

ICS 07.080
CCS C 04

DB4403

深 圳 市 地 方 标 准

DB4403/T 122—2020

人源肿瘤细胞系建立技术规范

Technical specification for establishment of human tumor cell lines

2020-11-23 发布

2020-12-01 实施

深圳市市场监督管理局

发布

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 缩略语	3
5 样本获取	3
6 细胞建系	4
7 质量检测	6
附录 A (资料性) 捐赠者基本信息表	9
附录 B (资料性) 肿瘤样本信息表	10
附录 C (资料性) 主要仪器耗材列表	11
附录 D (资料性) 细胞传代操作流程	13
附录 E (资料性) 同工酶分析操作流程	14
附录 F (资料性) 肿瘤细胞特异性标记物列表	16
附录 G (资料性) 台盼蓝染色标准流程	17
附录 H (资料性) 凝集试验操作流程	18
参考文献	19

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。

本文件由深圳市发展和改革委员会归口。

本文件起草单位：深圳华大生命科学研究院、深圳市标准技术研究院。

本文件主要起草人：岳建辉、马启旺、樊阳波、李睿、叶晶晶、黎泽龙、何娜、侯勇、王博、张曦、何旭珩、李启沅、陈振家。

人源肿瘤细胞系建立技术规范

1 范围

本文件确立了人源肿瘤细胞系建立过程中样本获取、细胞建系以及质量检测的操作程序和一般原则。

本文件适用于人源实体肿瘤细胞系相关研究。

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 18467 献血者健康检查要求

YY/T 0588 流式细胞仪

SZDB/Z 238 短串联重复序列基因分型法鉴定人源细胞系技术规范

ISCN 2013 人类细胞遗传学国际命名体制

中华人民共和国药典（三部）（2020年版）

ASN—0003—2015 基于线粒体细胞色素氧化酶亚基1 (CO1) DNA条形码鉴定动物细胞种属 (Species—Level Identification of Animal Cells through Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit 1 (CO1) DNA Barcodes)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

供体 donor

提供肿瘤样本的捐赠者。

3.2

原代细胞 primary cell

直接由获取的人体组织或器官制备形成的细胞。

3.3

细胞系 cell line

由原代细胞群经传代培养获得的细胞群。该细胞群通常是非均质的，且具有明确的特性，可供建库用。

3.4

实体瘤 solid tumor

机体在各种致癌因素作用下，局部组织的细胞在基因水平上失去对其生长的正常调控，导致异常增生而形成的新生物，这种新生物常形成局部肿块。

3.5

平衡盐溶液 balanced salt solution

组织细胞培养时常用的基本液体，可以维持细胞的渗透压、调节pH值以及提供细胞生存所需的无机离子成分，常用于细胞、组织的洗涤。

3.6

密度梯度离心 density gradient centrifugation

用一定的介质（如氯化铯、蔗糖和多聚蔗糖）在离心管内形成一连续或不连续的密度梯度，将细胞混悬液或匀浆置于介质的顶部，通过重力或离心力场的作用使细胞分层、分离的方法。

3.7

倍增时间 doubling time

在细胞培养过程中，对数期中细胞数量增加一倍所需的时间。

3.8

成瘤性 tumorigenicity

细胞接种动物后在注射部位和（或）转移部位由接种细胞本身形成肿瘤能力。

3.9

染色体 chromosome

遗传信息的载体，由DNA、RNA和蛋白质构成的，其形态和数目具有种系的特性。在细胞间期核中，以染色质丝形式存在。在细胞分裂时，染色质丝经过螺旋化、折叠、包装成为染色体，为显微镜下可见的具不同形状的小体。

3.10

同工酶分析 isoenzyme analysis

具有相似或相同特异性的酶，利用琼脂糖凝胶电泳技术，研究细胞裂解过程中同工酶的迁移规律，以获得具有物种特异性的同工酶谱的过程。

3.11

核型分析 karyotype analysis

将待测细胞的染色体按照固有的染色体形态特征和规定，进行配对、编号和分组，并进行形态分析的过程。

3.12

聚合酶链式反应 polymerase chain reaction

通过DNA互补双链解链、退火和聚合延伸的多次循环来扩增DNA特定序列的方法。

3.13

流式细胞术 flow cytometry

对悬液中的单细胞或其他生物粒子，通过检测标记的荧光信号，实现高速、逐一的细胞定量分析和分选的技术。

3.14

免疫荧光技术 immunofluorescence technique

将免疫学方法(抗原抗体特异结合)与荧光标记技术结合起来研究特异蛋白抗原在细胞分布的方法。

3.15

细胞半数致瘤量 50% tumor producing dose

能使50%动物产生肿瘤的最低移植细胞量。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BPV: 牛细小病毒 (Bovine parvovirus)

CMV: 巨细胞病毒 (Cytomegalovirus)

DMSO: 二甲基亚砷 (Dimethyl Sulfoxide)

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

EBV: 人类疱疹病毒四型 (Epstein—Barr virus)

EDTA: 乙二胺四乙酸 (Ethylenediaminetetraacetic 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)

PBS: 磷酸盐缓冲溶液 (Phosphate Buffer Saline)

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

PPV: 猪细小病毒 (Porcine Parvovirus)

RNA: 核糖核酸 (Ribonucleic Acid)

5 样本获取

5.1 伦理审批和知情同意

5.1.1 样本采集前应进行相应的准备工作，严格设计样本采集方案，并按照样本采集方的伦理审查要求对方案的生物安全、伦理以及科学性进行审查。

5.1.2 样本采集应遵循“知情同意、自愿”的原则。工作人员（包括医生、样本操作技术人员等）应与捐赠者沟通，详细讲解项目背景、意义，采集的样本量、用途、潜在风险以及捐赠的权利、义务等，获得捐赠者或者其法定代理人的知情同意。

5.2 信息收集

5.2.1 样本采集前应收集捐赠者信息，包括但不限于姓名、年龄、性别、住院号、病历号等基本信息及既往病史、家族史、用药史、过敏史等临床信息。捐献者基本信息表宜参考附录 A。

5.2.2 样本采集后应详细记录所采集的肿瘤样本信息，包括但不限于样本的采集时间、编号、大小、数量、采集人员等。肿瘤样本信息表见附录 B。

5.2.3 应建立严格有效的样本捐献者信息保护制度，对捐献者健康信息的隐私权加以保护。

5.3 供体筛选

5.3.1 用于肿瘤细胞分离培养的组织应进行筛选，宜排除下列情况的供体：

- 病理类型为混合型；
- 人源特定病毒检测结果不符合 GB 18467 的规定；
- 有精神障碍；
- 伴有其他免疫性疾病，或长期应用免疫抑制剂或激素；
- 医生认为其他不适合情况。

5.4 样本采集前准备

5.4.1 采集前应对样本进行编码，打印合适数量不易脱落、标注清晰的标签。仔细核对捐赠者信息，确定无误后将标签粘贴在无菌的样本采集容器上。

5.4.2 采集前应先准备所需的仪器、试剂和耗材，并确认仪器可以正常使用。主要仪器、耗材清单见附录 C。

5.5 样本采集

5.5.1 实体瘤样本

5.5.1.1 样本应首先满足捐赠者的诊断和治疗需求，剩余样本才能用于建立肿瘤细胞系。

5.5.1.2 应采集具有典型生物学特征的肿瘤组织、癌旁组织和正常组织，实体瘤样本的直径宜不低于 5 mm。

5.5.2 胸腹水样本

当胸腹水样本中存在较多肿瘤细胞时，可在无菌条件下抽取胸腹水，采集量宜不低于 20 mL。

5.6 样本保存与运输

5.6.1 实体瘤样本应保存于含 400 IU/mL 抗生素的培养基中。胸腹水样本可直接收集至样本保存瓶。

5.6.2 实体瘤样本保存和运输时间应不超过 12 h，运输温度 4℃~10℃。胸腹水样本处理保存与运输时间应不超过 2 h。

6 细胞建系

6.1 细胞分离

6.1.1 总则

实体瘤样本宜选择组织块法或酶消化法进行原代细胞分离。

6.1.2 组织块法

6.1.2.1 充分去除血液、脂肪、神经组织及坏死组织，加入 4℃平衡盐溶液清洗肿瘤组织。

6.1.2.2 宜采用无菌眼科剪将肿瘤组织切成 1 mm³~2 mm³大小的组织块。

6.1.2.3 将约 20 个组织块转移至 T25 细胞培养瓶中，轻轻翻转培养瓶使其底部朝上，置于 37℃、5%浓度二氧化碳培养箱中培养 2 h~4 h。

6.1.2.4 将培养瓶轻轻平放，加入完全培养基，置于培养箱中继续培养。

6.1.3 酶消化法

6.1.3.1 充分去除血液、脂肪、神经组织及坏死组织，加入 4℃平衡盐溶液清洗肿瘤组织。

6.1.3.2 采用无菌眼科剪将肿瘤组织切成 1 mm³~2 mm³大小的组织块。

6.1.3.3 加入 1 mL~3 mL 0.25%胰蛋白酶或 200 IU/mL 胶原蛋白酶，37℃水浴震荡消化 0.5 h~1 h，或 4℃过夜消化。

6.1.3.4 加入 3 mL~5 mL 完全培养基终止消化，采用孔径 100 μm 的细胞筛网过滤，收集细胞悬液并计数。

6.1.3.5 以 4℃，200 g~300 g 的转速离心 5 min~10 min 后，除去上层清液，加入适量完全培养基，调整细胞密度至 0.5~1×10⁶/mL，接种至培养瓶中，置于 37℃，5%浓度二氧化碳培养箱内进行培养。

6.1.4 胸腹水样本宜采用直接离心法，以 4℃，300 g~500 g 的转速离心 5 min~10 min，收集肿瘤细胞后直接进行培养。

6.2 细胞培养

6.2.1 肿瘤细胞培养初期，培养瓶应轻拿轻放，避免组织块和细胞脱落。

6.2.2 细胞培养 12 h~72 h，待细胞贴壁后进行首次换液，去除脱落的组织块和未贴壁细胞。

6.2.3 每隔 2~3 天换液，通过显微镜观察记录细胞生长状态。待细胞融合度达到 80%以上时，可进行细胞纯化和传代。

6.3 细胞纯化

6.3.1 肿瘤细胞的纯化宜采用机械刮除法、反复贴壁法、消化排除法、密度梯度离心法中的一种或多种方法联合。

6.3.2 机械刮除法

6.3.2.1 显微镜下观察细胞，采用标记笔在培养瓶背面标记具有典型生物学特征的肿瘤细胞生长区域。

6.3.2.2 弃掉培养液，显微镜下采用无菌细胞刮刮除无标记区域的杂细胞；采用平衡盐溶液清洗杂细胞，加入培养液继续培养。

6.3.3 反复贴壁法

6.3.3.1 宜依据附录 D 细胞的传代操作流程中的步骤 E.3.1—E.3.6 收集细胞，接种至新的培养瓶中培养 5 min~20 min。

6.3.3.2 收集未贴壁的肿瘤细胞悬液，接种至新的培养瓶中培养 5 min~20 min。

6.3.3.3 重复步骤 6.3.3.2 1~3 次，收集最后一次肿瘤细胞悬液，接种至新培养瓶中培养。

6.3.4 消化排除法

6.3.4.1 针对不同类型的细胞,采用 50 IU/mL~200 IU/mL 不同亚型的胶原酶或 0.05%~0.25%的胰蛋白酶对细胞进行消化处理,显微镜下观察,待杂细胞脱落后终止消化。

6.3.4.2 采用平衡盐溶液清洗处理后,更换完全培养基继续培养,若杂细胞未被除净,宜再次重复处理。

6.3.5 密度梯度离心法

6.3.5.1 宜参考 6.3.3.1 步骤收集细胞,加入至比重 1.025~1.085 的细胞分离液中,以 20 °C, 800 g 的转速离心 10 min。

6.3.5.2 离心后收集比重 1.050~1.085 的肿瘤细胞层,清洗 2~3 次后,加入完全培养基重悬细胞,接种至新培养瓶中培养。

6.4 细胞传代

肿瘤细胞系传代宜参考附录D。

6.5 细胞冻存

6.5.1 细胞数目达到 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 后,宜依据附录 D 的步骤 D.3.1~D.3.7 进行细胞收集和计数。

6.5.2 加入含 10%~15%二甲亚砜(DMSO)的完全培养基,调整细胞密度至 $1 \times 10^6 / \text{mL} \sim 1 \times 10^7 / \text{mL}$ 。

6.5.3 将肿瘤细胞按 1 mL/管分装至细胞冻存管中,管壁粘贴唯一编码标签。

6.5.4 冻存管宜放入程序降温盒中,置于-80 °C 冰箱过夜。亦或遵循程序降温原则采用程序降温仪将细胞梯度降温至-80 °C。亦或将细胞置于含速冻保存液的微毛细管中,直接放置于液氮保存。降温完成后应转移细胞至液氮中长期存储。

7 质量检测

7.1 生物学属性检测

7.1.1 细胞鉴别

7.1.1.1 种属鉴定

宜采用脱氧核糖核酸(DNA)条形码分析或同工酶法。DNA条形码分析宜参考ASN—0003—2015,同工酶法检测宜参考附录E。

7.1.1.2 细胞系/株间特性鉴定

宜参考SZDB/Z 238对细胞系/株间特性进行鉴定。

7.1.1.3 细胞专属特性

宜采用各肿瘤细胞系特异性的标记物,通过流式细胞术进行检测,常见肿瘤细胞系特异性标记物列表见附录F。细胞流式分析前处理宜依据特异性抗体说明书进行,流式细胞仪操作宜参考YY/T 0588。

7.1.2 细胞存活率

7.1.2.1 细胞存活率宜采用台盼蓝染色法,通过手动计数或自动细胞计数仪进行检测。手动计数检测细胞存活率宜参考附录 G,自动计数仪检测细胞存活率宜依据仪器检测说明书进行。

7.1.2.2 肿瘤细胞系冻存前的存活率应不低于 90%。复苏后的细胞存活率应不低于 80%。

7.1.3 细胞纯度

细胞纯度可采用流式细胞术或细胞免疫荧光染色法,通过检测细胞特异性标记物的阳性表达率进行检测。流式细胞术检测操作宜参考YY/T 0588;细胞免疫荧光检测操作宜依据荧光抗体使用说明书进行。肿瘤细胞系任意单个标记物阳性率应不低于90%,任意双标记物共阳性率应不低于80%。

7.1.4 倍增时间

7.1.4.1 新建肿瘤细胞系宜进行细胞倍增时间检测。

7.1.4.2 细胞倍增时间宜参考《中华人民共和国药典(三部)》(2020年版)“生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制”关于群体倍增水平计算的规定进行检测,并记录于细胞生物学特征档案。

7.1.5 凝集试验

肿瘤细胞系凝集试验宜参考附录H。

7.1.6 染色体核型分析

宜依据ISCN 2013建立的G显带法或Q显带法对细胞染色体进行分析和描述,并记录于细胞生物学特征档案。

7.1.7 成瘤性试验

7.1.7.1 新建细胞系应进行成瘤性检测。

7.1.7.2 成瘤性检测宜依据《中华人民共和国药典(三部)》(2020年版)“生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制”实施。

7.1.7.3 对检测后具有成瘤性的肿瘤细胞,需采用定量的方法进一步分析细胞成瘤性的大小,并计算该细胞的半数致瘤量(TPD50)。

7.2 安全性检测

7.2.1 无菌检测

7.2.1.1 细胞系在冻存前应进行无菌检测。

7.2.1.2 无菌检测可依据《中华人民共和国药典(三部)》(2020年版)通则 1101 中规定的方法实施。

7.2.1.3 肿瘤细胞系的无菌检测结果应为阴性。

7.2.2 支原体检测

7.2.2.1 细胞系在冻存前应进行支原体检测。

7.2.2.2 宜采用经批准的基于聚合酶链式反应(PCR)扩增原理的支原体检测试剂盒,按照说明书对肿瘤细胞系进行支原体检测。

7.2.2.3 细胞系的支原体检测结果应为阴性。

7.2.3 内、外源病毒因子检测

7.2.3.1 使用含牛源和猪源生物制品而新建的细胞系应进行人类EBV、HBV、HCV、HIV—1、HIV—2、HTLV—1、HTLV—2、CMV、PPV 和 BPV 的检测。

7.2.3.2 宜依据《中华人民共和国药典（三部）》（2020年版）通则 3306 对人源病毒因子 HIV—1/2、HBV、HCV 进行检测；宜采用经批准的基于酶联免疫法检测的酶联免疫试剂盒对 HTLV—1/2、EBV、CMV 进行检测。

7.2.3.3 宜采用经批准的基于酶联免疫法检测的酶联免疫试剂盒对猪细小病毒或牛细小病毒进行检测。

7.2.3.4 除特殊研究要求外（如研究材料即为携带致病因子的细胞），细胞系内与外源病毒因子检测应均为阴性。

附 录 A
(资料性)
捐赠者基本信息表

表A.1给出了捐赠者基本信息表。

表 A.1 捐赠者基本信息表

姓名:	住院登记号:	病理号:
年龄:	性别:	
联系地址:		
联系电话:	邮编:	
吸烟史(年):	吸烟(支/日):	
饮白酒史(年):	饮白酒(两/日):	
病史:	药物过敏史:	
家族疾病史:	用药史:	
简要病情及手术原因介绍:		
术前治疗:		
手术名称:		
手术时间:	年 月 日	时 分
切除部位:	组织切除量:	
手术情况记录:		
手术医生签名:	随同手术人员签名:	
家属确认签名:	日期:	年 月 日 时
病理描述及拍照(附照片):		
病理医生签名:	日期:	年 月 日 时 分
组织样本交接情况:		
交接人:	日期:	年 月 日

附 录 B
(资料性)
肿瘤样本信息表

表B. 1给出了肿瘤样本信息表。

表 B. 1 肿瘤样本信息表

捐赠者基本信息			
捐赠者姓名		捐赠者 ID	
性别	<input type="checkbox"/> 男 <input type="checkbox"/> 女	出生日期	
样本收集与处理信息			
样本类型		样本编号	
采样日期		样本采集人员	
样本采集量			
处理方法	(温度、操作):		
处理开始时间		处理完成时间	
样本信息			
样本编码	肿瘤类型 (T 或 N)	取材数量	组织质量(A 或 B 或 C)
运输保存			
保存条件		保存温度	
运输方式		运输时间	
备注			
<p>注 1: 捐赠者 ID 以肿瘤类别 (两位数) + 年份 (四位数) + 流水号 (四位数) + 组成样本编码, 应隐匿捐赠者姓名。</p> <p>注 2: 样本类型, 宜根据 NIH 的病例检索标准进行填写。</p> <p>注 3: 肿瘤类型, 用 T 和 N 代表肿瘤及正常, T 及 N 后面的数字表示取材份数。</p> <p>注 4: 组织质量用 A、B、C 表示 (A=无明显坏死、B=散在坏死、钙化, C=大量坏死)。</p>			

附 录 C
(资料性)
主要仪器耗材列表

表C.1给出了主要仪器列表，表C.2给出了主要耗材列表。

表 C.1 主要仪器列表

阶段	仪器名称	用途
样本采集	低温标签制作套装	打印标签
	冷藏冰箱 (2℃~8℃)	样本暂存
细胞建系	冷藏冰箱 (2℃~8℃)	样本暂存
	低温标签制作套装	制作标签
	条码扫描器	扫描条码
	冷冻离心机 (-20℃~40℃; 最高离心力达15000g 以上)	样本离心
	生物安全柜	操作平台
	移液器 (10μL、100μL、1000μL)	细胞处理与转移
细胞冻存	冻存架	放置冻存盒
	-80℃冰箱	部分样本储存
	液氮罐	部分样本储存

表 C.2 主要耗材列表

阶段	耗材名称	用途
样本采集	无菌医用手套 (无粉)	个人防护
	棉签	消毒
	采血管	采血容器
	采血针	穿刺
	眼科剪	组织样本剪碎
	组织剪	组织样本分离
	组织镊	组织样本分离
	医用无菌注射器	胸腹水的抽取
	手术刀	组织切除
	标签	样本标识
	医用口罩	个人防护

表 C.2 (续)

阶段	耗材名称	用途
细胞建系	离心管	样本细胞的收集
	移液管	细胞悬液及培养液的转移
	培养瓶	细胞培养
	细胞刮	细胞的刮除和纯化
	眼科剪	组织样本剪碎
	组织镊	组织样本分离
细胞冻存	冻存管	储存样本
	冻存盒	放置冻存管
	程序降温盒	样本的程序性降温

附 录 D
(资料性)
细胞传代操作流程

D.1 仪器

倒置荧光显微镜、二氧化碳培养箱(温度: 5℃~65℃, 容积不小于80 L)、离心机(温度: -20℃~40℃, 最高离心力达15 000 g以上)、生物安全柜、细胞计数仪、移液枪(10 μL, 100 μL, 1 000 μL)。

D.2 试剂耗材

底面积75 cm²的细胞培养瓶、细胞培养基、胎牛血清、青/链霉素、胰蛋白酶、平衡盐溶液、离心管、移液管、75%酒精、无尘布、棉球、封口膜、废液缸。

D.3 贴壁细胞工作程序

D.3.1 用50 mL离心管, 收集细胞培养液, 并用平衡盐溶液清洗细胞1~2次, 以免剩余培养液影响胰蛋白酶活性。

D.3.2 向瓶内加入1 mL消化液(含0.05%~0.25% Trypsin—EDTA), 置于37℃下进行消化1 min~3 min, 消化期后把培养瓶放在倒置显微镜下进行观察, 当发现胞质回缩、细胞间隙增大后, 立即终止消化。

D.3.3 向细胞培养瓶内用移液管加入等体积的收集的细胞培养液, 混匀终止消化。

D.3.4 使用吸管, 吸取瓶内培养液, 按顺序反复轻轻吹打瓶壁细胞, 使之从瓶壁脱离形成细胞悬液。

D.3.5 用吸管转移细胞悬液至离心管中, 以300 g~500 g转速离心5 min。

D.3.6 去掉细胞上清液, 加入适量平衡盐溶液清洗细胞2~3次, 采用台盼蓝染色进行细胞计数和检活。

D.3.7 去掉细胞上清液, 在离心管中加入3 mL完全培养液, 并反复吹打细胞, 制成细胞悬液。

D.3.8 调整细胞密度, 按照5 000/cm²~6 000/cm²密度接种细胞至细胞培养瓶, 于37℃, 5%浓度二氧化碳培养箱中进行培养。

D.3.9 根据细胞生长的状态进行换液。一般2~3天后应换一次培养液。待细胞长至85%以上融合度, 可继续传代扩大培养。

附 录 E
(资料性)
同工酶分析操作流程

E.1 仪器

二氧化碳培养箱(温度: 5℃~65℃, 容积不小于80 L)、高速冷冻离心机(温度: -20℃~40℃; 最高离心力达15 000 g以上)、生物安全柜、细胞计数仪、凝胶电泳槽、漩涡混匀仪、多层滤纸、割胶器、电子天平(0.1 mg~220 g)、4℃冰箱、pH计(分辨率: 0.001 pH; 玻璃电极)、微波炉、多用电泳仪(10 V~300 V)。

E.2 试剂配制

E.2.1 细胞裂解液

Tris 0.303 g, 乙二胺四乙酸(EDTA) 0.0186 g, 质量分数2% TritonX-100, 加水定容至50 mL, 盐酸(HCl)调pH至7.5, 4℃保存。

E.2.2 巴比妥缓冲液

巴比妥钠10.3 g, 巴比妥1.84 g, 加水定容至1000 mL, 4℃保存。

E.2.3 乳酸脱氢酶(LDH)显色底物

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD) 5 mg, 噻唑蓝溴化四唑(MTT) 2 mg, 吩嗪硫酸甲酯(PMS) 0.4 mg, 1 mol/L乳酸钠1 mL, 0.1 mol/L氯化钠(NaCl) 0.5 mL, 0.5 mol/L的三羟甲基氨基甲烷—盐酸(Tris—HCl) (pH 8.0) 1.5 mL, 加水定容至10 mL。

E.2.4 葡萄糖—6—磷酸脱氢酶(G6PD)显色底物

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP) 3 mg, 噻唑蓝溴化四唑(MTT) 2 mg, 吩嗪硫酸甲酯(PMS) 0.4 mg, 葡萄糖—6—磷酸脱氢酶(G6PD) 50 mg, 氯化镁(MgCl₂) 10 mg, 0.5 mol/L的三羟甲基氨基甲烷—盐酸(Tris—HCl) (pH 8.0) 2 mL, 加水定容10 mL。

E.2.5 核苷酸磷酸脱氢酶(NP)显色底物

肌苷20 mg, MTT 2 mg, PMS 0.4 mg, 黄嘌呤氧化酶0.3 unit, 0.1 mol/L Na₂HPO₄ 1 mL, 0.5 mol/L Tris—HCl (pH 7.5) 1 mL, 加水定容至10 mL。

E.2.6 琼脂糖凝胶

琼脂糖0.8 g, EDTA 0.035 g, 巴比妥缓冲液100 mL加热溶化。

E.3 检测程序

E.3.1 细胞同工酶的提取

E. 3. 1. 1 将待检肿瘤细胞系、人源标准参考细胞系分别在培养瓶中培养，当生长至铺满瓶底时，吸出培养基。

E. 3. 1. 2 采用磷酸盐缓冲溶液（PBS）清洗细胞单层，加1 mL胰蛋白酶，37 °C温箱消化至细胞脱壁，加2 mL含10%小牛血清的细胞培养基终止胰蛋白酶的作用，并将其转移至无菌离心管。

E. 3. 1. 3 300 g离心10 min，弃去上清，加1 mL PBS吹打均匀，快速离心，吸干残留PBS。

E. 3. 1. 4 估算细胞的体积，加等体积的细胞裂解液，室温反应2 min~3 min，冰上反应30 min，4 °C，5 000 g~8000 g离心5 min，吸出上清移至新的EP管，-20 °C保存。

E. 3. 2 琼脂糖凝胶制备

E. 3. 2. 1 将2片0.175 mm厚的市售透明胶片夹在两块胶槽中间，用文件夹将胶槽和胶片固定在一起。

E. 3. 2. 2 将琼脂糖凝胶用注射器缓缓从胶槽上的小孔注入胶槽与胶片之间，注入凝胶时注意避免气泡的产生，并使凝胶均匀的分布在胶片上，待凝固后放4 °C预冷后使用。

E. 3. 3 电泳

E. 3. 3. 1 小心将凝胶剥离胶板，将载有凝胶的胶片放入电泳槽内，然后将细胞裂解上清液按照每孔1 μL~3 μL/孔加到入样孔中，静置30 s使样品完全被凝胶吸收后，注入电泳液。

E. 3. 3. 2 乳酸脱氢酶电泳电压为95 V，电泳时间为1.5 h；葡萄糖—6—磷酸脱氢酶电泳电压为90 V，电泳时间为1 h；核苷酸磷酸脱氢酶电泳电压为85 V，电泳时间为1 h。为保证同工酶的活性，电泳过程均在冰浴上进行。

E. 3. 4 显色

E. 3. 4. 1 停止电泳后，取出凝胶胶片，放置在暗盒内，注入3 mL~5 mL对应底物的显色液，37 °C反应20 min~25 min。

E. 3. 4. 2 酶谱出现后，在清水中清洗胶片2~3次，用滤纸吸去胶片上的残留水分即可拍照。

E. 4 判定标准

E. 4. 1 若待检细胞与标准参考细胞的三种同工酶条带数目均相同，且条带的迁移距离与标准参考细胞相同，则判定待检细胞系为同一种属细胞系。

E. 4. 2 若待检细胞与标准参考细胞的三种同工酶条带数目相同，但条带的迁移距离与标准参考细胞不同，判定待检细胞系为不同种属细胞系。

E. 4. 3 若待检细胞与标准参考细胞的三种同工酶条带数目不同，判定待检细胞系存在种属间细胞交叉污染。

附 录 F
(资料性)
肿瘤细胞特异性标记物列表

表F. 1给出了肿瘤细胞特异性标记物列表。

表 F. 1 肿瘤细胞特异性标记物列表

肿瘤细胞系种类	细胞特异性标记物
肺癌细胞	CYFRA 21—1、NSE、SCC、CEA、CA50 均应表达
肝癌细胞	AFP、AFU、CEA、CA19—9 均应表达
结直肠癌细胞	CEA、Ki67、CK20、CK7、CA19—9、CA50 均应表达
乳腺癌细胞	CA15—3、CEA、CA125 均应表达
卵巢癌细胞	CA125、CEA、CA72—4、 β —HCG、AFP 均应表达
宫颈癌细胞	CEA、CA72—4 均应表达
子宫癌细胞	CEA、SCC、SF、 β —HCG 均应表达
胃癌细胞	CEA、CA72—4、CA19—9 均应表达
黑色素细胞	S—100、NKI—C3、HMB—45 均应表达
前列腺癌细胞	PAP、PSA、F—PSA 均应表达
胰腺癌细胞	HCG、CEA、AFP 均应表达

附 录 G

(资料性)

台盼蓝染色标准流程

G.1 仪器

显微镜、玻片、盖玻片、滴管。

G.2 试剂耗材

0.4%台盼蓝染液、生理盐水、血细胞计数板。

G.3 检测原理

台盼蓝是组织和细胞培养中最常用的死细胞鉴定染色方法之一。正常的活细胞,由于胞膜结构完整,能够排斥台盼蓝,使之不能够进入胞内。而丧失活性或细胞膜不完整的细胞,胞膜的通透性增加,可被台盼蓝染成蓝色。通常认为细胞膜完整性丧失,即可认为细胞已经死亡。因此,借助台盼蓝染色可以非常简便、快速地区分活细胞和死细胞。台盼蓝染色后,通过显微镜下直接计数或显微镜下拍照后计数,就可以对细胞存活率进行比较精确的定量。

G.4 检测步骤

G.4.1 对于悬浮细胞,离心收集细胞,充分清洗后,用适当缓冲液如 PBS,重悬制成单细胞悬液。对于贴壁细胞,先用胰酶消化细胞,再按照悬浮细胞的方法制备单细胞悬液。

G.4.2 取0.5 mL单细胞悬液,按照1:1比例与0.5 mL浓度为0.4%的台盼蓝染色液充分混匀,室温染色 3 min~10 min。

注1:因台盼蓝具有细胞毒性,染色时间过久会导致部分死细胞染色,干扰计数。

注2:若细胞密度比较高,可取 0.2 mL 单细胞悬液,经适当缓冲液稀释到 0.5 mL,之后再取 0.5 mL 浓度为 0.4%的台盼蓝染色液染色。

G.4.3 取少量上述染色细胞加入血细胞计数板,于显微镜低倍镜下计数,分别计算着色细胞(即损伤细胞和死细胞)和总细胞。

注1:用移液枪加染色细胞时,沿着盖玻片的边缘轻轻加液使其完全覆盖住整个小室。

注2:1mm²方格内细胞数通常控制在 20—50 个,若细胞数超过 200 个,需重新调整稀释倍数。

G.4.4 细胞数目的计算见公式(G.1)。

$$N = C \times V \quad \dots\dots\dots (G.1)$$

其中:

$$C = M \times D \times 10^4 \quad \dots\dots\dots (G.2)$$

式中:

- N——细胞数目（个）；
- C——细胞浓度（个/mL）；
- V——细胞悬液体积（mL）；
- M——细胞计数板单个方格的平均细胞数（个）；
- D——稀释倍数。

G. 4.5 细胞活率的计算见公式（G.3）。

$$Vi = (N_{\text{总}} - N_{\text{着色}}) / N_{\text{总}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (G.3)$$

式中：

- $N_{\text{总}}$ ——总细胞数（个）；
- $N_{\text{着色}}$ ——总着色细胞数（个）。

附录 H

(资料性)

凝集试验操作流程

H.1 仪器

二氧化碳培养箱（温度：5℃～65℃，容积不小于80L）、离心机（温度：-20℃～40℃；最高离心力达15 000 g以上）、生物安全柜、细胞计数仪、凹孔板。

H.2 试剂耗材

75 cm²细胞培养瓶、肿瘤细胞培养基、胎牛血清、青/链霉素、胰蛋白酶、生理盐水、刀豆蛋白。

H.3 检测程序

H.3.1 肿瘤细胞系凝集试验设计包括空白对照组、肿瘤细胞系的试验组和人成纤维细胞的阴性对照组。刀豆蛋白浓度梯度包括0 μg/mL、12.5 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL。

H.3.2 取生长状态良好的肿瘤细胞，采用传统胰酶消化的方法收集细胞，调整细胞密度为 1×10^5 个/mL。

H.3.3 向若干凹孔板凹中加细胞悬液，每凹孔加0.1 mL，再分别加入刀豆蛋白—PBS溶液0.1 mL，使刀豆蛋白的最终浓度依次为：100 μg/mL、50 μg/mL、25 μg/mL、12.5 μg/mL和0 μg/mL（对照）；

H.3.4 置微型振荡器上振荡混匀，静止5 min～10 min，观察凝集现象。

H.4 判断标准

H.4.1 若空白对照和阴性对照组在刀豆蛋白低浓度（小于50 μg/mL）均无凝集现象产生，判断该试验有效；

H.4.2 在试验有效的前提下，观察肿瘤细胞系检测组发生凝集反应的刀豆蛋白浓度，记录试验数据并拍照保存。

参 考 文 献

- [1] 《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）—CFDA》，2015.
- [2] 《中国人类遗传资源实体瘤永生细胞系建立技术规程》（讨论稿），2007.
- [3] 郭建华, 张吉才, 李晓强, 等. 胸腹水细胞学前检查各环节因素分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(3):315—317.
- [4] 蒋敬庭, 张学光. 肿瘤细胞的分离与纯化研究进展[J]. 医学综述, 2009, 15(4):522—524.
- [5] 杨永强, 张巧玲. Ficoll密度梯度离心法分离腹水单个核细胞方法的优化[J]. 中外医学研究, 2013(20):144—145.
- [6] 章静波, 陈实平, 刘玉琴. 人肿瘤细胞培养[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [7] Agarwal S, Rimm D L. Making Every Cell Like HeLa : A Giant Step For Cell Culture[J]. American Journal of Pathology, 2012, 180(2):443—445.
- [8] Ahmed D, Eide P W, Eilertsen I A, et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines[J]. Oncogenesis, 2013, 2(9):e71.
- [9] ANSI/ATCC, Authentication of Human Cell Lines: Standardization of STR Profiling . 2011, ASN—0002—2011.
- [10] Barretina J, Caponigro G, Stransky N, et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. [J]. Nature, 2012, 483(7391):603.
- [11] Carney D N, Gazdar A F, Bepko G, et al. Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features[J]. Cancer Research, 1985, 45(6):2913—23.
- [12] Cayrefourcq L, Mazard T, Joosse S, et al. Establishment and characterization of a cell line from human circulating colon cancer cells[J]. Cancer Research, 2015, 75(5):892—901.
- [13] Dangles—Marie V, Pocard M, Richon S, et al. Establishment of human colon cancer cell lines from fresh tumors versus xenografts: comparison of success rate and cell line features[J]. Cancer research, 2007, 67(1): 398—407.
- [14] Duffy M J. Tumor Markers in Clinical Practice: A Review Focusing on Common Solid Cancers[J]. Medical Principles & Practice, 2013, 22(1):4—11.
- [15] Hanahan D, Weinberg R A. The hallmark of cancer[J]. Cell, 2000, 100:57—71.
- [16] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. cell, 2011, 144(5): 646—674.
- [17] Hidalgo M, Amant F, Biankin A V, et al. Patient Derived Xenograft Models: An Emerging Platform for Translational Cancer Research[J]. Cancer Discovery, 2014, 4(9):998—1013.
- [18] Katz E. Niche—dependent tumorigenic capacity of malignant ovarian ascites—derived cancer cell subpopulations. [J]. Clinical Cancer Research, 2009, 15(1):70—80.
- [19] Liu T, Xu F, Du X, et al. Establishment and characterization of multi—drug resistant, prostate carcinoma—initiating stem—like cells from human prostate cancer cell lines 22RV1[J]. Molecular & Cellular Biochemistry, 2010, 340(2):265—273.
- [20] Malati T, Malati T. Tumor markers: An overview[J]. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 2007, 22(2):17—31.