

ICS 11.220

B 41

T/CVDA

团体标准

T/CVDA 65- 2025

犬用间充质干细胞外泌体制备技术规范

Preparation technology standard of exosomes derived from mesenchymal stem

cells

2025-11-14 发布

2025-11-14 实施

中国兽药协会 发布

目录

目 录.....	1
前 言.....	3
治疗用犬间充质干细胞外泌体制备技术规范	4
1. 范围.....	4
2. 规范性引用文件.....	4
3. 术语和定义.....	4
3.1 犬干细胞 Canine stem cells	4
3.2 犬脐带间充质干细胞 Canine Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells.....	4
3.3 外泌体 Exosome	4
4. 缩略语	5
5. 外泌体的制备	5
5.1 供体动物的筛选.....	5
5.2 脐带提取干细胞的方法.....	5
5.2.1 样本采集与预处理（关键：无菌、保活）	5
5.2.2 组织消化：解离细胞（核心：温和酶解）	5
5.2.3 细胞纯化与初步培养	6
5.2.4 传代培养与鉴定	6
5.3 前期准备	6
5.3.1 试剂准备（关键：排除外源外泌体污染）	6
5.3.2 耗材预处理.....	6
5.4 第一步：犬脐带间充质干细胞（CUC-MSCs）培养与上清收集.....	7
5.4.1 细胞复苏与扩增（第3-5代细胞，活力≥90%）	7
5.4.2 无血清饥饿诱导（促进外泌体分泌）	7
5.4.3 细胞上清收集	7
5.5 第二步：上清预处理	8
5.6 第三步：外泌体分离纯化	8
5.6.1 第一次超速离心（富集外泌体，4℃，100000×g，90分钟）	8
5.6.2 外泌体洗涤（去除残留蛋白，4℃，100000×g，70分钟）	8
6 质量控制.....	9
6.1 间充质干细胞.....	9
6.1.1 细胞形态.....	9
6.1.2 染色体核型	9
6.1.3 细胞存活率	9
6.1.4 细胞表面标志物.....	9
6.1.5 免疫调节	9
6.1.6 三系分化	9
6.1.7 成瘤性	9
6.1.8 微生物	9
6.1.8.1 真菌	9
6.1.8.2 细菌	9
6.1.8.3 支原体	10
6.1.8.4 内毒素	10

6.2 外泌体	10
6.2.1 形态	10
6.2.2 粒径	10
6.2.3 标志物检测	10
6.2.4 颗粒蛋白比	10
6.2.5 内毒素	10
6.2.6 无菌	10
6.3 检验规则	10
6.3.1 半成品抽样方法和数量	10
6.3.2 复核检查	11
6.3.3 判定规则	11
7. 储存和运输	11
7.1 储存	11
7.2 运输	11
8. 犬间充质干细胞外泌体的用途及推荐用量	11
附录 A	12
附录 B	13
附录 C	15
附录 D	17
附录 E	18
附录 F	19
附录 G	20
附录 H	22
附录 I	23
附录 J	24
附录 K	246
附录 L	26

前言

本标准按照 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。

本标准由中国兽药协会提出并归口。

本标准起草单位：苏州修宝生物科技有限公司、西北农林科技大学干细胞工程中心、陕西
佰奥德生物科技有限公司。

本标准主要起草人：华进联、吕长荣、补亚忠、杜宝吉、李海龙、杨震、赵锋。

本标准名称：犬用间充质干细胞外泌体制备技术规范

治疗用犬间充质干细胞外泌体制备技术规范

1. 范围

本文件规定了治疗用犬间充质干细胞外泌体的制备、质量控制、储存、运输及应用等技术要求。

本文件适用于治疗用犬间充质干细胞制备、质量控制和犬炎性肠炎治疗等技术和要求的规范。

2. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过本文件的规范性引用而成为本文件必不可少的条款。

凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

T/CSCB 0001 干细胞通用要求

中华人民共和国药典（2020年版）

中华人民共和国兽药典（2020年版）

GB/T 27532-2011 犬瘟热诊断技术

GB/T 27533-2011 犬细小病毒病诊断技术

WS281-2008 狂犬病诊断标准

3. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 犬干细胞 Canine stem cells

犬干细胞是来源于犬科动物、具备自我更新能力与多向分化潜能的细胞，可分化为骨骼、软骨、神经等多种组织细胞，主要分胚胎干细胞与成体干细胞两类。胚胎干细胞源于犬早期胚胎，分化潜能最高，多用于基础研究；成体干细胞来自脂肪、骨髓、脐带等，免疫原性低、获取便捷，临床应用更广泛，其中脂肪来源间充质干细胞最常用。

3.2 犬脐带间充质干细胞 Canine Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells

犬脐带间充质干细胞（Canine Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells，简称 CUC-MSCs），是从新生幼犬的脐带组织（通常为脐带华通氏胶、脐血管周围间质等部位）中分离提取的一类成体间充质干细胞，属于犬干细胞家族中兼具临床应用潜力与伦理优势的重要类型。

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

CD----分化簇 (Cluster of Differentiation)

CDV----犬瘟热 (Canine distemper)

CPV----犬细小病毒 (Canine Parvovirus)

IDO----吲哚胺 2, 3-双加氧酶 (Indoleamine 2, 3 Dioxygenase)

INF- γ ----干扰素 γ (Interferon gamma)

MSC----间充质干细胞 (Mesenchymal stem cell)

RV----狂犬病毒 (Rabies virus)

5. 外泌体的制备

5.1 供体动物的筛选

除应符合附录A的要求外，犬瘟热(CDV)、犬细小病毒(CPV)、狂犬病(RV)应为阴性。

5.2 脐带提取干细胞的方法

5.2.1 样本采集与预处理（关键：无菌、保活）

脐带获取：新生幼犬出生后30分钟内，在离幼犬腹部1-2cm处剪断脐带（确保幼犬无创伤），立即放入含无菌生理盐水（含青霉素、链霉素）的密封容器中，4℃避光运输至实验室（12小时内处理，避免细胞失活）。

组织清洁与分离：在超净工作台内，用无菌生理盐水（含双抗）反复冲洗脐带，完全去除表面血液、黏液；用无菌剪刀纵向剖开并去除2条动脉和1条静脉，显微镊剥离华通氏胶(Wharton's Jelly)。

5.2.2 组织消化：解离细胞（核心：温和酶解）

剪碎组织：将华通氏胶剪成1-2mm³的细小组织块，放入无菌离心管，增加酶与细胞的接触面积。

酶解反应：加入预热至37℃的胶原酶IV溶液(0.1%-0.2%浓度)，液面没过组织块即可；置于37℃恒温摇床(30-50rpm)孵育45分钟-1.5小时，期间轻轻颠倒离心管1-2次，确保酶解充分，同时需严格控制消化时间，避免过度消化损伤细胞。

终止与过滤：加入等量含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基（中和胶原酶活性），终止消化；用 70 μ m 无菌细胞滤网过滤混合液，去除未解离的组织碎片，收集含单细胞的滤液。

5.2.3 细胞纯化与初步培养

离心洗涤：将滤液转入离心管，1000rpm 离心 8 分钟，弃去上层含酶、杂质的上清液；向细胞沉淀中加入 10mL 新鲜培养基，轻轻吹打重悬细胞，再次 1000rpm 离心 8 分钟，重复 1 次。

接种培养：将细胞重悬于完全培养液（DMEM/F12+10% 胎牛血清+1% 双抗），以 $1 \times 10^4\text{--}2 \times 10^4$ cells/cm² 接种到 T25 细胞培养瓶中，置于 37°C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中静态培养；48 小时后首次更换培养基，去除未贴壁的死细胞与杂质（存活的间充质干细胞会贴壁生长，呈梭形）。

5.2.4 传代培养与鉴定

传代扩增：当培养瓶中细胞融合度达 70%–80% 时，用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化贴壁细胞，按 1:2 比例接种到新培养瓶中传代，每 2 天更换一次培养基，一般培养至 P3 – P5 代细胞纯度可达 90% 以上，此时细胞状态良好，具有稳定的干细胞特性。

初步鉴定：通过形态学观察（确保细胞呈均一梭形，无杂细胞）、流式细胞术检测表面标志物（阳性表达 CD105、CD44、CD90，阴性表达 CD34、CD45），确认获得合格的犬脐带间充质干细胞，后续可用于生产外泌体。

5.3 前期准备

5.3.1 试剂准备（关键：排除外源外泌体污染）

5.3.1.1 基础培养基：DMEM/F12 培养基（粉末状需用超纯水溶解，经 0.22 μ m 滤膜过滤灭菌后 4°C 保存）；

5.3.1.2 胎牛血清（FBS）：提前用超速离心机在 4°C、100000 $\times g$ 条件下离心 16 小时，去除血清中自带的外泌体，分装后 -20°C 保存（称为“去外泌体 FBS”）；

5.3.1.3 无血清培养基：（含双抗）：取除菌后的 DMEM/F12，按 1:100 比例加入双抗母液，轻轻混匀，使用前现配。

5.3.1.4 双抗母液配置：将青霉素（20000U/mL）与链霉素（20000 μ g/mL）按 1:1 混合，制成 100 \times 双抗母液，-20°C 保存（分装后使用，避免反复冻融）。

5.3.1.5 其他试剂：无菌 PBS（pH7.2–7.4，高压灭菌后 4°C 保存）、2% 磷钨酸（负染剂，用无菌水配制后 0.22 μ m 滤膜过滤除菌）、5% 甘油（无菌，用于长期保存）。

5.3.2 耗材预处理

5.3.2.1 离心管：超速离心管（如 Beckman 32.1mL 聚碳酸酯管）需提前用无菌水冲洗 2 次，烘干后备用；高速离心管（50mL）需灭菌。

5.3.2.2 滤膜：0.22 μ m 聚醚砜（PES）滤膜（直径 25mm 或 47mm），使用前用无菌 PBS 润洗 1 次，去除滤膜表面杂质。

5.3.2.3 细胞培养瓶：T75 或 T175 培养瓶（根据细胞量选择），提前在 37℃ 培养箱中预热 30 分钟，避免细胞接种时温度刺激。

5.4 第一步：犬脐带间充质干细胞（CUC-MSCs）培养与上清收集

5.4.1 细胞复苏与扩增（第 3-5 代细胞，活力 $\geq 90\%$ ）

5.4.1.1 从 -80℃ 冰箱取出冻存的 CUC-MSCs，立即放入 37℃ 水浴锅中快速融化（1-2 分钟内完全融化，避免冰晶损伤细胞）；

5.4.1.2 用无菌吸管将融化的细胞悬液转移至含 5mL “去外泌体 FBS+DMEM/F12” 培养基的离心管中，4℃、300×g 离心 5 分钟，弃去含冻存液的上清；

5.4.1.3 向细胞沉淀中加入 5mL 新鲜培养基，轻轻吹打至细胞分散均匀（避免剧烈吹打导致细胞破裂），转移至 T75 培养瓶中，放入 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养；

5.4.1.4 培养 24 小时后，观察细胞贴壁情况：若贴壁细胞占瓶底 70% 以上，弃去旧培养基，用无菌 PBS 冲洗细胞 2 次（每次静置 1 分钟），更换新鲜培养基；若贴壁率低，继续培养至 48 小时后换液；

5.4.1.5 当细胞融合度达 80%-90% 时，进行传代。弃去培养基，加入 2mL 0.25% 胰蛋白酶 - EDTA，37℃ 孵育 1-2 分钟（镜下观察细胞变圆、间隙增大），立即加入 5mL 培养基终止消化，吹打细胞至单层脱落，收集细胞悬液，4℃、300×g 离心 5 分钟，弃上清后用培养基重悬，按 1:3 比例接种至新的 T175 培养瓶，继续培养至第 3-5 代（确保细胞形态均一，无分化迹象）。

5.4.2 无血清饥饿诱导（促进外泌体分泌）

5.4.2.1 当第 3-5 代 CUC-MSCs 融合度达 70%-80% 时，弃去含去外泌体 FBS 的培养基，用无菌 PBS 轻柔冲洗细胞 3 次（每次冲洗沿培养瓶壁缓慢加入，避免冲散贴壁细胞）；

5.4.2.2 向培养瓶中加入 15-20mL（T175 瓶）无菌无血清培养基（含 1% 双抗），放入 37℃、5% CO₂ 培养箱中，继续培养 48-72 小时（培养时间可根据细胞状态调整：若细胞凋亡 $\geq 20\%$ ，缩短培养时间至 48 小时；若细胞状态良好，可延长至 72 小时）。

5.4.3 细胞上清收集

培养结束后，将培养瓶从培养箱中取出，在生物安全柜内倾斜培养瓶，用无菌吸管吸取上清液（避免吸管触碰瓶底的贴壁细胞，若上清中有少量漂浮细胞，可先静置 5 分钟让细胞沉降）；将收集的上清液转移至无菌 50mL 离心管中，做好标记（细胞代次、收集日期、体积），立即进行后续预处理，或暂时 4℃保存（不超过 2 小时）。

5.5 第二步：上清预处理

5.5.1 低速离心：4℃、 $300\times g$ 离心 10 分钟，吸取上清至新管，弃细胞沉淀。

5.5.2 中速离心：4℃、 $2000\times g$ 离心 20 分钟，吸取上清至新管，弃细胞团块沉淀。

5.5.3 高速离心：4℃、 $10000\times g$ 离心 30 分钟，吸取上清至新管，弃凋亡小体及大囊泡沉淀。

5.5.4 过滤除残留大颗粒

在生物安全柜内，将无菌 $0.22\mu m$ PES 滤膜安装在过滤支架上，用无菌 PBS 润洗滤膜 1 次（润洗后弃去 PBS）；将上述高速离心后的上清液缓慢倒入滤膜上方（避免液体溢出），依靠重力自然过滤（若流速过慢，可轻轻按压滤膜上方，但不可用力挤压，防止滤膜破裂）；收集过滤后的澄清液体（称为“外泌体粗提液”），此时液体应无浑浊、无颗粒，若有浑浊需重新过滤。

5.6 第三步：外泌体分离纯化

5.6.1 第一次超速离心（富集外泌体，4℃， $100000\times g$ ，90 分钟）

将外泌体粗提液转入无菌超速离心管（如 Beckman 32.1mL 管），用无菌 PBS 补足体积至离心管最大刻度（避免离心时管内液体过少导致平衡失衡）；

用电子天平对所有超速离心管进行平衡（误差≤0.1g，若不平衡，用无菌 PBS 调整），将平衡后的离心管放入超速离心机转子（如 Beckman SW32Ti 转子）；

设置离心参数：温度 4℃、转速 $100000\times g$ 、时间 90 分钟，启动离心，离心过程中保持温度稳定；

离心结束后，缓慢取出离心管，此时管底可见乳白色絮状沉淀（即粗外泌体），用无菌吸管轻轻吸去上层清液（注意不要触碰沉淀，若上清中仍有少量浑浊，可保留少量上清，后续洗涤时去除）。

5.6.2 外泌体洗涤（去除残留蛋白，4℃， $100000\times g$ ，70 分钟）

向含粗外泌体沉淀的离心管中加入 1mL 无菌 PBS，用无菌移液器轻轻吹打沉淀（吹打次数不超过 10 次，避免产生气泡破坏外泌体结构），使沉淀完全重悬；

用无菌 PBS 将重悬液补足至超速离心管最大刻度，再次平衡离心管后，放入超速离心机，4℃、 $100000\times g$ 离心 70 分钟；

离心结束后，弃去上层清液，保留管底的乳白色沉淀（此时为高纯度外泌体），如需更高纯度（如蛋白组学分析），重复洗涤 1 次，最终沉淀为纯化外泌体。。

6 质量控制

6.1 间充质干细胞

6.1.1 细胞形态

二维培养条件下，用明视场细胞显微镜进行观察。细胞贴壁培养时呈纺锤形或梭形的成纤维细胞态，形态均一，以漩涡状或平行排列形成致密单层。

6.1.2 染色体核型

按照《中华人民共和国兽药典（2020 年版）》三部中 3502 3.2.4 胞核学检验方法检验，正常核型应为 78，XX 或 78，XY。

6.1.3 细胞存活率

按照附录 B 的方法检验，未冻存细胞存活率 $\geq 95\%$ ，且冻存复苏后细胞存活率 $\geq 90\%$ 。

6.1.4 细胞表面标志物

在体外培养条件下，CD105、CD44、CD90 阳性率 $\geq 90\%$ ；CD34、CD45 阳性率 $\leq 5\%$ 。

6.1.5 免疫调节

经炎症因子 IFN- γ 诱导后显著增强犬 MSC 表达吲哚胺 2,3-双加氧酶 (IDO)。与活化的 T 淋巴细胞共培养，能抑制 T 淋巴细胞增殖及分泌 INF- γ 和 TNF- α 。

6.1.6 三系分化

分别按照附录 D、附录 E 和附录 F 的方法检验，应具有成骨、成脂、成软骨的分化潜能。

6.1.7 成瘤性

按照附录 G 的方法检验，免疫缺陷动物（如裸鼠）体内成瘤试验结果为阴性。

6.1.8 微生物

6.1.8.1 真菌

按照《中华人民共和国兽药典》（2020 年版）三部 附录 3306 无菌检验或纯粹检验法的方法检测，应无菌。

6.1.8.2 细菌

按照《中华人民共和国兽药典》（2020 年版）三部 附录 3306 无菌检验或纯粹检验法的方法检测，应无菌。

6.1.8.3 支原体

按照《中华人民共和国兽药典》（2020 年版）三部 附录 3308 支原体检验法的方法检测，应无支原体生长。

6.1.8.4 内毒素

按照《中华人民共和国兽药典》（2020 年版）一部 附录 1143 细菌内毒素检验法的方法检测，应符合要求。

6.2 外泌体

6.2.1 形态

按照附录 H 的方法检验，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

按照附录 I 的方法检验，应分布在 30~150nm 范围内，且在该范围内存在粒径峰值。

6.2.3 标志物检测

按照附录 K 的方法检验，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

按照附录 L 的方法检验，外泌体颗粒数与蛋白量比值不低于 1×10^8 particles/ μg 。

6.2.5 内毒素

按《中华人民共和国兽药典》（2020 年版）一部 附录 1143 细菌内毒素检查法的方法检测，应小于 0.5EU/mL。

6.2.6 无菌

按《中华人民共和国兽药典》（2020 年版）三部 附录 3306 无菌检验或纯粹检验法的方法检测，应无菌。

6.3 检验规则

6.3.1 半成品抽样方法和数量

6.3.1.1 在同一个生产周期中，同一生产线，同一来源，同一代次，同一方法制备出来的半成品

为一批。

6.3.1.2 在同一批的半成品中随机抽取 3 倍检验量的最小包装单元留样。

6.3.2 复核检查

根据需要，应由专业细胞检验机构实验室进行复核检验。

6.3.3 判定规则

复核检验项目全部符合规定，判为合格品；有 1 项及以上不符合本文件规定，则判为不合格品。

7. 储存和运输

7.1 储存

7.1.1 应符合 T/SZJCH003-2022《细胞外泌体通用技术要求》要求。

7.1.2 应在低于-80℃环境下储存。

7.2 运输

7.2.1 应符合 T/SZJCH003-2022《细胞外泌体通用技术要求》要求。

7.2.2 冻干外泌体应在 2℃~8℃条件下运输，非冻干外泌体应在干冰或低于-80℃条件下运输。

8. 犬间充质干细胞外泌体的用途及推荐用量

序号	用途	使用方式	推荐用量 (10 亿/ml)	推荐周期/频次
1	治疗关节炎	注射	小型犬 0.5~1ml, 中大型犬 1~2ml。	每 10~15 天一次，连续注射 3~5 次
2	创伤	涂抹	0.2~1ml。	早晚各 1 次，涂抹 3~7 天
		注射	伤口周围分点注射，每点 0.1~0.3 mL，总量每次 0.5~2 mL。	每 3 天 1 次，连续注射 2~3 次
3	角膜炎	滴 (50 微升)	小型犬每次 1~2 滴，中大型犬每次 2~3 滴。	早晚各 1 次，连续 7~10 天
4	肠炎	注射	通常 0.1~0.3 mL/kg。	每 2 天 1 次，连续注射 3~5 次
		口服	0.2~0.5 mL/颗。	每天 1 次，连续服用 7~10 天

提示：犬间充质干细胞外泌体作为具有生物活性的核心成分，必须经过标准化生产流程——包括分离纯化、质量检测、制剂配方开发等环节，并与其他符合药用标准的辅料（如稳定剂、缓冲体系、载体基质等）科学配伍，最终制成符合兽药或生物制品规范的成品（如注射剂、滴眼液等），才能确保其安全性、有效性和稳定性，满足临床应用的基本要求。

附录 A

(规范性)

供体犬评估与筛选、犬组织样品采集和运输标准

A. 1 供体犬筛选标准

A. 1. 1 供体犬年龄应不大于 5 岁（60 个月），以确保供体犬没有出现明显衰老迹象。

A. 1. 2 健康状况筛查：供体犬应由专业兽医进行全面的健康评估，包括体格检查，血液检查，并且具有有效的疫苗接种记录（至少包含犬瘟热，犬细小和狂犬病疫苗），确保没有潜在的遗传或者传染疾病。

A. 1. 3 品种和遗传背景：供体犬的品种信息和遗传背景应当有完整记录，以排除潜在的遗传风险或疾病。

A. 1. 4 心理和行为特征筛查：供体犬应具有良好的心理和行为特征。挑选脾气稳定，友好和适应新环境的犬作为供体，以减少在组织采集和实验过程中的应激和不适感。

A. 2 犬组织采集方法

A. 2. 1 用于干细胞分离的犬组织的采集应获得当地动物福利和伦理委员会的批准。

A. 2. 2 麻醉与镇定：使用合适的麻醉方法，确保供体犬在组织采集过程中没有疼痛或者不适感。

A. 2. 3 组织采集技术：根据目的间充质干细胞来源的不同，选择合适的组织采集技术，例如皮下脂肪，骨髓和产后废弃组织应选用不一样的手术采集方法。手术全程遵循无菌原则。

A. 2. 3 供体犬术后护理：术后应对供体犬应进行体温，行为和身体状况等进行监测；伤口需定期清洁和更换包扎，避免犬舔舐或咬伤；遵循适当的疼痛管理计划，包括使用合适的阵痛药物；为供体犬提供干净舒适的环境，清洁的饮水和易消化的食物，以确保其快速恢复和动物福利。

A. 3 犬组织运输和交接标准

A. 3. 1 犬组织运输条件：应将组织置于大小合适的无菌容器中，并使用适当的缓冲溶液保存。运输过程保证组织温度保持在 4℃~8℃，并于 8h 内将组织样品运送至实验室进行间充质干细胞分离。

A. 3. 2 交接标准：制定详细的交接文件，记录犬的身份信息、健康状况、组织类型、采集日期、过程和采集人信息等。

附录 B

(规范性)

细胞存活率检测 细胞计数法

B.1 仪器和设备

B.1.1 明视场显微镜。

B.1.2 血球计数板。

B.2 药剂

除特别说明外，所用试剂均为分析纯，检测用水均为 18.2 MQ 去离子水。

B.2.1 磷酸盐缓冲液：pH 为 7.4。

B.2.2 台盼蓝染液：使用时，用磷酸盐缓冲液（B.2.1）稀释至 0.4%（质量浓度）。

B.3 检测步骤

B.3.1 细胞悬液制备

收集待检测细胞，用磷酸盐缓冲液（B.2.1）配制细胞悬液，稀释至合适的浓度。每个血球计数板（B.1.2）的 1mm^2 的方格中的细胞的数量应为 20 个~50 个细胞。如果高于 200 个细胞，则需要进行稀释。

B.3.2 细胞染色

按 1:1 的体积比将台盼蓝染液（B.2.2）与细胞悬液（B.3.1）混合均匀。

B.3.3 细胞计数

将盖玻片盖在血球计数板（B.1.2）计数槽上，取 $10\mu\text{L}$ 混合液（B.3.2）滴在一侧计数室的盖玻片边缘，另取 $10\mu\text{L}$ 混合液，滴在另一侧计数室的盖玻片边缘，使混合液充满盖玻片和计数板之间，静置 30s，将计数板置明视场显微镜（B.1.1）下对被染色的细胞和细胞总数分别进行计数。

对 16×25 规格的计数室，按对角线位，取左上、右上、左下、右下 4 个 1mm^2 的中格（即 100 个小格）计数。对 25×16 规格的计数室，按对角线位，取左上、右上、左下、右下和中央 5 个中格（即 80 个小格）计数。当遇到位于大格线上的细胞，一般只计数大方格的上方和左线上的细胞（或只计数下方和右方线上的细胞）。

按照步骤 B.3.2~B.3.3 再重复测定一个样品。

B.3.4 细胞存活率计算

B.4 计算与分析 细胞存活率按式（B.1）进行计算：

$$X = (M-S)/M \times 100\% \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \quad (B. 1)$$

式中：

X—细胞存活率；

M—细胞总数；

S—染色的细胞数。

计算两次计数细胞存活率结果的平均值，记为细胞平均存活率。

B.5 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

附录 C

(规范性)

诱导 IDO 表达检测 PCR 法

C.1 仪器和设备

C.1.1 核酸含量测定仪。

C.1.2 PCR 扩增仪。

C.1.3 电泳仪。

C.1.4 凝胶成像仪。

C.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/T6682 规定的一级水。

C.2.1 重组 IFN- γ 。

C.2.2 RNA 提取试剂盒。

C.2.3 RNA 逆转录 PCR 试剂盒。

C.2.4 PCR 引物。

C.2.5 TaqDNA 聚合酶。

C.2.6 Ladder 内标。

C.3 检测步骤

C.3.1 IFN- γ 处理

根据附录 B 方法测定，计算犬间充质干细胞悬液活细胞浓度。按($1 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$)细胞/cm² 接种，在犬间充质干细胞培养体系中添加 IFN- γ (10 ng/mL~30ng/mL)，正常培养 12h~36h。同时设立未使用 IFN- γ 处理的犬间充质干细胞为对照组，培养同样时间。

C.3.2 犬间充质干细胞总 RNA 提取

根据 RNA 提取试剂盒产品说明书进行，并使用核酸含量测定仪 (C.1.1) 进行核酸含量测定。

C.3.3 逆转录 PCR

根据 RNA 逆转录 PCR 试剂盒产品说明书进行，使用 PCR 扩增仪 (C.1.2) 获得 cDNA，并扩增 IDO 基因。

C.3.4 PCR 产物电泳

根据电泳应用手册进行电泳检测。

C.3.5 凝胶成像根据凝胶成像仪应用手册，使用电泳仪（C. 1.3），进行电泳检测。

C.4 结果分析

使用凝胶成像仪（C. 1.4）进行成像，未使用 IFN- γ 处理的犬间充质干细胞在扩增产物片段大小范围内无明显条带，IFN- γ 刺激后在扩增产物片段大小范围内可见明显条带。

附录 D

(规范性)

成骨分化检测 茜素红 S 染色法

D.1 仪器和设备

D.1.1 血球计数板。

D.1.2 明视场显微镜。

D.1.3 水平离心机。

D.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/T6682 规定的一级水。

D.2.1 磷酸盐缓法液：pH 为 7.4。

D.2.2 0.25% 胰酶-EDTA。

D.2.3 台盼蓝染色：使用时，用磷酸盐缓冲液（D.2.1）稀释至 0.4%（质量浓度）。

D.2.4 成骨诱导液。

G.2.5 茜素红 S 染色试剂盒。

D.3 检测步骤

D.3.1 细胞样品的准备

D.3.1.1 细胞消化

使用水平离心机（D.1.3）离心收集犬间充质干细胞于离心管中，用无菌磷酸盐缓冲液轻轻重悬细胞，避免形成气泡或者残细胞团块。

D.3.1.2 细胞计数

根据附录 B 方法测定，使用血球计数板（D.1.1）及明视场显微镜（D.1.2）计算犬间充质干细胞悬液活细胞浓度。

D.3.2 细胞接种并诱导

细胞接种方式、密度及诱导步骤均遵循成骨诱导液产品说明书，诱导 14 d~21 d。

D.3.3 钙结节染色

钙结节染色根据茜素红 S 染色试剂盒说明书进行。

G.4 结果分析

显微镜下可见散在橘红色的钙结节。

附录 E

(规范性)

成脂分化检测 油红 O 染色法

E.1 仪器和设备

E.1.1 血球计数板。

E.1.2 明视场显微镜。

E.1.3 水平离心机。

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 磷酸盐缓冲液：pH 为 7.4。

E.2.2 0.25% 胰酶-EDTA。

E.2.3 台盼蓝染液：使用时，用磷酸盐缓冲液（E.2.1）稀释至 0.4%（质量浓度）。

E.2.4 成脂诱导液。

E.2.5 油红 O 染色试剂盒。

E.3 检测步骤

E.3.1 细胞样品的准备

E.3.1.1 细胞消化

使用水平离心机（E.1.3）离心收集细胞于离心管中，用无菌磷酸盐缓冲液轻轻重悬细胞，避免形成气泡或者残留细胞团块。

E.3.1.2 细胞计数

根据附录 B 方法测定，使用血球计数板（E.1.1）及明视场显微镜（E.1.2）计算犬间充质干细胞悬液活细胞浓度。

E.3.2 细胞接种并诱导

细胞接种方式、密度及诱导步骤均遵循成脂诱导液产品说明书，诱导 14d~21d。

E.3.3 脂滴染色

脂滴染色根据油红 O 染色试剂盒说明书进行。

E.4 结果分析

显微镜下可见细胞中含大小不等橙红色的脂滴。

附录 F

(规范性)

成软骨分化检测 阿尔新蓝染色法

F.1 仪器和设备

F.1.1 血球计数板。

F.1.2 明视场显微镜。

F.1.3 水平离心机。

F.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。

F.2.1 磷酸盐缓冲液：pH 为 7.4。

F.2.2 0.25% 胰酶-EDTA。

F.2.3 台盼蓝染液：使用时，用磷酸盐缓冲液（F.2.1）稀释至 0.4%（质量浓度）。

F.2.4 成软骨诱导液。

F.2.5 阿尔新蓝染色试剂盒。

F.3 检测步骤

F.3.1 细胞样品的准备

F.3.1.1 细胞消化

使用水平离心机（F.1.3）离心收集细胞于离心管中，用无菌磷酸盐缓冲液轻轻重悬细胞，避免形成气泡或者残留细胞团块。

F.3.1.2 细胞计数

根据附录 B 方法测定，使用血球计数板（F.1.1）及明视场显微镜（F.1.2）计算细胞悬液活细胞浓度。

F.3.2 细胞接种并诱导

细胞接种方式、密度及诱导步骤均遵循成软骨诱导液产品说明书，诱导 14 d~21 d。

F.3.3 软骨细胞胞外基质染色

软骨细胞胞外基质染色根据阿尔新蓝试剂盒说明书进行。

F.4 结果分析

显微镜下可见被染为深蓝色的软骨细胞胞外基质。

附录 G

(规范性)

成瘤性检测 免疫缺陷小鼠检测法

G.1 仪器和设备

G.1.1 血球计数板。

G.1.2 明视场显微镜。

G.1.3 水平离心机

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 磷酸盐缓冲液：pH 为 7.4。

G.2.2 0.25% 胰酶-EDTA。

G.2.3 台盼蓝染液：使用时，用磷酸盐缓冲液（G.2.1）稀释至 0.4%（质量浓度）。

G.3 检测步骤

G.3.1 细胞样品的准备

G.3.1.1 细胞消化

使用水平离心机（G.1.3）离心收集细胞于离心管中，用无菌磷酸盐缓冲液轻轻重悬细胞，避免形成气泡或者残留细胞团块。

G.3.1.2 细胞计数

根据附录 A 方法测定，使用血球计数板（G.1.1）及明视场显微镜（G.1.2）计算犬细胞悬液活细胞浓度。

G.3.2 细胞移植

将 1×10^7 个犬间充质干细胞注射到 6 至 8 周龄的免疫缺陷型小鼠皮下，设置空白对照组（空白组注射与产品对应的溶媒）、阴性对照组（犬二倍体细胞）、阳性对照组（犬肿瘤细胞系，按照肿瘤细胞系接种要求的数量注射）。

G.3.3 肿瘤观察

接种后观察 16 周，每周测量体重、肿瘤大小。若荷瘤小鼠肿瘤超过 2000 mm³ 或者肿瘤溃烂或体重下降，可考虑执行人道终点。16 周后剥离小鼠身上肿瘤，进行大体观察和瘤体称重，计算成瘤率。

G.4 结果分析 成瘤率按式(G.1)进行计算：

式中：

Z——成瘤率；

M——接种小鼠总数；

N——荷瘤小鼠总数。

附录 H

(规范性)

外泌体形态检测(透射电镜观察法)

H.1 仪器和设备

H.1.1 120 kv 冷冻电镜、移液枪、镊子。

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/T6682 规定的一级水。

H.2.1 2%醋酸双氧铀溶液。

H.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。

H.3.2 将 3~5 μ L 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。

H.3.3 用 2%醋酸双氧铀溶液负染 1 min。

H.3.4 将铜网向侧面推到滤纸上，除去多余的液体。

H.3.5 使用配备数码相机和图像分析软件的 120kv 冷冻电镜进行检测。

附录 I

(规范性)

外泌体颗粒浓度检测(纳米流式检测法)

I.1 仪器和设备

I.1.1 纳米流式仪。

I.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/T6682规定的一级水。

I.2.1 磷酸盐缓冲液:pH为7. 4。

I.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)。

I.3 检测步骤

I.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。

I.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。

I.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。

I.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。

I.3.5 将过滤的($0.22 \mu m$)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的样品稀释。

I.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。

I.4 结果分析

使用NF Profession软件计算待测样品颗粒浓度。

附录 J

(规范性)

外泌体粒径检测(纳米流式检测法)

J.1 仪器和设备

J.1.1 纳米流式仪。

J.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/T6682规定的一级水。

J.2.1 磷酸盐缓冲液: pH为7.4。

J.2.2 200nm聚苯乙烯(PS) 微球、纳米流式仪S16M- Exo粒径标准品。

J.3 检测步骤

J.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。

J.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。

J.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。

J.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。

J.3.5 将过滤的($0.22 \mu m$)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的样品稀释。

J.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。

J.4 结果分析

使用NF Profession软件计算待测样品粒径分布。

附录 K

(规范性)

外泌体表面标志蛋白检测(免疫印迹法)

K.1 仪器和设备

K.1.1 电泳仪、转膜仪、摇床、化学发光成像系统。

K.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/T6682规定的一级水。

K.2.1 磷酸盐缓冲溶液: pH为7.4。

K.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。

K.2.3 灵敏化学发光检测试剂盒。

K.3 实验步骤

K.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10min，进行蛋白变性。

K.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。

K.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。

K.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1h。

K.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。

K.3.6 洗涤: 将孵育完一抗的PVDF膜于TBST中漂洗。

K.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2h。

K.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。

K.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。

附录 L

(规范性)

外泌体蛋白含量检测(BCA 检测法)

L.1 仪器和设备

L.1.1 高速离心机、涡旋振荡仪、金属浴、酶标仪。

L.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/T6682规定的一级水。

L.2.1 磷酸盐缓冲溶液: pH为7.4。

L.2.2 RIPA组织/细胞裂解液、蛋白定量试剂盒(BCA法)。

L.3 实验步骤

L.3.1 RIPA 裂解外泌体。

L.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。

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

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

L.3.2 BCA 法测定蛋白浓度。

L.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。

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

L.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。

L.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。