

团 体 标 准

(T/CSCB XXXX—XXXX)

人小胶质细胞

Human microglia cell

2022-08-30

2022-10-31

中国细胞生物学学会 发 布

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、

本文件主要起草人：

人小胶质细胞

1 范围

本文件规定了人小胶质细胞的技术要求、检验方法、检验规则、使用说明、标签、包装、储存及运输要求。

本文件适用于原代和干细胞分化来源的人小胶质细胞的质量控制。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容对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

中华人民共和国药典（2020 年版）

全国临床检验操作规程

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

人小胶质细胞 human microglia

人中枢神经系统中的常驻免疫细胞，具有监视、吞噬作用和免疫调节功能。

3.1.2

监视 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。

3.1.3

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，小胶质细胞可吞噬并清除外源性病原体、细胞碎片、突触、蛋白聚集体。

3.1.4

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。

3.2 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）

HCV：丙型肝炎病毒（Hepatitis C Virus）

HCMV：人巨细胞病毒（Human Cytomegalovirus）

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）

RNA：核糖核酸（Ribonucleic Acid）

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相关要求。

4.1.2 应符合 T/CSCB 0001-2020 要求。

4.1.3 原材料应不携带 HIV、HBV、HCV、HTLV、EBV、HCMV、TP。

4.2 关键质量属性

4.2.1 细胞形态

二维培养体系下，为贴壁或半贴壁状态。单个细胞呈圆形或分枝状。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。

4.2.2 染色体核型

正常核型应为 46, XX 或 46, XY。

4.2.3 细胞存活率

未冻存≥80%，冻存复苏后≥60%。

4.2.4 细胞标志蛋白

TMEM119 和 IBA1 双阳性细胞占比≥90.0%、P2Y12 和 IBA1 双阳性细胞占比≥90%。

4.2.5 细胞功能特征

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 刺激或组织损伤后被活化，CD68、CD45 与 CD206 表达水平上调，而 TMEM119 和 P2Y12 表达水平下调。

4.2.6 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。

5 检验方法

5.1 细胞形态

二维培养条件下，用明视场细胞显微镜进行观察。

5.2 染色体核型

参照《中华人民共和国药典》中的“染色体检查”检验。

5.3 细胞存活率

参照附录 A 的方法检验。

5.4 细胞标志蛋白

按照附录 B 或附录 C 的方法检验。

5.5 微生物

5.5.1 真菌

按照《中华人民共和国药典》“1101 无菌检查法”项检测。

5.5.2 细菌

按照《中华人民共和国药典》“1101 无菌检查法”项检测。

5.5.3 支原体

按照《中华人民共和国药典》“3301 支原体检查法”项检测。

5.5.4 HIV

按照 WS 293 核酸法检验。

5.5.5 HBV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

5.5.6 HCV

按照 WS213 核酸法检验。

5.5.7 HTLV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

5.5.8 EBV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

5.5.9 HCMV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检验。

5.5.10 TP

按照 WS 273 核酸法检验。

5.6 吞噬功能检测

参照附录 D 的方法检验。

5.7 免疫激活检测

参照附录 E 的方法检验。

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 项及以上不符合本文件规定，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 项及以上不符合本文件规定，则判为不合格品。

7 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。

8 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。

9 包装、储存及运输

9.1 包装

应选择对人小胶质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 T/CSCB 0001 要求。

9.2.2 应在低于-130℃液氮环境下储存。

9.3 运输

9.3.1 应符合 T/CSCB 0001 要求。

9.3.2 应在干冰或低于-130℃条件下运输。

10 废弃物处理

10.1 人小胶质细胞生产和检测过程中产生的废弃物应建立废弃物细胞管理档案,严格执行管理规范并详细记录。

10.2 人小胶质细胞研究和生产中不合格的细胞、剩余废弃的细胞或捐赠物,应进行合法、妥善并符合伦理的处理。

附录 A

(规范性)

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 mm^2 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 $10\text{ }\mu\text{L}$ 混合液（A.3.2）滴在一侧计数室的盖玻片边缘，另取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 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（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 mm^2 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。

$$S = (M - D) / M \times 100\% \quad (\text{A.1})$$

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得超过算术平均值的 10%。

附录 B

(规范性)

细胞标志蛋白检测 免疫荧光染色计数法 (仲裁法)

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 DPBS。

B.2.2 4%多聚甲醛 (PFA)。

B.2.3 Triton-X100。

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。Triton-X100、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 15~30 min。DPBS 洗 3 次。

B.4.2 通透封闭

用含 0.3% Triton-X100 和 2%BSA 的 DPBS 室温下通透封闭细胞 1~2 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 5-10 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 1.5~2.5 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 1500 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式（B.1）进行计算。

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

式中：

P ——细胞标志物阳性比例；

H ——Hoechst 阳性细胞总数， ≥ 1500 ；

B ——抗体阳性细胞总数。

附录 C

(规范性)

细胞标志蛋白检测 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 μm 滤网。

C.1.6 流式管。

C.2 试剂

C.2.1 DPBS。

C.2.2 TrypLE。

C.2.3 人 Fc block（BD Bioscience）。

C.2.4 直标抗体。

C.2.5 FACS buffer：1X DPBS，2% BSA 及 0.05 mM EDTA。

C.2.6 小胶质细胞培养基

C.3 检测步骤

C.3.1 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，300 g，离心 10 min。

C.3.2 抗体孵育

用 95 μL FACS buffer+ 5 μL 人 Fc block 重悬细胞，并转移至 1.5 mL 离心管中冰上孵育 10 min 后，分别加入 5 μL CD45、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 5~10 min 轻弹混匀。最后用 FACS buffer 洗涤两次，300 g，离心 10 min。

C.3.3 染色后样品检测

用 200~300 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 的基础上画出阳性细胞群 2，排除没有被荧光抗体标

记的阴性细胞。

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

(规范性)

吞噬功能检测 流式细胞测定法

D.1 仪器和设备

D.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)。

D.1.2 水平离心机。

D.1.3 制冰机。

D.1.4 带盖离心管: 1.5 mL、50 mL 和 15 mL。

D.1.5 40 μm 滤网。

D.1.6 流式管。

D.1.7 垂直混匀仪

C.2 试剂

D.2.1 DPBS。

D.2.2 pHrodo 荧光染料。

D.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°C 避光孵育 7 天。

D.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 M 蔗糖中缓慢冷冻至 -80°C。37°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°C 1000 g 离心 10 min, 取上清 4°C 10000 g 离心 20 min。收集沉淀, 重悬于 10 mM sucrose/Tris solution, -80°C 保存。

D.2.5 直标抗体。

D.2.6 TrypLE。

D.2.7 FACS buffer。

D.2.8 小胶质细胞培养基。

D.3 试样制备

pHrodo 荧光染料标记突触体的制备: 在 4°C 10000 g 离心 5 min, 弃上清后, 将 100 μL 0.1 M Na₂CO₃ 和 1 μL 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 rpm 在垂直混匀仪上轻柔混匀 1 h。加入 1 mL 4°C 预冷的 DPBS, 在 4°C 下 10000 g 离心 1~2 min 后弃上清。1 mL 4°C 预冷的 DPBS 轻柔重悬沉淀, 在 4°C 下 10000 g 离心 1 - 2 min 后弃上清。重复上述步骤 6 次, 以充分去除未结合的 pHrodo 染料。洗涤结束后, 完全去除上清, 然后将 10 mM sucrose/Tris solution 轻轻加入到 ep 管中, 轻轻吹匀重悬, -80°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°C 孵育 24 h, 利用 TrypLE 消化后用小胶质细胞培养基收集。

D.4 检测步骤

D.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，300 g，离心 10 min。

D.4.2 抗体孵育

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

D.4.3 染色后样品检测

用 200~300 μ L FACS buffer 重悬细胞，然后通过 40 μ L 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。

D.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；2，内吞 Fibrillar A β 或突触体的 CD45/CD11b 双阳性细胞占比大于 80%。

D.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 E
(规范性)

免疫活化 ELISA 测定法

E.1 仪器和设备

E.1.1 酶标仪。

E.1.2 水平离心机。

E.1.3 制冰机。

E.1.4 带盖离心管：1.5 mL、50 mL 和 15 mL。

E.2 试剂

E.2.1 杜氏磷酸盐缓冲液 (DPBS)：细胞培养级别

E.2.2 脂多糖 (LPS)：细胞培养级别。

E.2.3 γ 干扰素 (IFN- γ)：纯度大于 90%。

E.2.4 白介素 4 (IL-4)：纯度大于 90%。

E.2.5 目的细胞因子 ELISA 检测试剂盒。

E.2.6 按相应要求配制检测所需的液体：人分化小胶质细胞培养基

E.3 检测步骤

E.3.1 制备静息态及激活态小胶质细胞外泌物样品

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

E.3.2 样品收集

收集 24 h 处理后培养基，1000 g 离心 5 min 收集上清，-20°C 短期保存，-80°C 长期保存，避免反复冻融。

E.3.3 根据 ELISA 试剂盒使用说明进行实验

E.3.4 利用酶标仪记录 OD450 吸收峰

E.3.5 根据标准曲线计算目的细胞因子浓度

E.4 结果分析

根据验证因子表达水平差异具体分析