

团 体 标 准

T/FDSA 0049—2024

人源间充质干细胞外泌体制备与检验规范

Specifications: Production and Testing of Exosomes Derived from Human
Mesenchymal Stem Cells

2024 - 02-03 发布

2024 - 03-06 实施

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 | 1 |
| 5 人源间充质干细胞要求 | 2 |
| 6 技术要求 | 2 |
| 6.1 外泌体制备 | 2 |
| 6.2 关键质量属性 | 2 |
| 7 检验方法 | 3 |
| 7.1 形态 | 3 |
| 7.2 数量、粒径、浓度 | 3 |
| 7.3 标志蛋白 | 3 |
| 7.4 蛋白含量 | 3 |
| 7.5 颗粒蛋白比 | 3 |
| 7.6 微生物 | 3 |
| 8 检验规则 | 4 |
| 8.1 总原则 | 4 |
| 8.2 放行检验 | 4 |
| 8.3 留样 | 4 |
| 8.4 复核检验 | 4 |
| 8.5 判定规则 | 4 |
| 9 包装、储存和运输 | 4 |
| 9.1 包装 | 4 |
| 9.2 标签 | 4 |
| 9.3 储存 | 5 |
| 9.4 运输 | 5 |
| 10 废弃物处理 | 5 |
| 附录 A (资料性) 外泌体质量检验报告单 | 6 |
| 附录 B (规范性) 外泌体形态检测 (透射电镜观察法) | 7 |
| 附录 C (规范性) 外泌体颗粒浓度检测 (纳米流式检测法) | 8 |
| 附录 D (规范性) 外泌体粒径检测 (纳米流式检测法) | 9 |
| 附录 E (规范性) 外泌体数量及粒径检测 (ZetaView NTA 检测法) | 10 |
| 附录 F (规范性) 外泌体数量及粒径检测 (电阻感应脉冲检测法 库尔特原理) | 11 |

附录 G（规范性） 外泌体蛋白含量检测（BCA 检测法） 12
附录 H（规范性） 外泌体表面标志蛋白检测（免疫印迹法） 13
参考文献 14

中国食品药品企业质量安全促进会

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。

本文件由青岛海尔生物科技有限公司提出。

本文件由中国食品药品企业质量安全促进会归口。

本文件起草单位：青岛海尔生物科技有限公司、北京大学深圳医院、北京吉中中科生物技术有限公司、苏州为度生物技术有限公司天津分公司、北京华龛生物科技有限公司、北京第一生物科技开发有限公司、成都康景生物科技有限公司、山东芯超生物科技有限公司、中科睿极（海宁）生物科技有限公司、广东先康达生物科技有限公司、赛睿泰（青岛）生物科技有限公司、山东思乐基医药科技有限公司、广东唯泰生物科技有限公司、北京希诺赛尔健康科技推广有限公司、北京尧景基因技术有限公司、诺赛联合（北京）生物医学科技有限公司、上海昭晗实业有限公司、朗姿赛尔生物科技（广州）有限公司、宁波希诺赛尔生物科技有限公司、烟台旭智生物科技有限公司、上海揽微赛尔生物科技有限公司、赛浦生物科技（长春）有限公司、苏州唯思尔康科技有限公司、大昌洋行（上海）有限公司、华域生物科技（天津）有限公司、江西北正干细胞生物科技有限公司、瑞芯智造（深圳）科技有限公司、重庆市铂而斐细胞生物技术有限公司、上海慧存医疗科技有限公司、上海交通大学医学院附属仁济医院、江苏育瑞康生物科技有限公司、青岛瑞思德生物技术有限公司、海昇（湖州）生物医药技术有限公司、中科聚研干细胞有限公司、上海纳米技术及应用国家工程研究中心有限公司、青岛瑞源细胞生物科技开发有限公司、上海循源生物科技有限公司、青岛大学、上海华盈生物医药科技有限公司、山东杰凯生物科技有限公司、深圳市北科生物科技有限公司、厦门星际诺康细胞科技有限公司、山东省千佛山医院、北京全式金生物技术股份有限公司、热休（厦门）细胞生物科技有限公司、磐升瑞祥（山东）生物工程股份有限公司、诺千健康生物科技有限公司、杭州荣泽生物科技集团有限公司、广东冠驰干细胞医疗科技有限公司、广东艾万生物科技有限公司、四川康克俞生物科技有限公司、广东赛尔生物科技有限公司、安龄（上海）生物科技有限公司、广州暨大美塑生物科技有限公司、上海宇玫博生物科技有限公司、三代康年（上海）医疗科技有限公司、江苏为真生物医药技术股份有限公司、北京国卫生物科技有限公司、保信亚太生物科技（深圳）有限公司、重庆市华雅干细胞技术有限公司、浙江生创精准医疗科技有限公司、山东天互生物科技有限公司、北昊干细胞与再生医学研究院有限公司、山东水发生命科学研究有限公司、艾可泰科（浙江）控股有限公司、呈诺再生医学科技（北京）有限公司、陕西贝芮雅生物科技有限公司、河南道特医药科技股份有限公司、青岛市妇女儿童医院、中科细胞工程（苏州）有限公司、时力生物科技（北京）有限公司、滨州医学院、麦纳安生物技术（苏州）有限公司、西安东澳生物科技有限公司、湖南联合创美医药生物科技有限公司、山东大学齐鲁医院（青岛）、深圳市茵冠生物科技有限公司、河北水熊基因科技有限公司、山东灵犀生物科技有限公司、四川天府亨特生命科技有限公司、优牙生物科技（上海）有限公司。

本文件主要起草人：曹启龙、陈俊辉、李慧、李云霄、金惊、雷欣华、廖晓龙、刘红芹、刘伟、鄢晓君、孙彦洵、刘秀丽、王瑾、侯艳、寇大莲、程威、范传文、邹新峰、丰玫玫、张智勇、谢委翰、薛卫巍、谢海涛、安维玲、窦效伟、付强、孙宇、许峻荣、陈智聪、韩之海、杨曦蕊、高琦、张旭辉、亓爱杰、李少波、吕政庭、王立新、陈忠平、程远星、陈则姜、黄莹之、方攀峰、赵谦、卢海源、李丁、吕贯廷、王伟、马杰、翟艳华、杨诗逸、严秀英、李亚威、牟春琳、李政楠、燕舞、赵涌、王哲、柳可、

T/FDSA 0049—2024

戴晓宇、甘元善、朱雪晶、冯蕾、俞卫锋、刘文明、王建波、陈梦梦、张炳强、邹伟、齐鹤理、王婧宁、姜延明、张世冬、彭家伟、于亚平、王端贺、狄国虎、张庆华、赵凯、蔡车国、李柱、张磊升、马静、吴建洪、王红丽、何世强、陈相波、郑景峰、傅子文、陈光风、王泰华、王健、夏黎明、高博、李海源、何林富、时凯、李晓玉、岳云强、王欣、颜敏、许震宇、高恒亮、沈政、张百峰、蔡俊、石慧、王静、闫永生、于宝东、闫美兴、张京钟、樊克兴、付强、刁建忠、白赓、王颖翠、张芸、吝宏、殷路、刘超、杨明嘉、叶青松。

本文件为首次发布。

中国食品药品企业质量安全促进会

人源间充质干细胞外泌体制备与检验规范

1 范围

本标准规定了人源间充质干细胞外泌体的鉴定方法、检验要求、检验规则、标签、包装、储存、运输和废弃物处理要求。

本标准适用于人源间充质干细胞外泌体的制备与检验。

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 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
 中华人民共和国药典（2020 年版）
 全国临床检验操作规程（第 4 版）
 《药品生产质量管理规范》
 T/CSCB 0001-2020 干细胞通用要求
 T/CSCB 0003-2020 人间充质干细胞
 《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）》

3 术语和定义

3.1

干细胞 *stem cell*

干细胞是一类具有不同分化潜能，并在非分化状态下自我更新的细胞。

3.2

人源间充质干细胞 *human mesenchymal stem cell*

一类存在于多种人体组织（如脐带组织、胎盘组织、脂肪组织等），具有多向分化潜力，非造血干细胞的成体干细胞。这类干细胞贴壁培养后呈成纤维细胞样形态，具有向多种中胚层系列（如成骨、成软骨及成脂肪细胞等）或非间充质系列细胞分化的潜能，并具有独特的细胞因子分泌功能。

3.3

外泌体 *exosome*

由活细胞经过“内吞、融合、释放”的一类具有磷脂双分子层，直径在30-150nm之间的细胞外囊泡。

注：外泌体携带多种蛋白质、mRNA、miRNA和脂质类物质等，广泛参与细胞间物质运输与信息传递，调控生理和病理过程。

4 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）
 HIV ——人类免疫缺陷病毒（Human Immunodeficiency Virus）

HMSC——人源间充质干细胞 (human Mesenchymal Stem Cell)
HTLV ——人类嗜 T 细胞病毒 (Human T-lymphotropic Virus)
TP ——梅毒螺旋体 (Treponema Pallidum)
GMP ——药品生产质量管理规范 (Good Manufacturing Practice of Medical Products)

5 人源间充质干细胞要求

细胞组织来源应通过医疗机构或区域伦理委员会审批,且供者签署知情同意(应用及研究)。

应建立细胞采集的供者评估和筛选标准、采集方法、运输标准和交接标准,保证供者和细胞的安全。需提供干细胞的获取方式和途径以及相关的临床资料,包括供者的一般信息、既往病史、组织来源信息、检测报告、运输、交接记录及供者的相关临床资料、家族史等。既往史和家族史要对遗传病(单基因和多基因疾病,包括心血管疾病和肿瘤等)相关信息进行详细采集。供体应筛查确认无HIV、HBV、HCV、HTLV、HEBV、HCMV和TP感染。

应建立细胞培养的工艺标准、质量标准、储存标准和检验标准,对细胞培养过程中的工艺参数(细胞的培养天数和代次、接种密度、收获密度、培养体积、二氧化碳、温度、湿度、氧气和其他气体参数、刺激条件等)进行详细记录。

使用的间充质干细胞和培养过程中所使用的辅料应符合《人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则(试行)》中的要求。

为保证间充质干细胞外泌体的质量,在外泌体制备前后应严格按照间充质干细胞的质控标准进行细胞质量控制,检验项目包括但不限于细胞形态、无菌性、细胞存活率、标志蛋白、染色体核型和分化潜能等。

6 技术要求

6.1 外泌体制备

外泌体的制备应符合《药品生产质量管理规范》中的要求,在GMP标准的实验室进行,对所涉及的物料、环境、检验、制备、人员等生产全过程进行记录保存。

外泌体应从培养干细胞的条件下培养基中获得。条件培养基应避免外源性外泌体的干扰,不包含相应添加物,例如胎牛血清(FBS或FCS)、血小板裂解物、垂体提取物、胆汁盐等其他复合产品。否则应建立方法,以评估培养基中干扰物所产生的影响。

可采用超速离心、切向流过滤、层析、超滤等方法实现外泌体的提取分离。

6.2 关键质量属性

6.2.1 形态

透射电镜下多呈杯状圆形或类圆形的膜性小囊泡,可见囊泡的双膜性结构,中央为低电子密度成分分布较集中且边界清晰。

6.2.2 粒径

应分布在30-150nm范围内,且在该范围内存在粒径峰值。

6.2.3 标志蛋白

需同时满足以下条件。CD9、CD63以及CD81任意两个表达阳性;Alix、Tsg101任意一个表达阳性;Calnexin、histone 3以及GM130任意两个表达阴性。

6.2.4 颗粒蛋白比

外泌体颗粒数与蛋白量比值不低于 1×10^8 particles/ μ g。

6.2.5 微生物

真菌、细菌、支原体、HIV、HBV、HCV、HTLV、EBV、HCMV、TP、外源病毒因子为阴性。

6.2.6 内毒素

应小于0.5EU/mL。

7 检验方法

7.1 形态

按照透射电镜观察法。

7.2 数量、粒径、浓度

按照纳米流式检测法、纳米颗粒跟踪分析仪或纳米库尔特粒度仪等分析。

7.3 标志蛋白

按照《中华人民共和国药典》通则“免疫印迹法”检测。

7.4 蛋白含量

按照蛋白质定量试剂盒（BCA）检测。

7.5 颗粒蛋白比

按照外泌体颗粒数浓度（particles/mL）与蛋白含量（ $\mu\text{g/mL}$ ）的比值进行计算。

7.6 微生物

7.6.1 总原则

检验方法优先选择现行版《中华人民共和国药典》的方法，若考虑成本、生产量、快速检测等需求，可以采用非药典规定的检验方法（即替代方法），但应进行替代方法的验证，确认其应用效果优于或等同于药典的方法。

7.6.2 真菌

按照《中华人民共和国药典》通则“1101无菌检查法”检测。

7.6.3 细菌

按照《中华人民共和国药典》通则“1101无菌检查法”检测。

7.6.4 支原体

按照《中华人民共和国药典》通则“3301无菌检查法”检测。

7.6.5 HIV

按照《艾滋病和艾滋病病毒感染诊断》（WS293-2019）核酸法检测。

7.6.6 HBV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检测。

7.6.7 HCV

按照《丙型肝炎病毒诊断标准》（WS213-2008）核酸法检测。

7.6.8 HTLV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检测。

7.6.9 EBV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检测。

7.6.10 HCMV

按照《全国临床检验操作规程》核酸法检测。

7.6.11 TP

按照《梅毒诊断标准》（WS273-2007）核酸法检测。

7.6.12 外源病毒因子

按照《中华人民共和国药典》通则“3302外源病毒因子检查法”检测。

7.6.13 内毒素

按照《中华人民共和国药典》通则“1143细菌内毒素检查法”检测。

8 检验规则

8.1 总原则

在一个制备周期中，同一供体、同一组织来源，同一时间、同一工艺制备出来的产品为一批。

8.2 放行检验

8.2.1 每一批产品中随机抽取一定数量最小包装单元进行检验。取样量一般应为检验需求量的2倍。抽样原则根据实际情况可参考《药品抽样原则及程序》（国药监药管〔2019〕34号）制定。

8.2.2 放行检验项目应包括6.2关键质量属性规定的所有项目。

8.2.3 每一批制剂均应进行放行检验，并附检验报告。

8.3 留样

8.3.1 每一批外泌体必须留样，在无菌条件下留取适量外泌体进行留样。留样量至少保证可完成2次相应质量标准的全检。

8.3.2 样本至少保存到产品有效期后一年。

8.3.3 留样的包装形式应当与放行包装形式一致。

8.4 复核检验

根据需要，应有专业检验机构/实验室进行复核检验。

8.5 判定规则

放行检验项目全部符合6.2关键质量属性规定，即判为合格产品；有1项及以上不符合的，则被判为不合格产品。

9 包装、储存和运输

9.1 包装

9.1.1 直接与产品接触的包装材料，应选择低吸附、对外泌体关键质量属性无影响的材料和容器。

9.1.2 直接与产品接触的包装材料应满足无菌、无热原要求。

9.1.3 包装内应附外泌体使用说明，最小包装上应附标签。

9.2 标签

标签应包括以下内容：

- a. 制剂名称；
- b. 外泌体数量；
- c. 来源细胞种类；
- d. 制剂体积；

- e. 生产日期（年、月、日、时、分）；
- f. 生产批号；
- g. 储存条件；
- h. 有效期。

9.3 储存

外泌体应在低于-80℃环境下储存，应避免反复冻融或温度剧烈波动。

9.4 运输

冻存的外泌体应在干冰环境下运输，非冻存的外泌体应在2~8℃条件下运输。

10 废弃物处理

对于制备、检验及研究过程中不合格的外泌体、剩余废弃间充质干细胞或捐赠组织（如供者脂肪、脐带等）的处置，应按照国家 and 地方性法规的要求，交由当地环保部门资质认定的单位进行最终处置。应建立废弃间充质干细胞及外泌体管理文档，严格执行管理规范并详细记录。

中国食品药品企业质量安全促进会

附 录 A
(资料性)
外泌体质量检验报告单

表格编号：

| 申请单号 | | 制备时间 | | 申 请 人 | |
|------|------|----------|------|-------|--|
| 制剂批号 | | 制剂体积 | | 外泌体数量 | |
| 样本类型 | | 样本编号 | | | |
| 序号 | 检验项目 | 标准规定/参考值 | 检验结果 | 结果判定 | |
| 1 | | | | | |
| 2 | | | | | |
| 3 | | | | | |
| 4 | | | | | |
| 5 | | | | | |
| 6 | | | | | |
| 检验结论 | | | | | |
| 主检人 | | 审核人 | | 批准人 | |
| 检验日期 | | 审核日期 | | 批准日期 | |

注：本报告经涂改、增删或未加盖本中心检验报告专用章的复印件均无效

附录 B
(规范性)
外泌体形态检测（透射电镜观察法）

B.1 仪器和设备

B.1.1 120 kv冷冻电镜、移液枪、镊子。

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 2%醋酸双氧铀溶液。

B.3 检测步骤

B.3.1 用电镜专用镊子夹住铜网边缘，注意区分正反面，正面镀有碳膜，样品需加在铜网正面。

B.3.2 将3~5 μL 外泌体（浓度为 1×10^{11} particles/mL）加到铜网正面，吸收30 s后，用纯水清洗3次。

B.3.3 用2%醋酸双氧铀溶液负染1 min。

B.3.4 将铜网向侧面推到滤纸上，除去多余的液体。

B.3.5 使用配备数码相机和图像分析软件的120 kv冷冻电镜进行检测。

中国食品药品质量促进会

附 录 C
(规范性)
外泌体颗粒浓度检测 (纳米流式检测法)

C.1 仪器和设备

C.1.1 纳米流式仪。

C.2 试剂及耗材

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 200nm 聚苯乙烯 (PS) 微球、纳米流式仪浓度标准品 (1.99×10^{10} 个颗粒/mL)。

C.3 检测步骤

C.3.1 按照仪器操作规程进行系统初始化操作,包括液流初始化及管路气泡排尽。

C.3.2 使用200nm 聚苯乙烯 (PS) 微球进行仪器校准,将仪器调整到最佳状态。

C.3.3 将稀释的浓度标准品上机检测,调整检测参数,采集数据。

C.3.4 按照仪器操作规程,使用洗液及超纯水进行毛细管清洗。

C.3.5 将过滤的 ($0.22 \mu\text{m}$) PBS作为背景信号进行分析,颗粒数计数小于 200 的PBS才能作为空白对照的数据采集并用于后续样品稀释。

C.3.6 用洁净的PBS对待测外泌体样品进行10倍梯度稀释,上机检测,在浓度标准品的测量参数下,采集数据。样品的背景基线与空白对照相比没有显著提高,若提高明显,则需进行稀释,同时保证样品颗粒数与空白对照能显著区分。

C.4 结果分析

使用NF Profession软件计算待测样品颗粒浓度。

附录 D
(规范性)
外泌体粒径检测（纳米流式检测法）

D.1 仪器和设备

D.1.1 纳米流式仪。

D.2 试剂及耗材

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 200nm 聚苯乙烯（PS）微球、纳米流式仪S16M-Exo粒径标准品。

D.3 检测步骤

D.3.1 按照仪器操作规程进行系统初始化操作，包括液流初始化及管路气泡排尽。

D.3.2 使用200nm 聚苯乙烯（PS）微球进行仪器校准，将仪器调整到最佳状态。

D.3.3 使用不同尺寸的单分散二氧化硅微球（混合硅球）S16M-Exo粒径标准品上机检测，调整检测参数，采集数据。

D.3.4 按照仪器操作规程，使用洗液及超纯水进行毛细管清洗。

D.3.5 将过滤的（0.22 μm）PBS作为背景信号进行分析，颗粒数计数小于200的PBS才能作为空白对照的数据采集并用于后续的样品稀释。

D.3.6 用洁净的PBS对待测外泌体样品进行10倍梯度稀释，上机检测，在粒径标准品的测量参数下，采集数据。样品的背景基线与空白对照相比没有显著提高，若提高明显，则需进行稀释，同时保证样品颗粒数与空白对照能显著区分。

D.4 结果分析

使用NF Profession软件计算待测样品粒径分布。

附 录 E
(规范性)
外泌体数量及粒径检测 (ZetaView NTA 检测法)

E.1 仪器和设备

E.1.1 ZetaView NTA检测仪。

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 磷酸盐缓冲溶液：pH为7.4。

E.2.2 100nm聚乙烯标准品 (PS)。

E.3 实验步骤

E.3.1 聚苯乙烯 (PS) 标准品的配制：通过两步法进行PS标准品稀释。使用超纯水将100 nm聚苯乙烯标准品配置成高浓度稀释液 (1:1000)，再进一步稀释成低浓度稀释液 (1:250000)。

E.3.2 系统初始化：使用超纯水对仪器流体系统进行冲洗，并通过注射器进样口注水，使注射口和样槽之间的“死容积”充满水，排出气泡。

E.3.3 标准品校准：将新鲜配制的100 nm PS标准品通过注射器推进在进样孔，进行自动校准，将仪器调整到最佳状态。

E.3.4 流体系统冲洗：使用PBS对流体系统进行冲洗，并排出注射口和样槽之间“死容积”内的气泡，使样槽中充满PBS。

E.3.5 待测样本上样，检测：使用注射器在进样孔推进待检测样本，完成检测后自动生成检测报告。

E.4 结果分析

通过仪器Zeta View S/N 252配套Zeta View 8.04.02 SP2对检测结果进行分析，得到待测样品的浓度及粒径检测报告。

附录 F (规范性)

外泌体数量及粒径检测（电阻感应脉冲检测法 库尔特原理）

F.1 仪器设备

F.1.1 纳米库尔特粒度仪。

F.2 试剂

F.2.1 磷酸盐缓冲液：pH为7.4，0.1微米滤膜过滤。

F.2.2 聚苯乙烯浓度标准微球（粒径：100纳米浓度： 1.82×10^{13} 颗粒/毫升）。

F.3 检测步骤

F.3.1 按照仪器测试操作指南，在检测卡的样本槽与稀释液槽各加入200 μ L的磷酸盐缓冲液。测试磷酸盐缓冲液的颗粒数，查看检测卡及芯片的洁净度，颗粒数一分钟小于10个视为整个检测体系洁净无颗粒污染，可开始后续的样本测试。若颗粒数一分钟超过10个，再次使用磷酸盐缓冲液清洗检测卡样本槽并测试，直到颗粒数满足要求。

F.3.2 用磷酸盐缓冲液将浓度标准品稀释1000倍，按照仪器测试操作指南进行测试，采集标准微球颗粒的数目在200个以上即可，得到标准微球浓度。

F.3.3 按照仪器测试操作指南，再次测试空白稀释液，确保将标准微球冲洗干净后，可以测试样本。用洁净磷酸盐缓冲液将外泌体样本预稀释100倍，将稀释后的样本加入检测卡的样本槽，测试外泌体样本。纳米库尔特粒度仪计数在200个以上，且样本的频次（颗粒数/测试时间（s））在0.5-10之间即为准确的数据统计。若样本的频次不在0.5-10之间，需要根据频次调整样本的稀释倍数再进行测试，在测试软件上记录样本最终的稀释倍数，软件自动计算得到样本的原始粒径和浓度。

F.4 结果分析

通过软件Nanocoulter可以保存外泌体样本的测试报告，报告中直接展现样本的粒径和浓度。

附 录 G
(规范性)
外泌体蛋白含量检测 (BCA 检测法)

G.1 仪器和设备

G.1.1 高速离心机、涡旋振荡仪、金属浴、酶标仪。

G.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。

G.2.1 磷酸盐缓冲溶液：pH为7.4。

G.2.2 RIPA组织/细胞裂解液、蛋白定量试剂盒 (BCA法)。

G.3 实验步骤

G.3.1 RIPA裂解外泌体。

G.3.1.1 按照 RIPA 组织/细胞裂解液试剂盒说明书，配置 RIPA 裂解液。

G.3.1.2 裂解液与外泌体 1:1 体积混合，冰上裂解 20 min，期间涡旋 3 次，每次 5 min。

G.3.1.3 裂解完毕，裂解物于 4℃ 离心机中 13000g 离心 5 min，取上清即为蛋白样品。

G.3.2 BCA法测定蛋白浓度。

G.3.2.1 按照蛋白定量试剂盒说明书配置 BCA 工作溶液及标准蛋白溶液。

G.3.2.2 将 25 μL 不同浓度的蛋白标准品及待测样本分别与 200 μL 的 BCA 工作溶液混合，于 60℃ 下反应 30 min。

G.3.2.3 反应结束后，待反应管冷却至室温，通过酶标仪进行微板测定。

G.4 结果分析

酶标仪测定562 nm处标准品及待测样品的OD值，根据标准曲线计算出待测样品蛋白浓度。

附录 H
(规范性)
外泌体表面标志蛋白检测 (免疫印迹法)

H.1 仪器和设备

H.1.1 电泳仪、转膜仪、摇床、化学发光成像系统。

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 磷酸盐缓冲溶液：pH为7.4。

H.2.2 SDS、APS、PAGE、TEMED、甘氨酸、Tris、盐酸、超纯水、甲醇、NaCl、胎牛血清、一抗、二抗。

H.2.3 灵敏化学发光检测试剂盒。

H.3 实验步骤

H.3.1 蛋白变性处理：将外泌体与5×SDS loading buffer蛋白上样液混合，于100℃条件下煮沸10 min，进行蛋白变性。

H.3.2 SDS-PAGE电泳：配置SDS-PAGE凝胶（包括10%分离胶、5%浓缩胶），将SDS-PAGE凝胶放入电泳槽，加入电泳缓冲液，将蛋白Marker及待测样品加入凝胶孔中，调节电泳条件为电压100V，120 min，室温下进行电泳。

H.3.3 转膜：电泳结束后，将切好的胶置于转膜缓冲液中，从负极到正极按海绵、滤纸、膜、胶、滤纸和海绵的顺序安装转膜所需模型，叠好夹紧后放入槽内，加入适量转膜缓冲液，调节转膜条件为电流300 mA，冰浴条件下转膜120 min。

H.3.4 封闭：转膜结束后将PVDF膜取出，浸泡在5%的BSA封闭液中室温封闭1 h。

H.3.5 孵育一抗：封闭结束后，用1×TBST漂洗PVDF膜。使用1% BSA对一抗进行1:1000稀释，将PVDF膜转移至一抗中，4℃下摇床孵育过夜。

H.3.6 洗涤：将孵育完一抗的PVDF膜于TBST中漂洗。

H.3.7 孵育二抗：加入辣根酶标记的二抗（1:10000稀释），避光室温下摇床孵育2 h。

H.3.8 洗涤：将孵育完二抗的PVDF膜于TBST中漂洗，随后用超纯水漂洗PVDF膜，最后置于超纯水中备用。

H.3.9 曝光显色：按照灵敏化学发光检测试剂盒说明书，将显影液A、B液按照1:1的比例混匀，滴于膜上，按照仪器说明书，于化学发光成像系统上曝光观察，采集照片。

参 考 文 献

- [1] Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guider lines.
- [2] Webber J., Clayton A. How pure are your vesicles? J. Extracellular Vesicles 2013;2:19861.
- [3] 国家药品监督管理局食品药品审核查验中心, 细胞治疗产品生产质量管理指南(试行), 2022.
- [4] 《药品抽样原则及程序》(国药监药管〔2019〕34号).
- [5] 原国家食品药品监督管理总局, 细胞治疗产品研究与评价技术指导原则(试行), 2017.
- [6] 国家药品监督管理局药品审评中心, 基因修饰细胞治疗产品非临床研究技术指导原则, 2021.
- [7] 国家药品监督管理局药品审评中心, 人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则(试行), 2023.
- [8] 国家药品监督管理局药品审评中心, 人源性干细胞及其衍生细胞治疗产品临床试验技术指导原则(试行), 2023.
- [9] 国家药品监督管理局药品审评中心, 人源干细胞产品非临床研究技术指导原则(征求意见稿), 2023.
-