

团 体 标 准

T/CEAC 039—2024

干细胞鉴定方法

Stem cell identification methods

2024 - 08 - 15 发布

2024 - 09 - 15 实施



## 目 次

|                    |    |
|--------------------|----|
| 前言 .....           | II |
| 1 范围 .....         | 1  |
| 2 规范性引用文件 .....    | 1  |
| 3 术语和定义 .....      | 1  |
| 4 总则 .....         | 1  |
| 5 形态学鉴定 .....      | 1  |
| 6 分子生物学鉴定 .....    | 2  |
| 7 免疫学鉴定 .....      | 3  |
| 8 功能性鉴定 .....      | 3  |
| 9 鉴定流程 .....       | 4  |
| 10 质量控制与安全防护 ..... | 5  |

## 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。

本文件由武汉卡琳顿科技有限公司提出。

本文件由中国商业经济学会归口。

本文件起草单位：武汉卡琳顿科技有限公司、武汉中科志康生物科技有限公司、中科志康(广州)科学技术有限公司、深圳市中佳生物医疗科技有限公司、广东赛尔生物科技有限公司、河北百龄细胞生物科技有限公司、广西先康达生物科技有限公司、首玺(广州)医疗科技有限责任公司、昆明泉港生物科技有限公司、**天津灏洋华科生物科技有限公司**、深圳市宝迪生物工程有限公司。

本文件主要起草人：曾令文、甄俊杰、黄惠玲、孔惠、孔华英、何海林、刘佳、肖亮、王泰华、史辛艺、杨丽铭、韦艳、方晓、胡鹏男、王宝金、段鑫、**高旭、张嫣、张翠坤**、王亚力、资亚军。

# 干细胞鉴定方法

## 1 范围

本文件规定了干细胞鉴定的总则、形态学鉴定、分子生物学鉴定、免疫学鉴定、功能性鉴定、鉴定流程、质量控制与安全防护。

本文件适用于干细胞的鉴定。

## 2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**干细胞 stem cell**

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。

## 4 总则

4.1 干细胞鉴定可综合运用多种技术手段，包括但不限于形态学观察、分子生物学检测、免疫学分析和功能性评估，以确保鉴定的准确性和可靠性。

4.2 在干细胞鉴定过程中，需遵守实验室生物安全规范，确保人员和环境的安全，避免使用可能对人体或环境造成危害的试剂或设备。

4.3 所有鉴定步骤需遵循标准化的操作流程，以确保实验结果的可重复性和可比性，包括细胞样品的准备、试剂的选择和使用、实验条件的控制以及数据分析的方法等。

4.4 鉴定过程中需严格遵循科学原理，确保实验设计的合理性和数据分析的准确性。同时对实验数据进行充分的统计学处理，以评估鉴定结果的稳定性和显著性。

4.5 鼓励采用新技术、新方法进行干细胞鉴定，以提高鉴定效率和准确性，推动干细胞研究的创新和发展。

## 5 形态学鉴定

### 5.1 鉴定原理

形态学鉴定是通过观察和分析细胞的形态、结构和生长特性，初步判断细胞是否具备干细胞的特征。本方法主要利用显微镜技术来观察细胞的形态特征，以此作为鉴定干细胞的第一步。

### 5.2 仪器与材料

5.2.1 光学显微镜或电子显微镜：用于观察细胞形态。

5.2.2 细胞培养设备及相关试剂：用于细胞的培养和维持。

5.2.3 培养皿或载玻片：用于细胞培养和观察。

5.2.4 染色试剂（如需要）：用于增强细胞结构的可见性。

### 5.3 操作步骤

5.3.1 将待鉴定的细胞群体进行适当的培养和处理，确保细胞处于良好的生长状态。

5.3.2 显微观察：

- a) 将细胞置于显微镜下，先使用低倍镜观察细胞的整体分布情况；
- b) 切换到高倍镜，仔细观察单个细胞的形态、大小和细胞核结构；
- c) 观察细胞质内的颗粒、线粒体等细胞器的分布情况。

5.3.3 形态分析：

- a) 干细胞通常具有较小的体积，核质比较高，细胞核大而明显，核仁清晰可见；
- b) 干细胞呈现出特定的形态，如圆形、椭圆形或多角形，边缘清晰；
- c) 观察细胞分裂相，干细胞具有较高的增殖活性，常可见到分裂中的细胞。

5.3.4 详细记录观察到的细胞形态特征，并拍摄代表性的显微照片作为鉴定依据。

5.4 结果鉴定

根据观察到的细胞形态特征，初步判断哪些细胞具有干细胞的特性。

5.5 注意事项

5.5.1 形态学观察应具有一定的专业经验和技能，以避免误判。

5.5.2 观察时应保持细胞处于最佳的观察状态，避免细胞因处理不当而发生形变。

5.5.3 形态学鉴定应结合其他鉴定方法共同使用，以提高鉴定的准确性和可靠性。

6 分子生物学鉴定

6.1 鉴定原理

分子生物学鉴定是通过检测细胞中的特定基因表达、DNA甲基化模式或其他分子生物学特征，来确认细胞是否为干细胞。该方法能够提供更为精确和可靠的干细胞鉴定结果。

6.2 仪器与材料

6.2.1 PCR 仪：用于扩增特定的 DNA 或 RNA 片段。

6.2.2 实时荧光定量 PCR 仪（qPCR 仪）：用于定量检测基因表达水平。

6.2.3 核酸提取试剂和试剂盒：用于从细胞中提取 DNA 或 RNA。

6.2.4 特异性引物和探针：用于扩增和检测干细胞特定的基因序列。

6.2.5 其他分子生物学实验常用设备和试剂。

6.3 操作步骤

6.3.1 使用核酸提取试剂或试剂盒，从待鉴定的细胞中提取总 DNA 或 RNA。

6.3.2 针对干细胞特异性基因（如 Oct4, Sox2, Nanog 等）设计特异性引物和探针。

6.3.3 使用 PCR 仪对提取的核酸进行扩增，以检测干细胞特异性基因的存在。

6.3.4 使用 qPCR 仪定量检测干细胞特异性基因的表达水平。

6.3.5 根据 PCR 和 qPCR 的结果，分析细胞中干细胞特异性基因的表达情况。

6.4 结果鉴定

通过分子生物学鉴定，可以检测到细胞中干细胞特异性基因的表达情况。如果细胞中这些基因的表达水平显著高于非干细胞，则可以判断这些细胞为干细胞。

6.5 注意事项

6.5.1 分子生物学鉴定需要专业的实验室设备和技术人员进行操作。

6.5.2 在进行实验前，应对所有试剂和设备进行严格的质控和校准。

6.5.3 分子生物学鉴定结果应结合其他鉴定方法（如形态学鉴定、免疫学鉴定等）进行综合判断，以提高鉴定的准确性和可靠性。

6.5.4 实验中应注意生物安全，避免交叉污染和样品混淆。

## 7 免疫学鉴定

### 7.1 鉴定原理

免疫学鉴定是通过检测细胞表面特异性抗原或利用抗体与细胞表面标志物的结合来识别干细胞。该方法对于确认细胞是否为干细胞以及鉴定干细胞的类型和分化状态具有重要意义。

### 7.2 仪器与试剂

7.2.1 荧光显微镜或流式细胞仪：用于观察和检测细胞表面的抗原-抗体结合情况。

7.2.2 特异性抗体：能够识别干细胞表面特异性标志物（如 CD34、CD45、CD90、CD105 等）的抗体。

7.2.3 荧光标记试剂：用于标记抗体的荧光染料，便于观察和检测。

7.2.4 其他常用的免疫学实验设备和试剂。

### 7.3 操作步骤

7.3.1 将待鉴定的细胞进行适当的处理和悬浮，准备成单细胞悬液。

7.3.2 将特异性抗体与细胞悬液混合，使抗体与细胞表面的抗原结合。

7.3.3 去除未结合的抗体，并对细胞进行适当的固定处理。

7.3.4 使用荧光标记试剂对抗体进行标记，便于后续的观察和检测。

7.3.5 利用荧光显微镜或流式细胞仪观察和检测细胞表面的荧光信号，从而确定细胞是否为干细胞。

### 7.4 结果鉴定

通过免疫学鉴定，可以检测到细胞表面特异性抗原的表达情况。根据干细胞表面标志物的不同组合和表达水平，可以确定细胞的类型和分化状态。如果细胞表达特定的干细胞标志物，则可以判断这些细胞为干细胞。

### 7.5 注意事项

7.5.1 免疫学鉴定需要专业的实验室设备和技术人员进行操作。

7.5.2 在进行实验前，应对所有试剂和设备进行严格的质控和校准。

7.5.3 免疫学鉴定结果应结合其他鉴定方法（如分子生物学鉴定等）进行综合判断，以提高鉴定的准确性和可靠性。

7.5.4 实验中应注意生物安全，避免交叉污染和样品混淆。

## 8 功能性鉴定

### 8.1 鉴定原理

功能性鉴定是通过评估细胞的特定功能或能力来验证其是否为干细胞。该方法侧重于检测细胞在体外或体内的分化潜能、自我更新能力以及其对损伤组织的修复能力等，从而确定细胞的干细胞特性。

### 8.2 鉴定方法

#### 8.2.1 体外分化实验

通过特定的诱导条件，观察待鉴定细胞是否能够在体外分化成多种细胞类型（如神经元、心肌细胞、骨细胞等）。实验应包括适当的对照组，并使用显微镜观察、免疫荧光染色、基因和蛋白表达分析等方法来验证分化结果。

#### 8.2.2 克隆形成实验

评估待鉴定细胞的自我更新能力，通常通过单细胞克隆形成实验来进行。观察单个细胞在体外培养条件下是否能形成克隆，并分析克隆的形态和特征。

#### 8.2.3 体内移植实验

将待鉴定细胞移植到免疫缺陷小鼠或其他适当的动物模型中，观察其是否能够在体内形成畸胎瘤或分化成多种组织类型，从而验证其多向分化潜能。

#### 8.2.4 损伤修复实验

评估待鉴定细胞在组织损伤修复中的功能。可以通过在体外模拟损伤环境，或者利用动物模型进行体内实验，观察细胞对损伤的响应和修复能力。

### 8.3 结果鉴定

根据体外分化、克隆形成、体内移植和损伤修复实验的结果，综合评估待鉴定细胞是否具有干细胞的功能特性。如果细胞在多个实验中均表现出干细胞的典型功能，如多向分化潜能和自我更新能力，则可以判断这些细胞为干细胞。

### 8.4 注意事项

- 8.4.1 功能性鉴定需要专业的实验室设备和技术人员进行操作，并应遵守相关的伦理和法规要求。
- 8.4.2 在进行实验前，应对所有试剂和设备进行严格的质控和校准，确保实验结果的准确性和可靠性。
- 8.4.3 功能性鉴定结果应结合其他鉴定方法（如分子生物学鉴定、免疫学鉴定等）进行综合判断，以提高鉴定的准确性。
- 8.4.4 在进行体内移植和损伤修复实验时，应特别注意动物的福利和伦理问题，遵循相关的实验动物管理和使用规定。

## 9 鉴定流程

### 9.1 样品准备与接收

- 9.1.1 按照规定的方法和要求，从供体或实验动物中采集干细胞样品。
- 9.1.2 确保每个样品都有明确的标识，并记录详细的采集信息，如供体信息、采集时间、采集部位等。
- 9.1.3 按照规定的条件保存和运输样品，确保样品的完整性和活性。

### 9.2 样品处理与质量控制

- 9.2.1 根据干细胞类型和鉴定方法的要求，对样品进行适当的处理，如细胞分离、纯化、培养等。
- 9.2.2 对处理过程中的关键步骤进行质量控制，确保处理后的样品符合鉴定要求。

### 9.3 鉴定方法选择

根据干细胞类型和鉴定目的，评估并选择合适的鉴定方法。确保所选方法具有可靠性、准确性和重现性。

### 9.4 鉴定操作

- 9.4.1 按照所选方法的操作步骤进行实验，确保操作的准确性和一致性。
- 9.4.2 详细记录实验过程中的关键步骤、结果和观察，以备后续分析和追溯。

### 9.5 结果分析与判定

- 9.5.1 对实验结果进行观察和分析，记录关键数据。
- 9.5.2 根据所选方法的判定标准，对实验结果进行判定，确定干细胞类型和质量。

### 9.6 报告编制与审核

- 9.6.1 根据实验结果和判定结果，编制详细的鉴定报告。
- 9.6.2 对报告进行内部审核和外部审核，确保报告的准确性和合规性。

### 9.7 样品与资料保存

- 9.7.1 按照规定的条件和期限保存剩余样品，以备后续研究或复查。
- 9.7.2 将实验记录、报告和其他相关资料妥善保存，确保资料的可追溯性和完整性。

## 10 质量控制与安全防护

### 10.1 样品质量控制

- 10.1.1 确保样品的采集、处理和保存符合标准操作程序，避免样品污染、降解或混淆。
- 10.1.2 为每个样品分配唯一标识符，并记录样品的来源、处理过程和存储条件，确保样品的可追溯性。

### 10.2 试剂与设备质量控制

- 10.2.1 使用经过验证的、质量可靠的试剂，避免使用过期或不合格的试剂。
- 10.2.2 定期对使用的设备进行校准和维护，确保设备的准确性和稳定性。

### 10.3 实验操作质量控制

- 10.3.1 制定标准化的操作流程，确保实验操作的准确性和一致性。
- 10.3.2 对实验人员进行定期培训，提高实验操作的熟练度和准确性。
- 10.3.3 详细记录实验过程、结果和任何异常情况，并定期进行实验记录的审计和检查。

### 10.4 数据处理与结果质量控制

- 10.4.1 对实验数据进行验证和复核，确保数据的准确性和可靠性。
- 10.4.2 基于科学原则和标准，对实验结果进行合理解释和判断，避免主观臆断或误导。

### 10.5 伦理与法规遵守

- 10.5.1 在进行干细胞鉴定时，要尊重研究对象的权益和隐私，遵守伦理准则。
- 10.5.2 确保实验活动符合国家法律法规和相关政策规定。

### 10.6 安全防护

- 10.6.1 实验人员需佩戴适当的防护装备，如手套、实验服等，以保护自身安全。
  - 10.6.2 按照相关规定处理实验废弃物，防止对环境造成污染。
-