

验证 D1 量子水对干细胞活率和增值活性的影响

1. Objective 目的

该验证方案目的是为了验证 D1 量子水对干细胞活率和增值活性的影响。

2. Scope 范围

适用于冠昊生物细胞事业部的脐带间充质干细胞增值验证方案。

其中 D1 量子水来源是北京掌海环保科技有限公司。

操作地点：冠昊生物三楼 A302 操作间。

操作时间：2020.6.21-2020.6.27

操作人：吴海涛

3. Responsibilities 职责

职责描述

本次验证由生产部组织，其中 QA、QC 参与验证，验证具体参加人员及职责如下：

人员	职务	职责
吴海涛	技术负责人	审核验证方案和验证报告，组织验证过程中事件报告的调查。
黄春艳	生产经理	审核证方案，审核验证报告，按照验证方案的要求进行验证，收集验证数据，组织验证过程中事件报告的调查。

人员培训

方案实施前，由生产部组织培训，所有参加本次验证人员都要参加本次培训，本次培训以口头考核为准，培训参考公司文件《培训 11-QA-06》。培训考核结果如下：

培训师签名	培训日期	培训参加人员	结果	受训人签名
		吴海涛	<input checked="" type="checkbox"/> 通过 <input type="checkbox"/> 不通过	吴海涛
			<input checked="" type="checkbox"/> 通过 <input type="checkbox"/> 不通过	
			<input type="checkbox"/> 通过 <input type="checkbox"/> 不通过	
			<input type="checkbox"/> 通过 <input type="checkbox"/> 不通过	
			<input type="checkbox"/> 通过 <input type="checkbox"/> 不通过	

文件确认

验证前确定相应的验证方案及操作 SOP 已生效:

序号	文件名称	文件编号	文件生效日期
1	《脐带间充质干细胞制备工艺规程》		
2	《Countess™ 自动细胞计数仪操作及维护规程》		

检查人/日期:

设备

验证所用到的检验，测量仪器、仪表均应校验合格并在有效期内:

名称	设备型号	设备编号	校验有效期至	校验证书编号	符合要求
离心机					<input checked="" type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否
生物安全柜					<input checked="" type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否
二氧化碳培养箱					<input checked="" type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否
细胞计数仪					<input checked="" type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否
显微镜					<input checked="" type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否
流式细胞仪					<input checked="" type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否

检查人/日期: 吴海涛 2020.6.21 QA/日期:

4. Qualification 确认

验证内容

- 本次验证使用的为脐带间充质干细胞，事先通过一些处理，适当降低细胞的活率。
- D1 量子水滴在实验组六孔板外，分别在上部、左下角和右下角分部滴注 0.65ml，总量为 2ml 左右。连续拍打 50s 后计数。
- 分别将实验组和对照组按照每孔 6 万活细胞的数量进行接种，24h、48h 和 72h 后进行观察，拍照或计数，并流式检测细胞表型。

操作步骤

细胞处理

- 复苏培养 P5 代的脐带间充质干细胞，传代培养 3 天后状态良好，进行消化和计数。
- 将细胞重悬在 20ml 生理盐水里，室温放置 6h，然后检测活率。

D1 水处理

- 将对照组的细胞，计算活率，然后按照 6 万/孔的活细胞数量接种在 1 个 6 孔板中，摇匀后放置到培养箱里培养。
- 取另一个 6 孔板，分别在前 5 个孔里接种 6 万/孔的活细胞，最后一个孔里加入 2ml 的间充质干细胞悬液，总量为 200 万左右。
- 然后在实验组 6 孔板正上方的生物安全柜桌面上，以及 6 孔板左下角和右下角的安全柜桌面上分部滴上 650 微升 D1 量子水，总量为 2ml 左右。去掉 6 孔板的盖子，使 6 孔板保持开盖状态，连续敲击安全柜桌面 50s，然后吸取最后一个六孔板的孔里的细胞进行活率计算。剩下的孔的细胞盖上盖子后摇匀后放到 37 度培养箱里培养。

细胞扩增培养

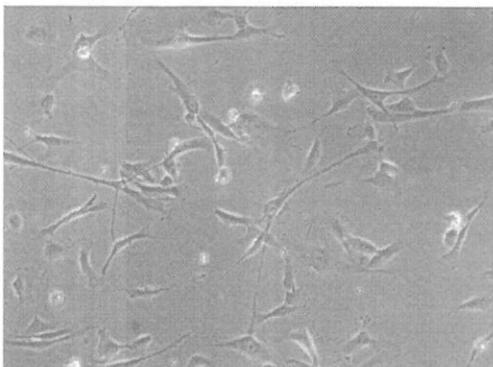
- 24h、48h 和 72h 后观察对照组和实验组的细胞生长状况，必要时拍照。
- 细胞长到 70%-80%密度时，消化细胞，然后计数。
- 细胞的表型鉴定。

5. Results 结果

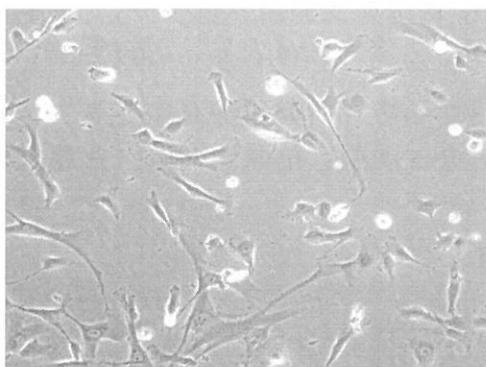
1. P5 代的细胞酶解计数为 3000 万, 重悬在 20ml 生理盐水中, 室温放置 6h 后, 活率计算为 75%。

2. D1 水处理后, 干细胞活率为 83%。

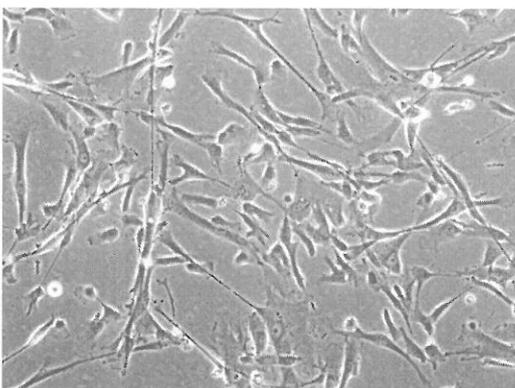
3. 对照组和实验组细胞培养 48h 和 72h, 细胞增殖情况没有太大差异。



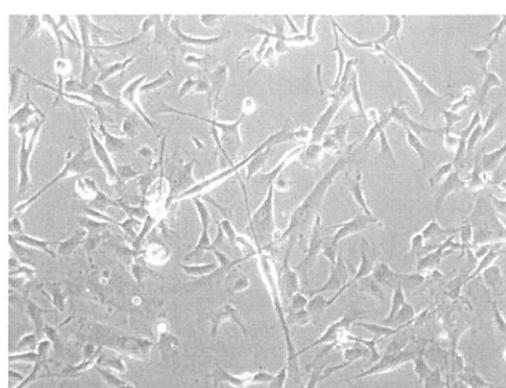
对照组 48h



实验组 48h



对照组 72h



实验组 72h

对照组和实验组细胞数量分别是 24 万/孔和 23 万/孔, 活率都为 95%左右, 没有统计学差异。

4. 流式表型分析

	CD73 ⁺	CD90 ⁺	CD105 ⁺	CD14 ⁺ 、 CD19 ⁺ 、 CD34 ⁺ 、 CD45 ⁺ 、
--	-------------------	-------------------	--------------------	--

				HLA-DR ⁺
对照组	99.5%	99.9%	99.1%	0.8%
实验组	99.9%	99.5%	99.9%	0.5%

间充质干细胞表型要求 CD73、CD90、CD105 $\geq 95\%$ ；CD11b、CD19、CD34、CD45、HLA - DR $\leq 2\%$ ，因此两者都符合要求。

6. Conclusion 结论

D1 量子水对脐带间充质干细胞的活率有提高作用，通过物理振动作用，使得 D1 量子水间接作用在间充质干细胞上，可以促进间充质干细胞活率的提高。

负责人：吴海清

2020.6.30

