

ICS 07.080
CCS A 40

团 体 标 准

T/CSCB XXXX-2023

人 心 脏 类 器 官

Human Cardiac Organoid

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

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。

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：苏州大学、XXXXXX

本文件主要起草人：XXXXXX。

人 心 脏 类 器 官

1 范围

本文件根据科学研究的应用方向，规定了由人多能干细胞体外定向分化获得的人心脏类器官的特征属性、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。

本文件适用于人心脏类器官的质量控制。

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。凡注日期的引用文件，仅该日期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

WS 299 乙型病毒性肝炎诊断标准

中华人民共和国药典（三部）

GB/T6682-2016 分析实验室用水规格和试验方法

T/CSCB 0001-2020 干细胞通用要求

T/CSCB 0002-2020 人胚干细胞标准

T/CSCB 0005-2021 人诱导多能干细胞标准

T/CSCB 0007-2021 人心肌细胞标准

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 类器官 organoid

由干细胞或前体细胞体外培养形成，由组织器官特异性的多种细胞组成，模拟体内相应器官结构和功能的三维立体培养物。

3.2 人心脏类器官 human cardiac organoid

由人多能干细胞体外分化组装获得的，具有心肌细胞和其它多种心脏非心肌细胞的腔室化类器官，具有收缩和舒张功能。

3.3 心肌细胞 cardiomyocyte

含有丰富的肌原纤维、横纹和线粒体，具有兴奋性、传导性、自律性和收缩性的人类肌性细胞。

3.4 心脏非心肌细胞 cardiac nonmyocyte

心脏中除心肌细胞外的其他细胞类型，包括内皮细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞和免疫细胞等。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件（按字母顺序排列）。

cTnT：心肌肌钙蛋白 T（Cardiac Troponin T）

DNA：脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic Acid）

HBV：乙型肝炎病毒（Hepatitis B Virus）

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）

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

TP：梅毒螺旋体（Treponema Pallidum）

5 伦理要求

- 5.1 细胞材料供者应签署书面的合法有效的知情同意书，包括但不限于，在合适条件下潜在研究及治疗的应用、意外发现的反馈、研究成果潜在的商业应用以及其他问题所使用的内容。应建立供者个人隐私保护机制。
- 5.2 细胞研究和生产组织应建立并执行细胞供者评估标准，应建立采集方法、运输、交接及储存标准，保证供者和细胞的安全。细胞都应具有细胞的获取方式、途径以及相关的临床资料，包括但不限于供者的一般信息、既往病史及家族史等。既往病史和家族史要对遗传性疾病相关信息进行详细采集，供者应筛查 HIV、HBV、HCV、HTLV、TP。根据情况应收集供者的 ABO 血型、人类白细胞抗原（HLA）I类和II类分型资料。
- 5.3 细胞系起源应通过查阅相关的知情同意书及其基因组和功能性鉴定的原始数据来确证。
- 5.4 培养基、生长因子等辅料应符合相应的质量要求。必要时，应对辅料进行检验。
- 5.5 使用动物血清时，应无特定动物源性病毒污染。禁止使用海绵体状脑病流行区来源的牛血清。
- 5.6 若培养基中含有人的血液成分，如白蛋白、转铁蛋白和各种细胞因子等，应明确其来源、批号及质量检定合格报告，并尽量采用国家已批准的相关产品。

6 技术要求

6.1 形态

应为三维立体囊球状培养物，可收缩和舒张，内含空腔。

6.2 细胞组成

应包含 cTnT 阳性的心肌细胞和其它心脏非心肌细胞，且心肌细胞的数量占比应不低于25%。

6.3 功能指标

应自发或诱发有节律的收缩和舒张；应具有成周期性变化的钙离子信号。

6.4 微生物

真菌、细菌、支原体、HBV、HCV、HIV、外源病毒因子等应为阴性。

7 检验方法

7.1 形态

光学显微镜直接成像，同时利用组织切片进行 H&E 染色，按照附录 A 检验。

7.2 细胞标志蛋白

按照附录 B 检验。

7.3 收缩性

光学显微镜下观察收缩和舒张情况。

7.4 钙瞬变

按照附录 C 检验。

7.5 细胞安全性

7.5.1 真菌

按照《中华人民共和国药典（三部）》检验。

7.5.2 细菌

按照《中华人民共和国药典（三部）》检验。

7.5.3 支原体

按照《中华人民共和国药典（三部）》检验。

7.5.4 HBV

按照《全国临床检验操作规程》检验。

7.5.5 HCV

按照 WS 213 检验。

7.5.6 HIV

按照 WS 293 检验。

7.5.7 HTLV

按照《全国临床检验操作规程》检验。

7.5.8 TP

按照 WS 273 检验。

8 检验规则

8.1 抽样方法和数量

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。

在同一批的产品中随机抽取 3 个最小包装单元。

8.2 出厂检验

每批产品应进行出厂检验，检验项目包括技术要求规定的所有项目，并附检验报告。

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

出厂检验项目全部符合技术要求规定，判为合格品；有 1 项及以上不符合本标准规定，则判为不合格品。

复核检验项目全部符合技术要求规定，判为合格品；有 1 项及以上不符合本标准规定，则判为不合格品。

9 使用说明

应至少包括以下内容：

- a) 产品名称；
- b) 细胞代次；
- c) 细胞数量；
- 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。

10 标签

应至少包括以下内容:

- a) 产品名称;
- b) 细胞代次;
- c) 细胞数量;
- d) 生产日期;
- e) 生产批号。

11 包装、储存及运输

11.1 包装

应选择对人心脏类器官技术要求无影响的材料和容器。

11.2 储存

应符合 T/CSCB 0001-2020 和 T/CSCB 0002-2020 要求。

应在液氮环境下储存。

11.3 运输

应符合 T/CSCB 0001-2020 和 T/CSCB 0002-2020 要求。

应在干冰或液氮冷冻条件下运输。

附录 A

（规范性附录）

类器官组织结构检测（H&E 染色法）

A.1 仪器和设备

A.1.1 石蜡包埋仪。

A.1.2 石蜡切片机。

A.1.3 光学显微镜。

A.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。

A.2.1 石蜡切片制备试剂：按照相应要求配置石蜡包埋所需试剂，包括固定液、脱水液、石蜡、脱蜡液、复水液、乙醇、二甲苯、中性树脂。

A.2.2 H&E 染色试剂：苏木精、伊红。

A.3 检测步骤

A.3.1 样品准备

用巴氏吸管吸取类器官，转移至离心管内，弃上清，用 4%多聚甲醛固定，经脱水、透明和包埋等步骤制成石蜡块。

A.3.2 石蜡切片制作

经石蜡切片机切割成标准厚度，制成石蜡切片。

A.3.3 H&E 染色

经脱蜡和复水后，用苏木精染色，分化后冲水。再用伊红复染，经乙醇脱水和二甲苯透明后，用中性树脂封片。

A.4 结果分析

显微镜下观察细胞结构及是否有空腔。

附录 B

（规范性附录）

标志蛋白检测（流式细胞分析法）

B.1 仪器和设备

B.1.1 流式细胞仪。

B.1.2 水平离心机。

B.1.3 制冰机。

B.1.4 电子天平。

B.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。

B.2.1 磷酸盐缓冲液：pH 7.4。

B.2.2 多聚甲醛（PFA）：纯度 95% 以上。

B.2.3 牛血清白蛋白（BSA）：纯度 98% 以上。

B.2.4 聚乙二醇辛基苯基醚（Triton X-100）。

B.2.5 抗体。

B.2.6 按照相应要求配制流式检测所需的液体：洗涤液、固定液、封闭通透液、抗体稀释液。

B.3 样品保存

洗涤液和固定后的样品于 2~8℃ 保存。固定液放入分装容器中，密封并标记，于 -20℃ 以下保存。相关抗体按说明书保存。

B.4 检测步骤

B.4.1 样品准备和固定

消化类器官，收集单细胞，250 g，离心 3 min。弃上清，加适量固定液冰上放置 10 min，然后用适量洗涤液洗涤 3~5 次，每次 3~5 min。

B.4.2 封闭和通透

用封闭通透液重悬细胞并把细胞分成两等份，分别作为实验组和同型对照组，冰上孵育 20 min，然后用洗涤液清洗一遍。

B.4.3 抗体孵育

按照抗体说明书进行稀释使用。

B.4.4 过滤上机

用洗涤液重悬细胞，然后通过 40 μm 滤网转移到流式管中，按流式细胞仪应用手册上机检测。

B.4.5 圈门设定原则

首先根据颗粒度和透光性设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。抗体同型对照作为阴性对照。

B.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 C

（规范性附录）

钙瞬变检测（钙离子染色法）

C.1 仪器和设备

C.1.1 离心机。

C.1.2 细胞培养箱。

C.1.3 激光共聚焦显微镜。

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 Fluo-4 AM（钙离子荧光探针）。

C.2.2 Hank's 平衡盐溶液（HBSS）。

C.3 检测步骤

C.3.1 类器官样品的准备

将人心脏类器官预培养于玻底皿中。

C.3.2 Fluo-4 AM 与类器官孵育

按照 Fluo-4 AM 说明书进行。

C.3.3 类器官检测

用激光共聚焦显微镜检测类器官，激发波长 488 nm 左右，发射波长 512 ~ 520 nm。

C.4 结果分析

用 $\Delta F/F_0$ 评价钙瞬变相对荧光变化，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。