



中华人民共和国国家标准

GB/T 42466—2023

生物样本库多能干细胞管理技术规范

Technical specification for pluripotent stem cells management of biobanking

2023-09-07 发布

2023-09-07 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

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 总体要求 3

6 采集与接收 3

7 建系 4

8 复苏和培养 4

9 冷冻与储存 5

10 质量控制..... 5

11 分发..... 6

12 运输..... 7

附录 A（资料性） 人和小鼠多能干细胞生物样本库的质量控制检测项目 8

参考文献..... 9

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。

本文件由全国生物样本标准化技术委员会(SAC/TC 559)提出并归口。

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、中国细胞生物学学会、北京工商大学、北京泽辉辰星生物科技有限公司、安徽中盛溯源生物科技有限公司、中国计量科学研究院、中国标准化研究院、中国合格评定国家认可中心、昆明理工大学、湖南光琇高新生命科技有限公司、上海芯超生物科技有限公司、中国医药生物技术协会、复旦大学附属中山医院、深圳华大生命科学研究院、广东省中医院。

本文件主要起草人：赵同标、郝捷、周琪、曹佳妮、胡宝洋、王磊、马爱进、梁灵敏、王柳、张愚、魏军、俞君英、傅博强、彭耀进、谭元卿、马娟、吴骏、王昱凯、李晓燕、王长林、翟培军、纳涛、李天晴、林戈、郜恒骏、吴朝晖、李卡、李启沅、张小燕、陈曲波。



生物样本库多能干细胞管理技术规范

1 范围

本文件规定了生物样本库中人多能干细胞和小鼠多能干细胞的管理技术通用要求,包括总则、原材料和相关数据的采集与接收、建系、复苏和培养、冷冻与储存、质量控制、分发和运输的管理和技术要求。

本文件适用于生物样本库人多能干细胞和小鼠多能干细胞的管理。

本文件不适用于拟用于临床治疗的生物样本的管理。

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。

GB/T 7408 数据元和交换格式 信息交换 日期和时间表示法

GB/T 16886.2 医疗器械生物学评价 第2部分:动物福利要求

GB/T 37864 生物样本库质量和能力通用要求

GB/T 40364 人类生物样本库基础术语

ISO 21709 生物技术 生物样本保藏 建立、维持和表征哺乳动物细胞系的过程和质量要求(Biotechnology—Biobanking—Process and quality requirements for establishment, maintenance and characterization of mammalian cell lines)

ISO 24603 生物技术 生物样本保藏 人和小鼠多能干细胞通用要求(Biotechnology—Biobanking—Requirements for human and mouse pluripotent stem cells)

3 术语和定义

GB/T 40364、ISO 21709 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

干细胞 stem cells

一类能够自我更新、具有分化成一种或多种功能细胞类型的细胞。

3.2

多能干细胞 pluripotent stem cells

一类能够在体外无限制的自我更新,并且具有向三胚层细胞分化潜能的干细胞。

示例:胚胎干细胞、诱导多能干细胞。

注:人的胚胎干细胞称为人胚干细胞。

3.3

采集 collection

从供者获得组织、细胞等生物样本的过程。

[来源:GB/T 40364—2021,3.20,有修改]

3.4

冻存 cryopreservation

使细胞暂时脱离生长状态而保存其细胞特性的低温冷冻过程。

[来源:ISO 21709:2020/Amd 1:2021, 3.6]

3.5

复苏 thawing

解冻冷冻保存的细胞使其恢复正常生长状态的过程。

3.6

传代 passage

为细胞生长提供更大的生长空间,将细胞接种到新的含培养液的培养容器中的过程。

3.7

群体倍增时间 population doubling time, PDT

细胞群体扩增至 2 倍数量所用的时间(以小时计)。

3.8

分化 differentiation

干细胞在特定条件下逐渐形成具有不同形态结构和功能特征、表达不同特异性基因的细胞群的过程。

3.9

细胞系 cell line

从组织分离的原代细胞经传代扩增后所获得的细胞群体。



3.10

核型 karyotype

细胞有丝分裂中期所具备的整套染色体数目、长度、着丝点位置、随体、主缢痕和次缢痕等特征。

3.11

批号 lot number

用于细胞采集、分离、培养、冷冻和储存整个过程中溯源的唯一标识符。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ATP:腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate)

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)

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)

HLA:人类白细胞抗原(human leukocyte antigen)

HTLV:人类嗜 T 细胞病毒(human T-lymphotropic virus)

MTA:材料转移协议(materials transfer agreement)

STR:短串联重复序列(short tandem repeat)

TP:梅毒螺旋体(treponema pallidum)

5 总体要求

5.1 应按照 GB/T 37864、ISO 24603 和 ISO 21709 中的要求建立和实施多能干细胞质量管理体系,并实施多能干细胞质量控制程序,质量控制检测项目参见附录 A。

5.2 应建立利用多能干细胞开展科学研究、产品开发等相关活动的伦理审查程序,人多能干细胞研究伦理审查原则、审查内容、审查类型及审查程序可参考 T/CSCB 0009。

5.3 应按照 GB/T 37864、ISO 24603 和 ISO 21709 的要求对多能干细胞相关人员、基础设施/专用场地、环境和设备进行管理。

5.4 应对多能干细胞建系、鉴定、培养、冷冻保存和复苏等方面的人员进行专业培训。

5.5 应按照 ISO 21709 和 ISO 24603 的要求对多能干细胞操作相关的试剂、耗材和其他供应品进行管理,并建立多能干细胞培养所需材料(包括试剂、耗材等)的接受标准。

5.6 应按照 GB/T 37864 和 ISO 24603 中的相关要求管理多能干细胞信息和数据,包括并不限于:

- a) 技术信息:细胞建系方法、培养条件、传代信息、细胞特性鉴定数据、微生物检测数据;
- b) 冻存信息;
- c) 为满足用户最终实验目标所需专业要求的细胞特性和安全性检测数据;
- d) 细胞身份鉴别数据(如 STR 分析或 HLA 配型或单核苷酸多态性分析等其他等效方法的检测数据);
- e) 最短保存时间。

5.7 应按照 GB/T 37864 和 ISO 24603 的要求对供者的个人信息进行保密性管理。

5.8 应按照 GB/T 37864 和 ISO 24603 的要求对来自同一批次培养细胞设立批号,进行多能干细胞追溯管理。

5.9 应建立源于实验室的安全风险控制规程。

5.10 应根据预期应用建立多能干细胞微生物风险控制规程和细胞源头的风险管控规程。

5.11 应将新收入生物样本库的原代组织或细胞保存在专用区域和隔离设备中,控制对其他已建立细胞培养的风险,经检测和评估判断为低风险后,可合理重新安置。

5.12 应按照 GB/T 37864 和 ISO 24603 的要求对废弃物进行管理,对多能干细胞及其衍生分化产物和建系时的生物材料(如胚胎、生殖细胞、骨髓、血液等)的处理应符合适用的环境、生物安全和伦理要求。

5.13 供体小鼠饲养的动物福利应符合 GB/T 16886.2 的要求。

5.14 当使用由其他实验室、公司或组织开发的特殊品系小鼠或基因编辑小鼠建立多能干细胞时,应先与该类小鼠的法定所有人签订建立小鼠多能干细胞的协议。上述类型小鼠及其衍生多能干细胞系的使用应避免与小鼠的原始所有者的权益发生冲突。

5.15 应按照 GB/T 7408 的规定编写日期和时间。

6 采集与接收

6.1 应建立、实施多能干细胞相关的生物原材料的采集与接收程序,并对采集信息、运输信息、接收信息等进行管理。

注:每个选定的组织都有特定的收集要求和最佳操作方法;采集过程中考虑相关科技进展有助于提高收获细胞的质量。

6.2 应对生物原材料进行生物风险管理和评估,应该通过评估与地理位置、供体群体和所采集的组织相关的最有可能的污染物来降低微生物污染(包括但不限于细菌、真菌、病毒、寄生虫)的风险。

6.3 采集人类组织细胞的过程中应采取保护供者和采集人员健康和安全的措施。

6.4 生物原材料采集时,应使用无菌的试剂和耗材。

6.5 应对生物原材料采集时间、采集地点、采集方法、采集人员等信息进行记录。

6.6 应记录人源生物原材料的供者信息,包括但不限于:

- a) 以代码的形式匿名化或伪名化后的供者编码;
 - b) 供者的相关健康状况(如性别、年龄、病史、供者健康或适用性说明、疾病、并发症等);
- 注:根据具体情况采集 ABO 血型信息和 HLA 分型信息。
- c) 供者在捐赠前所接受的医疗和特殊治疗的相关信息(如治疗日期、治疗期限、用药、医嘱等);
 - d) 供者提供的知情同意的信息(如经匿名化处理的知情同意副本);
 - e) 供者信息的文件应包括供者的地理区域;
 - f) 捐赠组织或细胞的类型。

6.7 应记录的小鼠供体信息,包括但不限于:

- a) 小鼠的查阅编码,可以是代码的形式;
- b) 小鼠品系和基因型;
- c) 小鼠的相关健康状况,包括供体的健康或适用性说明、疾病种类、并发症;
- d) 年龄;
- e) 性别;
- f) 采样前供体小鼠接受的药物或特殊处理信息,包括处理日期、处理期限、用药、相关结论、饮食、压力处理;
- g) 提供供体小鼠的机构名称,以及机构动物饲养微生物检测结果;
- h) 组织或细胞的类型。

6.8 应确定生物原材料的适宜运输条件,并按照 GB/T 37864 的要求对生物原材料进行运输和处理,运输环节应考虑以下因素:

- a) 包装、材料、容器、二级容器;
- b) 介质或溶剂;
- c) 运输时间和温度。

6.9 应记录生物原材料接收及储存信息,包括接收时间、接收地点、接收人员、储存条件和位置等。

6.10 应使用可追溯的方法对供体生物原材料或源自该材料的细胞系的传染源进行检测并记录。

7 建系

7.1 应建立、实施、验证、记录和维护相关细胞系的规程。

7.2 应按照 ISO 21709 和 ISO 24603 要求建立人多能干细胞系和小鼠多能干细胞系。

7.3 应按照 GB/T 37864 和 ISO 24603 要求建立多能干细胞系的唯一标识。此唯一标识应包括唯一的细胞系名称(如通过在人多能干细胞的 hPSCreg 数据库中注册生成的名称)或样本编号、批号。

7.4 应记录多能干细胞建系信息,包括但不限于建系时间、建系人员、建系方法、细胞系名称等。

8 复苏和培养

8.1 应建立、实施、验证、记录和维护相关细胞系的复苏和培养规程。

8.2 应按照 GB/T 37864 和 ISO 24603 要求进行多能干细胞系的培养。

8.3 应对干细胞所需培养材料(包括试剂、耗材等)微生物污染风险和其他潜在危害(如有毒污染物、病毒源等)进行风险评估。

8.4 应对干细胞所需培养材料(包括试剂、耗材等)建立质量控制程序。

8.5 应对培养人多能干细胞所使用的培养基的成分(如白蛋白、转铁蛋白和各种细胞因子)、来源、批号进行记录,必要时对相关质量验证报告进行保存。

8.6 应对细胞系名称、细胞代次、培养条件(如选择的培养基、接种密度、培养参数)、操作日期、操作人员等进行记录,宜对群体倍增时间进行记录。

注:处于细胞线性扩增期的 PDT 可用以下公式进行计算:

$$PDT = \frac{(T - T_0) \times \ln 2}{\ln N - \ln N_0}$$

式中:

$(T - T_0)$ ——以小时为单位的培养时间;

N ——收获的细胞数;

N_0 ——接种的细胞数。

8.7 多能干细胞复苏时应记录细胞信息,包括但不限于:

- a) 批号;
- b) 细胞名称;
- c) 代次数;
- d) 培养条件;
- e) 操作人员;
- f) 复苏日期;
- g) 从离开液氮到细胞培养之间的时间;
- h) 细胞复苏后培养达到足够克隆密度可传代的时间。

9 冷冻与储存

9.1 应建立、实施、验证、记录和维护相关细胞系的冷冻与储存规程。

9.2 GB/T 37864 冷冻过程应控制细胞密度、细胞活率、冷冻速率等,并选择使用适当的冷冻保护剂,并对冷冻过程进行记录,包括但不限于:

- a) 细胞名称;
- b) 批号;
- c) 细胞代次;
- d) 冷冻日期;
- e) 冷冻人员;
- f) 冷冻保护剂名称或配方;
- g) 细胞数量。

9.3 应按照 GB/T 37864、ISO 24603 和 ISO 21709 要求对多能干细胞进行储存。

9.4 应对每批储存的多能干细胞进行记录。记录内容应包括但不限于:

- a) 细胞名称;
- b) 批号;
- c) 储存日期;
- d) 储存人员;
- e) 储存位置;
- f) 储存温度;
- g) 细胞代次。

10 质量控制

10.1 应建立、实施、验证、记录和维护相关细胞系检测规程,可参考 T/CSCB 0002 和 T/CSCB 0005 的

内容建立人多能干细胞检测验收标准。

10.2 应建立多能干细胞的形态、身份、染色体核型、存活率、标志基因、分化潜能、微生物及毒素等指标的测试程序,并对检测结果数据进行记录。

10.3 必要时选择适宜的方法对细胞活性进行测定,测定方法包括但不限于:

- a) 酯酶的功能;
- b) 基于琥珀酸脱氢酶 (MTT) 测定的噻唑蓝法;
- c) ATP 的含量;
- d) 凋亡标志物;
- e) 细胞氧化还原电位;
- f) 细胞增殖率 (DNA 含量);
- g) 线粒体功能;
- h) 细胞膜完整性。

10.4 应根据多能干细胞的使用目的建立标志基因表达的接受值,包括但不限于转录因子标志基因 (如 *OCT 4*、*SOX 2*、*NANOG* 在人多能干细胞和小鼠多能干细胞中都能表达) 和细胞表面多能性标志基因 (如人多能干细胞表达 *TRA-1-81*、*TRA-1-60*、*SSEA 3*、*SSEA 4*; 小鼠多能干细胞表达 *SSEA 1*)。

10.5 应根据多能干细胞的用途选择合适的方法对分化潜能进行分析,分析方法包括但不限于:

- a) 体外分化 (如诱导形成拟胚体进行非特异性分化或向三胚层的代表细胞类型定向分化);
- b) 畸胎瘤形成;
- c) 嵌合体形成;
- d) 四倍体互补。

10.6 应对诱导多能干细胞进行重编程因子表达水平、载体残留 (如适用) 检测并记录。

10.7 应对生物原材料、培养试剂耗材、设备维护和细胞建系、培养、冻存、复苏的整个过程建立各个关键点微生物检测。

10.8 应验证用于微生物测试的检测方法,包括在测试细胞培养方面使用的方法的灵敏度、特异性和稳定性。

10.9 应使用已验证过的方法对人多能干细胞进行真菌、细菌、传染病原体 (如 HIV、HBV、HCV、HTLV、HCMV、EBV、TP) 和支原体检测。

10.10 应使用已验证过的方法对小鼠多能干细胞进行真菌、细菌、支原体检测,对供体动物和细胞培养试剂的风险评估也应对微生物进行检测。用于多能干细胞建系的供体小鼠应根据实验动物饲养规范进行微生物筛查检测。

10.11 应根据潜在用途对可能存在风险的细胞源头进行检测,包括但不限于内源性和外源性的致病性因子、异常免疫反应、致瘤性和遗传稳定性。

10.12 应对多能干细胞在培养过程中发生的进行性或不可逆的变化进行记录和评估,如基因序列、染色体变化、生长速率或形态、蛋白质核酸和代谢物的分子指纹谱的变化。

11 分发

11.1 应按照 GB/T 37864、ISO 24603 和 ISO 21709 要求进行多能干细胞分发。

11.2 分发前,应由多能干细胞接收方 (以下称“用户”) 提交申请,并经供应方根据其正式程序进行审批。

11.3 供应方与用户应签署 MTA 或同等条款和条件文件,MTA 文件应至少一式两份,由供应方与用户各自存储。

11.4 供应方应根据 GB/T 37864 和 ISO 24603 要求建立、成文并实施用户投诉处理程序。供应方应针对用户培养失败的情况制定补发或替代的相关政策。供应方宜对所有投诉进行审阅和评估,以寻求

并采取有效纠正措施,提高服务质量。

11.5 供应方应向用户提供可追溯的批号。

11.6 供应方宜向用户提供使用说明。使用说明通常宜包含一般培养和冻存方法的信息,以及多能干细胞的适用要求(如“仅适用于体外研究”“不用于人配子的产生”“不用于人生殖克隆”等)。

11.7 供应方宜基于多能干细胞生物学特性的检测结果和微生物检测数据向用户提供细胞质量证明。

11.8 供应方宜提供有助于用户有效选择合适细胞系的相关信息。如适用,此类信息宜包括但不限于:

- a) 细胞冻存的日期;
- b) 建系的日期;
- c) 来自供者关于将原始组织用于研究知情同意的相关信息;
- d) 细胞质量控制和鉴定的数据和说明;
- e) 动物福利批准的相关信息;
- f) 对衍生细胞系的使用限制。

12 运输

12.1 供应方应制定多能干细胞运输规程并实施。

12.2 应按照 GB/T 37864、ISO 24603 和 ISO 21709 要求进行运输,并根据多能干细胞的使用需求选择适当的运输方式和运输条件,避免多能干细胞在不必要的辐射下暴露。

12.3 多能干细胞应以冻存状态或者以生长状态的方式运输,并告知接收方发货时间和物流相关信息。

12.4 应将含有运送细胞的冻存管或培养物容器放入用环氧乙烷预灭菌的自粘密封包装中,作为基础包装。包装上应注明:

- a) 样本的名称和数量;
- b) 生产日期;
- c) 细胞供应方名称;
- d) 细胞供应方地址和电话号码。

12.5 多能干细胞的运输宜由供应方进行验证,由细胞用户进行接收。认证的内容包括但不限于:

- a) 装载细胞的容器;
- b) 运输设备和运输方法;
- c) 运输条件和最长运输时间;
- d) 运输风险;
- e) 保障措施。

12.6 供应方应确认并控制以下运输条件:

- a) 温度范围;
- b) 防止污染措施;
- c) 运输装置的设备性能验证(如含冷冻液态氮的绝热包装、装有细胞样品的冻存管或培养容器);
- d) 适当的包装;
- e) 细胞样品的定向放置。

12.7 多能干细胞的运输应记录以下方面,包括但不限于:

- a) 运输的方式和条件;
- b) 运输路线;
- c) 运输代理及其联系方式;
- d) 收件人姓名、地址和其他信息。

12.8 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、液氮)以保持适宜的运输温度。

附 录 A
(资料性)

人和小鼠多能干细胞生物样本库的质量控制检测项目

人和小鼠多能干细胞推荐的质量控制检测项目见表 A.1。

表 A.1 人和小鼠多能干细胞推荐的质量控制检测项目

质量检测	原代分离培养	传代培养	冻存前	复苏后
细胞形态	+	+	+	+
细胞鉴定	—	+	+	+
染色体核型	—	+	—	+
群体倍增时间(PDT)	—	+	+	+
细胞存活率	—	+	+	+
干细胞标志物	—	+	+	+
多能性分析	—	+	+	+
微生物检测	+	+	+	+
注：“+”代表在检测项目中的测试；“—”代表不在检测项目中的测试。				

参 考 文 献

[1] T/CSCB 0001 干细胞通用要求

[2] T/CSCB 0002 人胚干细胞

[3] T/CSCB 0005 人诱导多能干细胞

[4] T/CSCB 0009 人干细胞研究伦理审查技术规范

[5] ISSCR. Guidelines for stem cell science and clinical translation. International Society for Stem Cell Research (ISSCR), 2021.

[6] ISCBI. Consensus guidance for banking and supply of human embryonic stem cell lines for research purposes. International Stem Cell Banking Initiative (ISCBI), 2009.

[7] Alejandro D. Angeles et al. Hallmarks of pluripotency. Nature[J]. 2015, 525,469-478.

[8] Sandra Coecke al. Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. Altern. Lab. Anim[J]. 2005, 33(3), 261-870.

[9] Vahideh Assadollah et al. Effect of embryo cryopreservation on derivation efficiency, pluripotency and differentiation capacity of mouse embryonic stem cells. J. Cell Physiol[J]. 2019, 234(12),21962-21972.
