



广州赛莱拉干细胞科技股份有限公司
Guangzhou SALIAI Stemcell Science and Technology Co.,LTD

细胞质量评价报告

ASSESSMENT REPORT FOR CELL QUALITY

Report No.: SLL2018QA00018

细胞名称： 人 脐带间充质干细胞
Cell Name

细胞编码： P15QD00040
Cell Number

细胞代次： P5
Number of cell passage

检测地点： 广州赛莱拉干细胞科技股份有限公司实验室
Test Address

地 址：中国广东省广州国际生物岛螺旋四路一号生产区五楼 502 单元 Address：
Room 502 ,Production Area#1, Luo Xuan Fourth Road, Guangzhou
International Bio-island, China.

邮政编码：510005

Postcode：510005

电话号码：020-37792600

Tel：020-37792600

目 录

1. 细胞形态检查	2
2. 细胞表面抗原检查	3
3. 细胞多向分化能力检查	6
3.1 细胞成骨诱导分化能力检查	6
3.2 细胞成脂诱导分化能力检查	12
4. 质量评价	14

1. 细胞形态检查

1.1 主要检测设备

设备名称	型号	编号
倒置显微镜	AE2000	SLL-SC-XWJ-004
细胞培养箱	INC153	SLL-SC-PYX-004

1.2 主要检测试剂

1.2.1 细胞培养液：DMEM/F12 基础培养基中加入 10%FBS，1% L-Glutamine，1% MEM NEAA，1% Penicillin-Streptomycin。

1.2.2 细胞消化液：含 0.02%EDTA 溶液的 0.25%胰蛋白酶溶液，无菌。

1.2.3 细胞清洗液：由 16.0g NaCl，0.4g KCl，2.88g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 0.48g KH_2PO_4 ，溶解于 2L 蒸馏水中配制而成，121℃ 高压条件下，灭菌 30min，分装备用。

1.3 检测方法

MSCs 常规培养，倒置显微镜下观察细胞形态并采集图像。

1.4 检测时间

2015 年 11 月 20 日到 2015 年 11 月 20 日

1.5 检测结果及分析

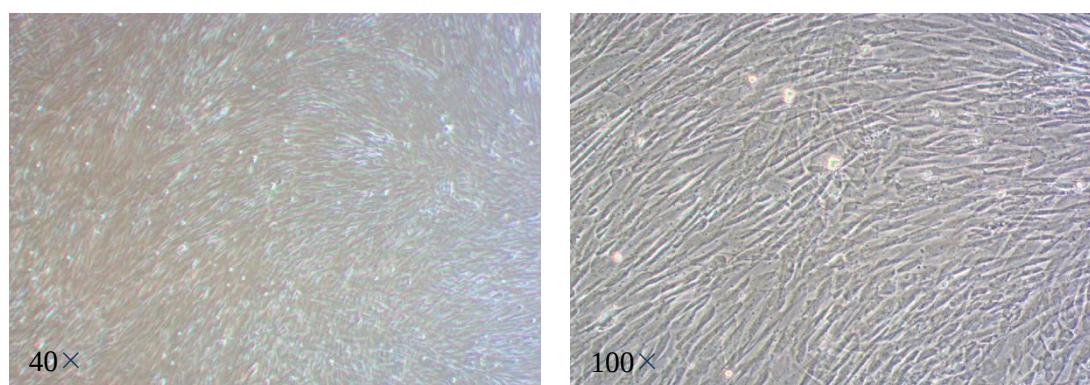


图 1 细胞形态检查结果

如图 1 所示，倒置显微镜下观察，可见细胞形态均一、大小一致，折光性强，长梭形，呈放射状整齐排列生长。

2. 细胞表面抗原检查

2.1 主要检测设备

设备名称	型号	编号
倒置显微镜	AE2000	SLL-SC-XWJ-004
细胞培养箱	INC153	SLL-SC-PYX-004
流式细胞仪	BD C6	SLL-SC-LSY-001

2.2 主要检测试剂

2.2.1 细胞培养液：DMEM/F12 基础培养基中加入 10%FBS，1% L-Glutamine，1% MEM NEAA，1% Penicillin-Streptomycin。

2.2.2 细胞消化液：含 0.02%EDTA 溶液的 0.25%胰蛋白酶溶液，无菌。

2.2.3 细胞清洗液：由 16.0g NaCl，0.4g KCl，2.88g Na₂HPO₄•2H₂O 和 0.48g KH₂PO₄，溶解于 2L 蒸馏水中配制而成，121℃ 高压条件下，灭菌 30min，分装备用。

2.2.4 流式鉴定用抗体：CD73-PE、CD105-FITC、CD90-APC、CD11b-PE、CD19-PE/CY7、CD34-APC、CD45-FITC、HLA-DR-PE/CY7（品牌：Biolegend）

2.2.5 染色缓冲液：含 5%胎牛血清（Gibco）的 PBS 溶液；

2.2.6 上样缓冲液：PBS 溶液。

2.3 检测方法 本检测采用流式细胞术检测 MSCs 的阳性 marker（CD73、CD105、CD90）和阴性 marker

（CD11b、CD19、CD34、CD45、HLA-DR）的表达率，按照国际细胞治疗学会间充质及组织干细胞委员会提出的阳性 marker 表达率≥95%，阴性 marker≤2%的标准，对细胞表面抗原进行鉴定。

步骤如下：

- 加 5~10mL PBS 液清洗细胞，弃去清洗液，重复一次。每个培养皿加入 1mL 胰蛋白酶，左右摇晃使胰酶充分润湿皿底细胞。
- 把细胞置于显微镜下观察，当 80%~90%细胞边缘皱缩脱落时，加入 4mL 染色缓冲液终止消化，反复吹打直至细胞全部脱落，用移液枪吸取细胞悬液到 15mL 离心管，1500rpm，离心 5min。用 PBS+10%FBS 重悬细胞，20μL 细胞悬液用 countstar 进行细胞数量及活力检测，把细胞均分至三个 EP 管中，标记为样品管（S1、S2）和对照管（C），1500rpm 离心 5mi
- 离心后弃上清液，往各 EP 管中加入 200uL 染色缓冲液，轻柔重悬。对照管（C）不添加

任何抗体，样品管（S1）添加 CD73、CD90、CD45、HLA-DR 各 2.5uL。样品管（S2）添加 CD105、CD34、CD11b、CD19 各 2.5uL。充分混匀后，在 4℃ 环境中避光孵育 20min。

- 孵育完毕后，每 EP 管中避光添加 500uL PBS+10%FBS，混匀，1500rpm 离心 5min。
- 去上清，避光加入 500uL PBS+10%FBS，混匀，1500rpm 离心 5min。
- 去上清，避光加入 500uL 的 1640 基础培养基，混匀，用 70μm 一次性滤网过滤细胞样品。
- 震荡混匀后上流式细胞仪（按照《流式检测标准操作规程》进行仪器调试）。

2.4 检测时间

2015 年 11 月 25 日

2.5 检测结果及分析

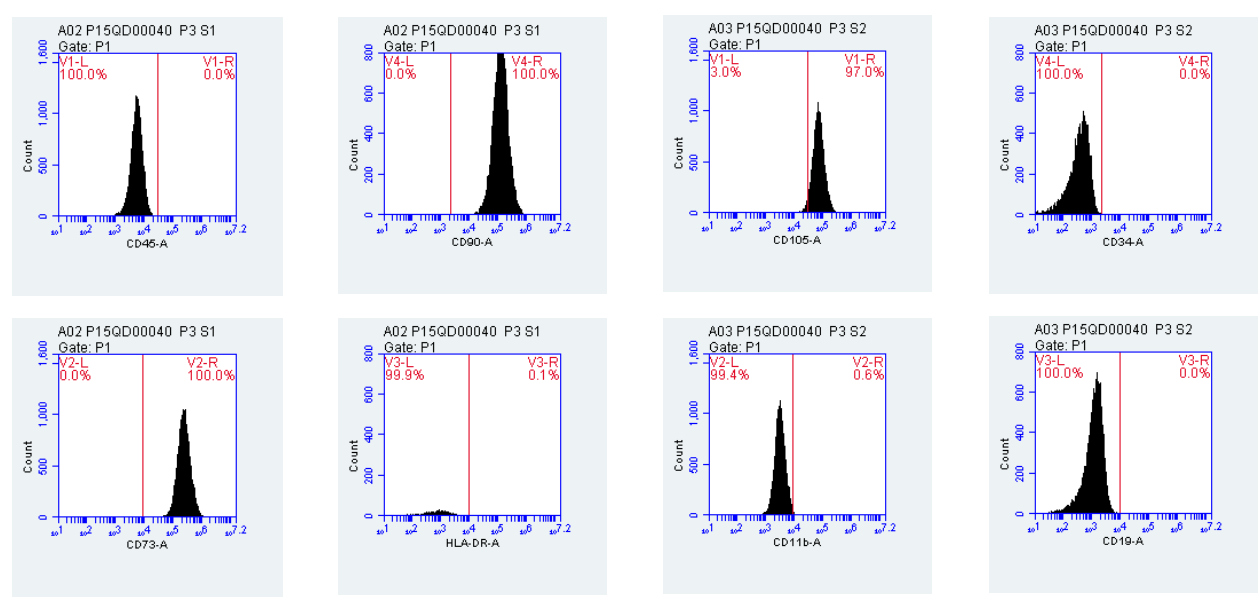


图 2 细胞表面抗原检查果

表 1 细胞表面抗原检查果

细胞代次：P3								
细胞标记	CD73	CD90	CD105	CD45	CD19	CD34	HLA-DR	CD11b
参考范围	≥95%	≥95%	≥95%	≤2%	≤2%	≤2%	≤2%	≤2%
结果	100.0%	100.0%	97.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.6%

如图 2 所示，细胞表面抗原流式结果显示，P15QD00040 P3 代细胞低表达 CD19，

CD34, CD45, HLA-DR, CD11b, 表达率 $\leq 2\%$, 而高表达 CD73, CD90, CD105, 表达率 $\geq 95\%$ 。

3. 细胞多向分化能力检查

3.1 细胞成骨诱导分化能力检查

3.1.1 主要检测设备

设备名称	型号	编号
倒置显微镜	AE2000	SLL-SC-XWJ-004
细胞培养箱	INC153	SLL-SC-PYX-004
离心机	5702	SLL-SC-LXJ-001

3.1.2 主要检测试剂

3.1.2.1 细胞培养液：DMEM/F12 基础培养基中加入 10%FBS，1% L-Glutamine，1% MEM NEAA，1% Penicillin-Streptomycin。 5.1.2.2 细胞消化液：含 0.02%EDTA 溶液的 0.25%胰蛋白酶溶液，无菌。

3.1.2.3 细胞清洗液：由 16.0g NaCl，0.4g KCl，2.88g Na₂HPO₄•2H₂O 和 0.48g KH₂PO₄，溶解于 2L 蒸馏水中配制而成，121℃ 高压条件下，灭菌 30min，分装备用。

3.1.2.4 成骨诱导分化液：

组成成分	各成分浓度
基础培养基	LG-DMEM
FBS	10%
谷氨酰胺	1%
NEAA	1%
青霉素和链霉素	1%
抗坏血酸	200uM
β-甘油磷酸	10mM
地塞米松	100nM

3.1.3 检测方法

- 取生长对数期的 P4 代 MSCs 接种于六孔板中，分别设置对照组与诱导组，每孔细胞接种密度均为 1.0×10^4 /孔，每孔加 2mL DMEM/F12 完全培养基进行培养。
- 待细胞融合到 60-70%，弃去旧培养基，其中诱导组换成骨分化诱导培养基，对照组换含 5%FBS 的低糖 DMEM 培养基，每孔加液 3mL，每 3 天换液一次；诱导培养到第 4 周时，用茜素红染色液对诱导组和对照组的细胞进行成骨染色鉴定并采集图像。

3.1.4 检测时间

2016 年 04 月 01 日 到 2016 年 04 月 27 日

3.1.5 检测结果及分析

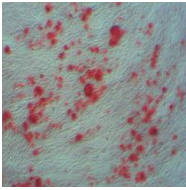
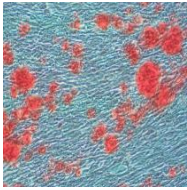
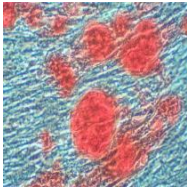
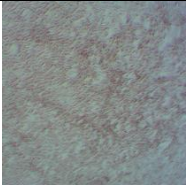
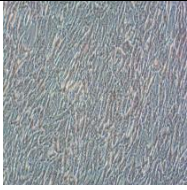
细胞编号	40×	100×	200×
	诱导组		
P15QD00040			
	对照组		
			

图 5 细胞成骨诱导分化实验结果

染色结果显示，P15QD00040 经成骨诱导 26 天后，与对照组相比，诱导组 hUC-
MSCs 细胞层上可见呈薄膜状骨节，茜素红染色后显现红色，证明该株细胞在体外具
有向成骨细胞分化的潜能。

3.2 细胞成脂诱导分化能力检查

3.2.1 主要检测设备

设备名称	型号	编号
倒置显微镜	AE2000	SLL-SC-XWJ-004
细胞培养箱	INC153	SLL-SC-PYX-004
离心机	5702	SLL-SC-LXJ-001

3.2.2 主要检测试剂

3.2.2.1 细胞培养液：DMEM/F12 基础培养基中加入 10%FBS，1% L-Glutamine，1% MEM NEAA，1% Penicillin-Streptomycin。 5.2.2.2 细胞消化液：含 0.02%EDTA 溶液的 0.25%胰蛋白酶溶液，无菌。

3.2.2.3 细胞清洗液：由 16.0g NaCl，0.4g KCl，2.88g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 0.48g KH_2PO_4 ，溶解于 2L 蒸馏水中配制而成，121℃ 高压条件下，灭菌 30min，分装备用。 5.2.2.4 成脂诱导分化液

组成成分	各成分浓度
基础培养基	LG-DMEM
FBS	10%
谷氨酰胺	1%
NEAA	1%
青霉素和链霉素	1%
吡啶美辛	100uM
胰岛素	5ug/mL
地塞米松	1uM
IBMX	500uM

3.2.3 检测方法

- 取生长对数期的 P5 代 MSCs 接种于六孔板中，分别设置对照组与诱导组，每孔细胞接种密度均为 1.0×10^4 /孔，每孔加 2mL 含 DMEM/F12 完全培养基进行培养。
- 待细胞融合到 90%以上，弃去旧培养基，其中诱导组换成脂分化诱导培养基，对照组换含 5%FBS 的低糖 DMEM 培养基，每孔加液 3mL，每 3 天换液一次；诱导培养到第 3 周时，用油红 O 对诱导组和对照组的细胞进行成脂染色鉴定并采集图像。

3.2.4 检测时间

2016 年 04 月 01 日 到 2016 年 04 月 26 日

3.2.5 检测结果及分析

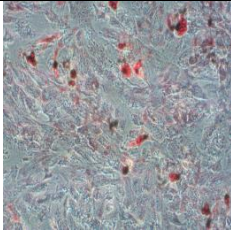
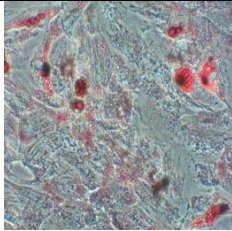
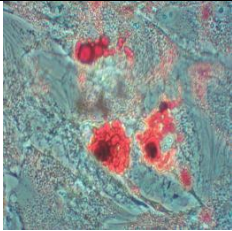
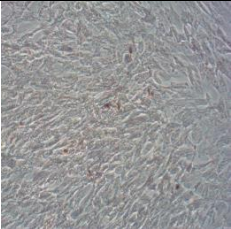
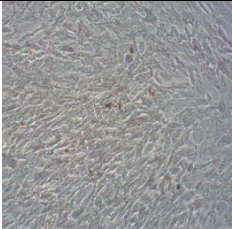
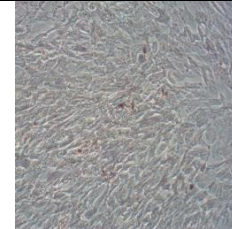
细胞编号	100×	200×	400×
	诱导组		
P15QD00040			
	对照组		
			

图 6 细胞成脂诱导分化实验结果

染色结果显示，P15QD00040 经成脂诱导 25 天后，与对照组相比，诱导组 hUC-MSCs 细胞胞浆内出现明显脂滴，油红 O 染色后呈现红色，证明该株细胞在体外具有向脂肪细胞分化的潜能。

4. 质量评价

人脐带间充质干细胞，编号为 P15QD00040，复苏 P2 代细胞培养至 P5 代进行细胞质量检测：

- 细胞贴壁生长，呈长梭形，形态符合规定；
 - 采用流式细胞术进行细胞表面抗原检测，CD73、CD90、CD105 的表达水平均高于 95%，CD11b、CD19、CD34、CD45、HLA-DR 的表达水平均低于 2%，细胞表面抗原检测结果符合规定；
 - 采用诱导分化培养基对细胞进行成骨、成脂诱导分化。茜素红染色阳性，说明细胞具有成骨诱导分化的能力。油红 O 染色阳性说明细胞具有成脂诱导分化的能力；
 - 对冻存前的细胞进行微生物检测，细菌、真菌、支原体检测均为阴性，结果符合规定。
- 以上检测说明细胞符合种子细胞库的要求，可入细胞库。

制表：吴子杰

Editor

审核：罗=柏

Verifier

一、 报告说明

Description of Test Reports

1. 检测报告无审核人签字无效。

Test report is invalid without signature of verifier.

2. 检测报告涂改增删无效。

Test report is invalid if being supplemented, elected or altered.

3. 未经本单位书面许可不得部分复制检测报告（完整复制除外）

Without prior written permission of the laboratory, the test report cannot be reproduced, except in full.

4. 除非另有说明，本报告检测结果仅对测试样品负责。

Unless otherwise stated, the results shown in this test report refer only to the sample(s) tested.

5. 对检测报告若有异议，应于收到报告之日起十五天内向检测单位提出。

Objections to the test report must be submitted to us with 15 days.

6. 样品为委托方送检时，样品来源信息由委托方提供，实验室不负责其真实性。

If the sample is submitted by the applicant for testing, sample source information is provided by the applicant and the laboratory is not responsible for its authenticity.