B-C)/A \times 1.99 \times 10^8 \times D \times E$$

式中：

X——小细胞外囊泡样本的数量；

A——测得的标准品颗粒数；

B——测得的（稀释后）样本颗粒数；

C——空白对照的颗粒数

D——样本的稀释倍数；

E——样本的体积（毫升）。

附录 E
(规范性)
小细胞外囊泡粒径检测方法 (纳米流式检测法)

E.1 仪器和设备

E.1.1 纳米流式仪

E.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。

E.2.1 磷酸盐缓冲液: pH 为 7.4。

E.2.2 纳米流式仪浓度标准品 (1.99×10^{10} 个颗粒/毫升)、S16M-EXO 粒径标准品。

E.3 检测步骤

E.3.1 按照使用说明,对纳米流式仪进行液流初始化和管路气泡排出。

E.3.2 用超纯水将浓度标准品稀释 100 倍,按照使用说明进行纳米流式仪的质控,将纳米流式仪调试到最佳检测状态后(散射和荧光通道的信号均达到最强且均一),在浓度标准品的测量参数下对稀释后的标准品采集数据(在最佳状态下,质控标准品颗粒数计数值范围通常在 5000-7000)。

E.3.3 按照使用说明,依次用洗液和超纯水清洗进样毛细管。

E.3.4 用超纯水将 S16M-EXO 粒径标准品稀释 100 倍,在 S16M-EXO 粒径标准品测量参数下对稀释后的粒径标准品进行采集数据。

E.3.5 按照使用说明,依次用洗液和超纯水清洗进样毛细管。

E.3.6 在 Labelled Exo 样品测量参数下检测磷酸盐缓冲液的颗粒数,确定磷酸盐缓冲液的洁净度,颗粒数计数小于 200 的磷酸盐缓冲液才能作为空白对照的数据采集并用于后续样品稀释。如果颗粒数计数高于 200,需用 0.22 微米的滤膜过滤。

E.3.7 用洁净的磷酸盐缓冲液将小细胞外囊泡样品预稀释 100 倍,在 EXO 样品测量参数对小细胞外囊泡样本进行数据采集。纳米流式仪颗粒计数在 4000-8000 之间为准确测量范围,若样品颗粒数计数过高或过低,则需调整样品的稀释倍数,再进行测定,记下样品的最终稀释倍数。另外需注意样品上机检测时散射通道的基线和自动阈值与空白对照(磷酸盐缓冲液)检测的基线和自动阈值是否一致,若样品检测时出现基线抬升,则需重新制备更高纯度的样品。

E.4 结果分析

使用 NF Profession 软件依次进行：样品阈值设置、粒径标准曲线拟合、空白对照颗粒扣除、样品粒径分布直方图生成，最终得到待测样品粒径检测报告。

全国团体标准信息平台

附录 F
(规范性)
小细胞外囊泡蛋白检测方法 (蛋白印迹法)

F.1 仪器和设备

- F.1.1 电泳仪。
- F.1.2 转膜仪。
- F.1.3 摇床。
- F.1.4 化学荧光成像仪。

F.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。

- F.2.1 磷酸盐缓冲液：pH 为 7.4。
- F.2.2 商品化分离胶、浓缩胶溶液。
- F.2.3 TBST 平衡盐缓冲液。
- F.2.4 电泳缓冲液。
- F.2.5 转膜缓冲液。
- F.2.6 封闭液。
- F.2.7 抗体（一抗、二抗）。

F.3 检测步骤

F.3.1 SDS-PAGE 电泳、转膜和封闭

- F.3.1.1 按照仪器说明书，取 20 微升小细胞外囊泡（浓度不低于 1×10^{10} 个颗粒/毫升）使用电泳仪和垂直电泳槽进行电泳。
- F.3.1.2 按照仪器说明书，使用转膜仪进行转膜。
- F.3.1.3 转膜后，使用封闭液室温封闭 1 小时。

F.3.2 抗体孵育

- F.3.2.1 孵育一抗，摇床 4℃ 过夜。孵育结束后，用 TBST 平衡盐缓冲液洗涤 3 次。
- F.3.2.2 孵育二抗，摇床室温 1 小时。孵育结束后，用 TBST 平衡盐缓冲液洗涤 3 次。

F.3.3 显影

使用化学荧光成像系统进行显影。按照仪器说明书进行。

附录 G
(规范性)

小细胞外囊泡数量与蛋白量比值计算方法

G.1 小细胞外囊泡的数量检测。

按照附录 D 的方法测定样品中小细胞外囊泡的数量 X。

G.2 小细胞外囊泡样品的蛋白量检测

用 BCA 试剂盒按照说明书测定样品的蛋白量 P。按照下列公式计算小细胞外囊泡数量与蛋白量比值 T:

$$T=X/P$$

T——小细胞外囊泡数量与蛋白量比值；

X——小细胞外囊泡的数量；

P——小细胞外囊泡的蛋白量。

附录 H
(规范性)
促进细胞增殖检测方法 (CCK-8 法)

H.1 仪器和设备

- H.1.1 多功能酶标仪。
- H.1.2 CO₂细胞培养箱。
- H.1.3 细胞超净台。

H.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。

- H.2.1 磷酸盐缓冲液：pH 为 7.4。
- H.2.2 商品化 CCK-8 试剂盒。

H.3 检测步骤

- H.3.1 将血管内皮细胞和成纤维细胞以 3000-5000 个细胞/孔的密度分别种植到 96 孔板中。
 - H.3.2 过夜培养后，实验组将小细胞外囊泡样本加入细胞培养基中，终浓度为 1×10^9 个颗粒/毫升。对照组加入相同体积的磷酸盐缓冲液。
 - H.3.3 每日用商品化 CCK-8 试剂盒检测各组细胞生长情况，检测 4-5 天。
 - H.3.4 比较实验组和对照组的细胞生长曲线。
-