

# 细胞种属鉴别检测试剂盒

## (多重 PCR 法)

### 说明书

货号：1801940

在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意点和常见问题！

版本：A/1

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

## ■ 试剂盒简介

WHO、FDA、欧洲药典及中国药典都规定了对于生产用细胞应进行细胞鉴别检查，以确认细胞系的起源，检测是否存在其他细胞系的污染。SHENTEK®细胞种属鉴别检测试剂盒利用线粒体基因细胞色素氧化酶 I (CO I) 和细胞色素 B (Cyt B) 以及细胞色素氧化 II (CO II) 作为生物制品生产常用的细胞系的分子鉴定靶标，使用混合引物对靶基因进行扩增，通过多重 PCR 联合琼脂糖凝胶电泳技术，根据扩增子的数量和条带大小进行物种鉴定和交叉污染检测。经验证交叉污染检测限可达到 1% 及以下，可在同一个反应中同时检测猪、人、猫、中国仓鼠、恒河猴、非洲绿猴、大鼠、狗、小鼠和牛 10 个物种。

本试剂盒所鉴别检测的 10 种细胞种属分别为：*Bos taurus* (牛) / *Mus musculus* (小鼠) / *Canis familiaris* (狗) / *Rattus norvegicus* (大鼠) / *Cercopithecus aethiops* (非洲绿猴) / *Macaca mulatta* (恒河猴) / *Cricetulus griseus* (中国仓鼠) / *Felis catus* (猫) / *Homo sapiens* (人) / *Sus scrofa* (猪)。

## ■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
DNA Sizing Templates MIX	NNA048	25 $\mu$ L $\times$ 2 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下
Cell Extraction Buffer	NNB015	1.25 mL $\times$ 4 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下
2 $\times$ Multiplex PCR Buffer	NNB016	320 $\mu$ L $\times$ 2 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下
DNA Sizing Primers MIX	NNC082	120 $\mu$ L $\times$ 2 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下
DEPC 水	NND052	1 mL $\times$ 2 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下
DL500 DNA Marker	/	1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下 融化后于 2-8 $^{\circ}$ C 保存，避免反复冻融。

## ■ 规格

25 Reactions  $\times$  2。

## ■ 有效期

规定储存条件下 24 个月，具体详见试剂盒标签。

## ■ 适用机型（包括但不限于）

- 博日 TC-EA 基因扩增仪
- 其他经过适用性验证的 PCR 扩增仪（包含定量 PCR 仪和普通 PCR 仪）

## ■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 八联管及其管盖
- 1.5 mL 无菌低吸附离心管
- 1000  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 10  $\mu$ L RNase Free 低吸附带滤芯枪头
- 核酸染料
- 6 $\times$  Loading Buffer (HZSKBio,1801942)
- 10 $\times$  TBE Buffer (HZSKBio,1801943)
- PBS 溶液（无菌）
- 琼脂糖

## ■ 相关设备

- 迷你离心机
- 漩涡振荡器
- PCR 仪
- 恒温金属浴
- 1000  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 10  $\mu$ L 移液枪
- 高速离心机
- 水平电泳槽（包含梳子、托盘、制胶器）
- 锥形瓶、量筒等制胶用具
- 电泳仪电源
- 凝胶成像仪
- 微波炉

## ■ 操作过程

(实验前请仔细完整阅读本说明书)

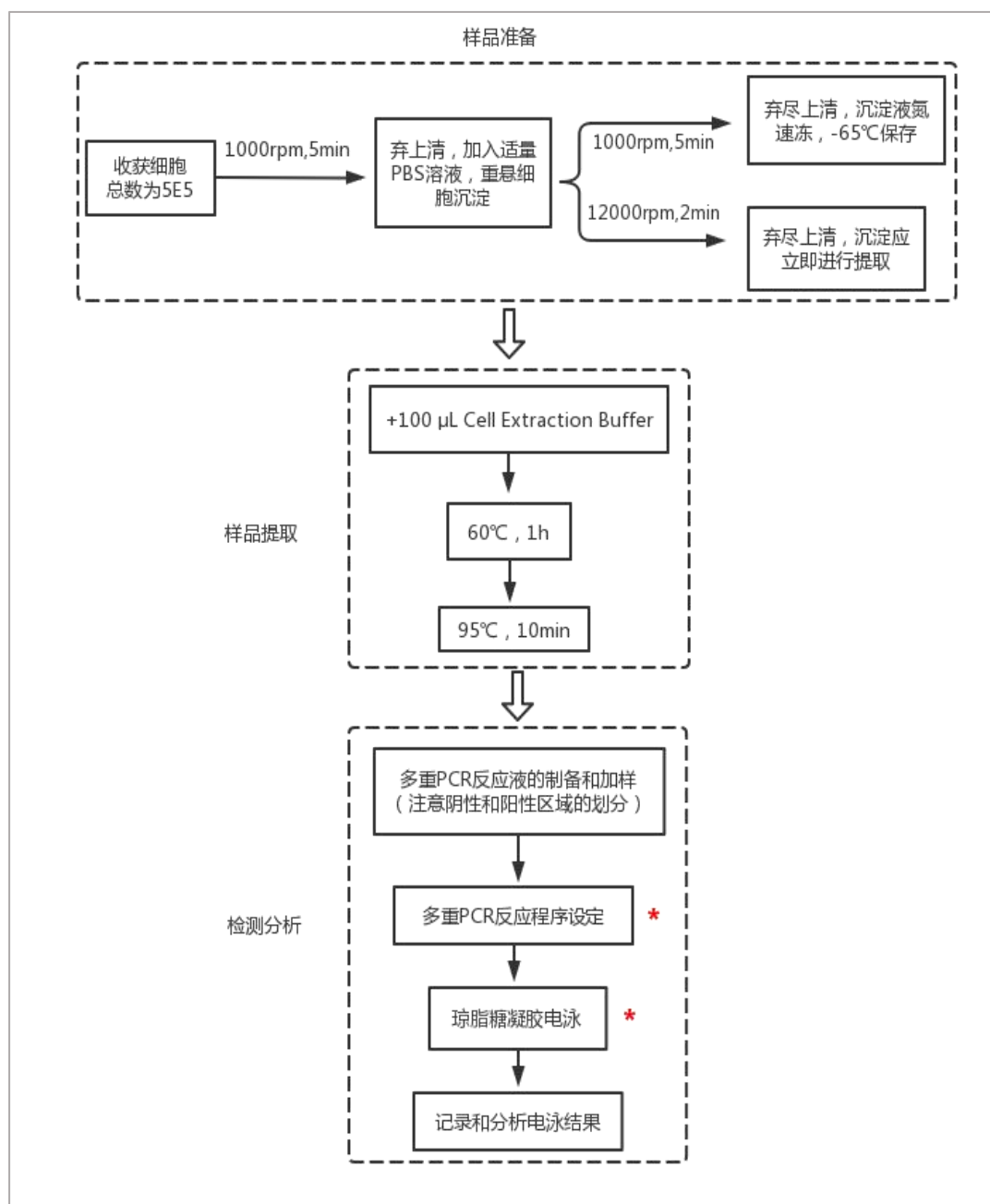


图 1 试剂盒操作流程示意图

注意: ►初次使用本试剂盒实验时需要注意仪器的适用性的验证, 包括 PCR 仪的程序设定和水平核酸电泳条件。具体验证方案请参考本试剂盒的使用指南。

## 一、制备细胞基因组 DNA 提取液（样品制备区）

### 1. 样品准备:

取  $5E+05$  个（细胞总数）新鲜培养的待测细胞置于 1.5 mL 离心管中，113g（约 1000rpm）离心 5 分钟尽可能弃掉培养基，在细胞沉淀中加 500  $\mu$ L PBS 溶液轻微振荡重悬，16260 g（约 12000rpm）离心 2 分钟尽可能将上清弃净。

注意：▶此步骤结束后需立即进行下一步，如果时间不允许需将样品置于-65 °C 及以下保存。

▶-65 °C 及以下保存前需进行以下操作： 以上细胞沉淀用 PBS 洗一遍后，113g（约 1000rpm）离心 5 分钟尽可能将上清弃净，液氮速冻 10-30 秒后置于-65 °C 及以下条件保存，建议保存时间不要超过一年。

### 2. 样品提取

在每管待测样品中分别加入 100  $\mu$ L Cell Extraction Buffer，立刻涡旋震荡混匀，之后置于 60 °C 的金属浴中处理 1 小时，接着 95 °C 处理 10 分钟，冷却至室温后直接作为后续 PCR 扩增的模板备用，存储温度-18 °C 及以下。

注意：▶制备好的样品-18 °C 及以下保存时间不要超过 1 个月，避免反复冻融。

### 3. 阴性质控 NCS

阴性质控 NCS 样品：100  $\mu$ L Cell Extraction Buffer，提取步骤同上样品处理。

## 二、制备多重 PCR 反应液和加样

为了避免污染，此步骤需要对实验环境进行阴性和阳性区间的划分。

### 1. 在阳性区间内对 DNA Sizing Templates MIX 进行稀释:

使用前取 18  $\mu$ L DEPC 水至 1 个新的 1.5 mL 离心管中，加入 2  $\mu$ L DNA Sizing Templates MIX，充分混匀后配成 DNA Sizing Templates MIX 工作液备用。

### 2. 在阴性区间内制备多重 PCR 的反应液

#### (1) 根据待测样品数量计算所需反应孔数:

反应孔数 = 1 个无模板对照 NTC+待测样品数+1 个阴性质控 NCS+1 个阳性质控 (DNA Sizing Ladder)

注意：▶DNA Sizing Ladder 是以 DNA Sizing Templates MIX 工作液为模板扩增的。

(2) 根据反应孔数计算本次所需的 PCR MIX 总量 (含有 1 孔的损失量):

$$\text{PCR MIX} = (\text{反应孔数} + 1) \times 17 \mu\text{L}$$

(3) 各试剂放在冰上或 2-8 °C 条件下融化, 并根据表 2 所示配制 PCR MIX:

表 2. PCR MIX 配制表

组分	单孔用量
2×Multiplex PCR Buffer	12.5 μL
DNA Sizing Primers MIX	4.5 μL
总体积	17 μL

### 3. 加样 (不同样品类型加样区域也不同)

将 PCR MIX 充分混匀后按照 17 μL/管分装至 8 联管中, 然后按表 3 所示进行加样:

表 3. 各反应孔加样示例

样品类型	加样示例	加样区域
待测样品	17 μL PCR MIX + 8 μL 待测样品基因组 DNA 提取液	样品制备区
阳性质控 (DNA Sizing Ladder)	17 μL PCR MIX + 8 μL DNA Sizing Templates MIX 的工作液	阳性区
无模板对照 NTC	17 μL PCR MIX + 8 μL DEPC 水	阴性区
阴性质控 NCS	17 μL PCR MIX + 8 μL 阴性质控 NCS	

注意: ➤加样完成后每孔总体积为 25 μL, 各区域间应避免交叉污染。

➤DNA Sizing Templates MIX 的工作液是 DNA Sizing Templates MIX 母液用 DEPC 水稀释 10 倍所得。

### 三、多重 PCR 反应

在 PCR 仪器上按照表 4 所示进行反应程序的设置

表 4. 多重 PCR 的反应程序

步骤	温度	时间	循环数
1	95 °C	5 分钟	1
2	95 °C	30 秒	25-30*
3	62 °C	3 分钟	
4	68 °C	30 秒	
5	68 °C	30 分钟	1
6*	4 °C	∞	1

注意: ➤反应程序步骤 2-4 的循环数可以根据实际情况进行调整, 初次测试推荐使用 28 个循环。

➤反应程序的步骤 6, 若 PCR 仪器无法设置, 需要在程序结束后尽快取出, 以防 PCR 扩增产物降解。

### 四、琼脂糖凝胶电泳

应在电泳间进行琼脂糖电泳, 注意电泳间、扩增间以及 PCR 反应液制备间(样品制备区、阴性区、阳性区)应各自配备一个房间。

#### 1. 制胶:

检测所用的琼脂糖凝胶比例为 2%, 具体计算公式如下:

$$2\% \text{凝胶 (w/v)} = (\text{琼脂糖 g} / 1 \times \text{TBE 缓冲液 mL}) \times 100\% + \text{适量核酸染料}$$

注意: ➤TBE 的工作液浓度为 1×, 配制工作液前请仔细观察母液 10×TBE 是否有沉淀析出, 若有析出请水浴加热 (37°C) 至沉淀完全消失。

➤核酸染料加入量请参照其产品说明书。

➤制胶所用梳子规格: 1.5mm, 25 齿/120mm; 托盘规格: 长度至少为 60mm。

#### 2. 点样:

PCR 扩增产物中需加入终浓度为 1×Loading Buffer, 上样量推荐 6-10 μL, 用 DL500 Marker 作为标记, 80-110 V 恒压跑电泳, 至溴酚蓝条带跑至接近凝胶 (胶的长度约为 60mm) 边缘处暂停电泳, 使用凝胶成像仪分析电泳结果。

- 注意: ➤PCR 扩增产物开盖时, 动作要轻柔避免扩增产物飞溅造成的交叉污染。
- 只能在电泳间进行开盖操作, 电泳间应与扩增间以及 PCR 反应液制备间严格区分, 避免交叉污染。
- PCR 扩增产物开盖点样后, 若所用管子为 8 联管(管子与盖子是分离的), 为了避免交叉污染建议使用新的管盖进行重新盖管。

## 五、记录和分析电泳结果

### 1. 观察参数设置:

凝胶成像仪以 Geno Sens 2200 为例, 相机设置: 分辨率: 超高, 曝光强度: 700 ms; 显示设置: 缩放为 fit, Low 200, High 65535。

注意: ➤凝胶成像仪不同其参数设置也尽不同, 但参数调整的原则一致。调整原则为: 若结果显示 DNA Sizing Ladder 10 条条带清晰可见(如图 2 泳道 11 所示), 则说明电泳条件和凝胶成像仪参数合适, 反之则需要继续调整或重新电泳。

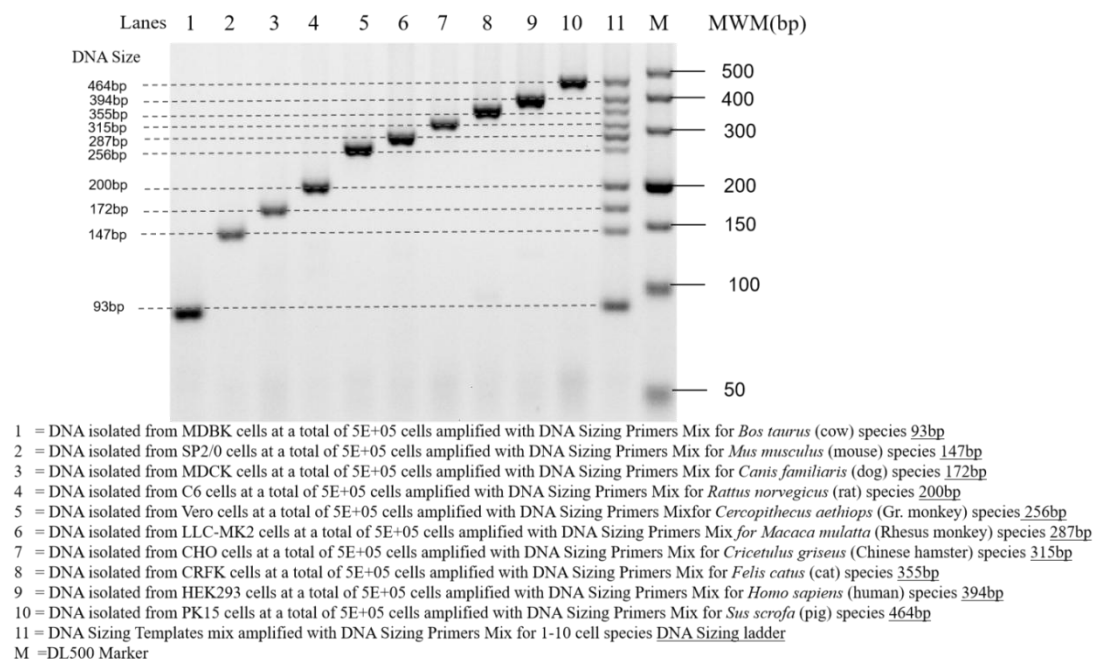


图 2: SHENTEK®细胞种属鉴别检测 PCR 产物电泳图(图片为反色呈现)

注: 泳道 1-10 是单一细胞系为模板的 PCR 扩增子;

泳道 11 是以 10 种细胞系为模板 PCR 扩增产物电泳分布。

### 2. 结果判定:

- (1) 无模板对照 NTC 和阴性质控 NCS 应无扩增条带检出;
- (2) 质控品 DNA Sizing Ladder 的凝胶电泳图应与图 2 泳道 11 分布一致, 且 10 条条带清晰可见;



- (3) 若待测样品的扩增子只有一条带，且大小与目标细胞种属的扩增子条带大小一致（目标细胞种属扩增子条带大小分布参考图 2），则该样品判定为无污染；
- (4) 若待测样品扩增子的电泳图出现两条或两条以上的电泳条带，且条带大小能与图 1 所示 10 个细胞种属的条带大小对应，则说明该样品存在其他种属污染，其污染种属可凭扩增子的大小推断（牛 93 bp、小鼠 147 bp、犬 172 bp、大鼠 200 bp、非洲绿猴 256 bp、恒河猴 287 bp、中国仓鼠 315 bp、猫 355 bp、人 394 bp、猪 464 bp）。
- (5) 为了结果的可靠性，建议对待检样品进行两次独立重复测试。
- (6) 如果遇见异常情况请联系我司技术支持。

修订日期：2023 年 05 月 21 日

生效日期：2023 年 05 月 23 日

## 服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

[www.shenkebio.com](http://www.shenkebio.com)

地址：浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: [Info@shenkebio.com](mailto:Info@shenkebio.com)

电话：0572-2165910