

# 细胞种属鉴别多重 PCR 法的优化及验证

吴雪伶<sup>1,2,3,4,△</sup>, 张琪梦<sup>5,△</sup>, 纳涛<sup>1,2,3,4</sup>, 魏山山<sup>5</sup>, 范珊珊<sup>1,2,3,4</sup>,  
宗伟英<sup>5</sup>, 孟淑芳<sup>1,2,3,4</sup>, 杨志行<sup>5</sup>

1. 中国食品药品检定研究院细胞资源保藏研究中心, 北京 102629; 2. 药品监管科学全国重点实验室, 北京 102629;
3. 细胞及基因治疗药物质量和非临床研究与评价北京市重点实验室, 北京 102629;
4. 卫生部生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 北京 102629;
5. 湖州申科生物技术股份有限公司, 浙江 湖州 313000

**摘要:** **目的** 对原有细胞种属鉴别多重 PCR 法进行再优化以及再验证, 使其可适用于不同检测机构及实验室的检测。**方法** 对猪、中国仓鼠、非洲绿猴和大鼠的引物序列及核酸提取方式、引物配比、参比细胞混合基因组 DNA 的配比、PCR 扩增程序及 DNA 模板用量进行优化, 对优化后的方法进行灵敏度、交叉污染检测限度及不同实验室间的复核验证。**结果** 优化后的方法可成功用于 10 个种属的细胞鉴别检测, 方法灵敏度可达 50 ~ 5 000 个细胞, 交叉污染的检测水平可达 1 : 100 ~ 1 : 10 000, 4 家不同实验室均能利用该方法成功对细胞进行检测。**结论** 优化后的细胞种属鉴别多重 PCR 法具有较好的专属性及检测细胞交叉污染的能力, 可用于不同实验室的细胞种属鉴别检测, 耐用性好, 将为生产及检定用细胞的质量控制提供有效的技术手段。

**关键词:** 细胞种属; 鉴别; 多重 PCR 法; 线粒体

中图分类号: Q-331 文献标识码: A 文章编号: 1004-5503(2026)02-0180-09

DOI:10.13200/j.cnki.cjb.004655

## Optimization and validation of multiplex PCR method for cell species identification

WU Xueling\*, ZHANG Qimeng, NA Tao, WEI Shanshan, FAN Shanshan,  
ZONG Weiyang, MENG Shufang, YANG Zhixing

\*Cell Collection and Research Center, National Institutes for Food and  
Drug Control, Beijing 102629, China

Corresponding authors: MENG Shufang, E-mail: mengsf@263.net;

YANG Zhixing, E-mail: zhixingy@shenkebio.com

**Abstract: Objective** To further optimize and validate the original cell species identification multiplex PCR method to make it applicable to different testing agencies and laboratories. **Methods** The primer sequences of pigs, Chinese hamsters, African green monkeys and rats, the methods of nucleic acid extraction, the ratios of primers and reference cell mixed genomic DNA, the PCR procedures of amplification and the DNA template dosage were optimized. The sensitivity and cross contamination limits of the optimized method were validated, and reviewed and verified across different laboratories. **Results** The optimized method was successfully used for cell identification and detection of 10 species, with a sensitivity of 50 - 5 000 cells and a detection level of cross contamination of 1 : 100 - 1 : 10 000. Four different laboratories could use this method to successfully detect cells. **Conclusion** The optimized cell species identification multiplex PCR method has good specificity and ability to detect cell cross contamination, and can be used for cell species identification in different laboratories with good robustness, which will provide effective technical means for quality control of cells used in production and testing.

**Keywords:** Cell species; Identification; Multiplex PCR method; Mitochondria

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFA1101601); 北京市科技计划(Z221100007922015); 国家药典委员会药品标准制修订研究课题(2019-S09); 国家生物医学实验细胞资源库(NSTI-BMCR2401).

通信作者: 孟淑芳, E-mail: mengsf@263.net; 杨志行, E-mail: zhixingy@shenkebio.com

△: 共享第一作者

细胞广泛应用于生物制药领域,包括用作疫苗等生物制品的生产用细胞基质,以及直接用于疾病治疗的细胞治疗性产品。而随着细胞的应用越来越广泛,细胞的混淆和交叉污染问题也日趋严重<sup>[1-4]</sup>,直接影响试验数据的可靠性以及产品的安全性和有效性,因此,应对细胞进行充分鉴定,防止细胞错误使用或细胞间交叉污染。现行《中国药典》三部(2025版)生物制品通则0234“生物制品生产用动物细胞基质制备及质量控制”中也明确规定细胞应进行鉴别试验,以确认所用细胞正确,且无其他细胞的交叉污染,同时列举了可用于细胞鉴别的多种方法,包括细胞形态观察、生物化学法、免疫学检测、细胞遗传学检测、遗传标志检测等,这些方法从粗到细又可分为不同的鉴别层次,包括种属鉴别、细胞株鉴别及专属性鉴别。

种属鉴别主要是对细胞来源宿主的种属进行鉴定,传统的细胞种属鉴别方法包括同工酶法<sup>[5-9]</sup>和染色体核型分析方法<sup>[10-13]</sup>等,这些方法虽为经典方法,但操作繁琐,重复性差,对操作人员要求高,无法准确、高通量地用于细胞的检测。基于常规检测方法存在的多种局限性,这些方法已不适用于目前的细胞检定工作,迫切需要开发快速、准确、灵敏、低成本的新检测方法,并形成药典通则,以满足行业发展的需求。目前,新的种属鉴别技术主要是基于细胞DNA的检测方法,大多先利用PCR进行靶基因的扩增,再对扩增产物进行检测,如种属鉴别PCR法<sup>[3,7,14]</sup>、DNA条形码法<sup>[15-20]</sup>、随机扩增多态性DNA(randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)法<sup>[21-23]</sup>、PCR-扩增片段长度多态性(PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)法<sup>[24-25]</sup>,这些方法非常灵敏,可对DNA量非常有限的样本进行检测,同时具有操作简单、经济等优点,其中种属鉴别PCR法是细胞种属鉴定中应用最为广泛的方法之一。

种属鉴别PCR法是基于多对种属特异引物对某个特定基因进行扩增及检测的种属鉴别方法。中国食品药品检定研究院细胞资源保藏研究中心在2014年即建立了基于线粒体细胞色素b序列差异的细胞种属鉴别多重PCR法<sup>[26]</sup>,该方法可通过混合引物单PCR反应高效、敏感地检测10种常见动物种属细胞,并有效判断种属间细胞的交叉污染,即将针对10个物种的引物混合,使用混合引物对细胞色素b基因进行扩增,根据琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段长度的不同来区分不同的物种,实现了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。该方法在本中心已成功应用

多年,但在对该方法进行多实验室的方法复核验证中发现,不同实验室利用该方法进行检测时,各种属的特异性扩增条带不能全部扩增出,且会有多条非特异性扩增条带,表明该方法耐用性较差。因此,本研究在原有方法的基础上,对引物序列和反应条件进行了再优化,并进行优化后方法的再验证,以期建立可适用于不同检测机构及实验室的细胞种属鉴别方法,进一步提升生产及科研用细胞的质量。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞株及阳性质控(DNA sizing ladder)** 本研究所用细胞株均为中国食品药品检定研究院细胞资源保藏研究中心保存,细胞信息见表1,利用DNA条形码法鉴定均显示细胞种属正确;阳性质控为10个种属的细胞提取的基因组DNA按照一定比例混合得到的混合基因组DNA。

表1 各种属细胞信息

Tab. 1 Information on various species of cells

序号	种属	细胞	细胞库编号
1	猪	PK15	CCBC067
2	人	HEK293	CCBC047-2
3	中国仓鼠	CHO-K1(后文简写为CHO)	CCBJ052
4	恒河猴	LLC-MK2	CCBC070
5	非洲绿猴	Vero	CCBJ001
6	犬	MDCK	CCBC020
7	小鼠	SP2 / 0	CCBB001
8	牛	MDBK	CCBC071
9	猫	CRFK	CCBC030
10	大鼠	C6	CCBC031

**1.2 主要试剂** 细胞基因组DNA提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司(货号:DP304-02);细胞裂解液(Cell Extraction Buffer,货号:NNB015)和核酸扩增试剂2×Multiplex PCR Buffer(货号:NNB016)购自浙江湖州申科生物技术股份有限公司。

### 1.3 方法的优化

**1.3.1 引物** 在原有方法引物序列的基础上,采用在线PCR引物设计程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>),结合Gene Runner序列分析软件,对4个物种(猪、中国仓鼠、非洲绿猴和大鼠)的引物序列进行优化,其余6个物种(人、猫、恒河猴、犬、小鼠和牛)的引物序列不变,优化的原则是提高检测的特异性和优化PCR反应的退火温度,尽可能使各引物的反应条件保持一致。引物序列及对应的

基因及位置见表 2。利用优化后的引物分别对 10 个种属的细胞基因组 DNA 进行扩增,验证引物的特异性。PCR 反应体系为:2 × Multiplex PCR Buffer 12.5 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,细胞基因组 DNA(1 ng/μL)11.5 μL,共 25 μL。反应条件为:95 °C 5 min;95 °C 30 s,62 °C 3 min,68 °C 30 s,共 30 个循环;68 °C 30 min。扩增结束后进行产物检测和分析。

**1.3.2 核酸提取方式** 分别收集 10 个种属的 5 × 10<sup>5</sup> 个细胞悬液,200 × g 离心 5 min,吸弃上清,细胞沉淀用于核酸提取。使用核酸提取试剂盒以及细胞裂解液分别对样本进行核酸提取,其中试剂盒提取按照试剂盒说明书进行,对得到的细胞基因组 DNA 进行定量,并调整 DNA 浓度至 1 ng/μL;细胞裂解液制备细胞核酸粗提物:在细胞沉淀中加入 100 μL Cell Extraction Buffer,重悬细胞沉淀,涡旋振荡混匀,将样品置于 60 °C 金属浴中处理 1 h,95 °C 孵育 10 min,得到的样品即为细胞核酸粗提物。以两种方式提取的核酸进行 PCR 检测,反应体系为:2 × Multiplex PCR Buffer 12.5 μL,混合引物 4.5 μL,细胞基因组 DNA 或细胞核酸粗提物 8 μL,DEPC 水补足反应体系至 25 μL;反应条件同 1.3.1 项。扩增结束后进行产物检测和分析。

**1.3.3 引物和参比细胞混合基因组 DNA 的配比** 用 DEPC 水将优化后的引物分别配制成 100 μmol/L 的浓度作为贮存液,并按表 3 分别配制混合引物体系 1~3;将 10 个种属的细胞基因组 DNA 按表 4 比例分别配制体系 1~3。将 3 种混合引物体系分别搭配对应序号的混合基因组 DNA 体系进行 PCR 扩增。反应体系为:2 × Multiplex PCR Buffer 12.5 μL,混合引物 4.5 μL,混合细胞基因组 DNA 8 μL,DEPC 水补足反应体系至 25 μL。将配制好的 PCR 反应液混匀后置于 PCR 仪进行扩增,反应条件同 1.3.1 项。扩增结束后进行产物检测和分析。

**1.3.4 扩增程序** 制备不同细胞的混合模型,在 5 E5 个 Vero 细胞中添加 MDCK、CHO 和 HEK293 细胞,添加细胞数均为 5 E3 个,作为细胞组合 1;在 5 E5 个 CHO 细胞中添加 MDCK、Vero 和 HEK293 细胞,添加细胞数均为 5 E3 个,作为细胞组合 2。制备两种细胞组合样品的细胞核酸粗提物,并以细胞粗提物和 10 种混合细胞基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。反应体系为:2 × Multiplex PCR Buffer 12.5 μL,混合引物 4.5 μL,细胞裂解液 8 μL,DEPC 水补足反应体系至 25 μL。将配制好的 PCR 反应液混匀后置于 PCR 仪,采用不同的扩增程序(表 5)进行 PCR 扩增,扩增结束后进行产物检测和分析。

表 2 种属鉴别 PCR 法的引物序列

Tab. 2 Primer sequences for species identification PCR method

来源	基因名称	登录号	位置	优化后或重新设计的引物序列(5'→3')	产物大小(bp)
<i>Homo sapiens</i> (人)	<i>COX1</i>	MT872644.1	6 994-7 023 7 361-7 387	TAGACATCGTACTACACGACACGTACTACG CACTCCAGGTTTATGGAGGGTCTTCT	394
<i>Sus scrofa</i> (猪)	<i>COX1</i>	ON060839.1	9 844-9 868 10 279-10 307	CGGTGAATAGGAAGATGAAGCCAG TCTACTATCCCTGCCAGTCTAGCAGCTG	464
<i>Felis catus</i> (猫)	<i>COX1</i>	NC_001700.1	7 148-7 169 7 474-7 502	TATTGCCATTCTACCCGGGTG GTGCTGAGGAAGAACGTTATATTGACTC	355
<i>Cricetulus griseus</i> (中国仓鼠)	<i>Cytochrome b</i>	AB033693.1	522-543 815-836	ACTAACCCGCTTCTTCGCATTC GCGTAGGCCGAACAGGAAGTATC	315
<i>Macaca mulatta</i> (恒河猴)	<i>COXII</i>	NC_005943.1	7 536-7 559 7 796-7 822	CCCACCCAGTCAACTAAGCCTAC GATGCTGAAGGATGGGTCAATTGACTTC	287
<i>Cercopithecus aethiops</i> (非洲绿猴)	<i>COX1</i>	AY863426.1	5 652-5 681 5 878-5 907	CCTGCTACTTATGGGATCAACCATAATCGA TAGGATTGCTGTGATTAGGACAGATCAGAC	256
<i>Rattus norvegicus</i> (大鼠)	<i>COX1</i>	NC_001665.2	6 036-6 057 6 210-6 232	CTTCGGCCACCAGAACTGTAC AGGCTCGGGTGTCTACATCTAGG	200
<i>Canis familiaris</i> (犬)	<i>COX1</i>	MN181405.1	5 466-5 491 5 618-5 637	GAAGTAGGTCAGCCCGTACTTTACT TTCGGGGAATGCCATGTCC	172
<i>Mus musculus</i> (小鼠)	<i>COX1</i>	KY018919.1	5 898-5 925 6 019-6 044	ACAGCCGTACTGCTCCTATTATCACTAC CCCAAAGAATCAGAACAGATGCTGGT	147
<i>Bos taurus</i> (牛)	<i>COX1</i>	MZ087698.1	6 548-6 574 6 617-6 640	GCTATTCCAACCGGGTAAAAGTCTTC GCCTAGGGCTCACATTATAGCAGG	93

注:第 5 列中斜体部分代表重新优化的序列。

**表 3** 混合引物的配比

**Tab. 3** Ratios of mixed primers

细胞种属	终浓度(nmol / L)		
	体系 1	体系 2	体系 3
人	100	100	50
中国仓鼠	600	200	100
恒河猴	70	70	70
猪	400	400	200
大鼠	80	80	80
小鼠	70	70	70
非洲绿猴	400	200	100
犬	180	180	180
牛	200	200	200
猫	100	100	50

**表 4** 混合细胞基因组 DNA 的配比

**Tab. 4** Ratios of mixed cell genomic DNA

细胞种属	终浓度(ng / $\mu$ L)		
	体系 1	体系 2	体系 3
牛 MDBK	1	1	1
小鼠 SP2 / 0	1	1	1
犬 MDCK	1	1	1
大鼠 C6	1	1	1
非洲绿猴 Vero	1	1	1
恒河猴 LLC-MK2	0.5	1	1
中国仓鼠 CHO	6	3	1
猫 CRFK	1	1	1
人 HEK293	1	1	1
猪 PK15	4	4	1

**表 5** 检测的扩增程序

**Tab. 5** Amplification programs for testing

步骤	程序 1		程序 2		程序 3		循环数
	温度( $^{\circ}$ C)	时间	温度( $^{\circ}$ C)	时间	温度( $^{\circ}$ C)	时间	
1	95	5 min	95	5 min	95	5 min	1
2	95	30 s	95	30 s	95	30 s	30
3	62	3 min	62	3 min	62	90 s	
4	68	30 s	72	30 s	72	30 s	
5	68	30 min	72	30 min	72	30 min	1

**1.3.5 模板用量** 制备不同细胞的混合模型,以 MDCK、VERO、CHO 和 HEK293 中的一种为主细胞,添加另外 3 种细胞,其中主细胞数均为 5 E5 个,各添加细胞数均为 5 E3 个。制备 4 种组合样品的细胞核酸粗提物,并以粗提物和 10 种混合细胞基因组 DNA 为模

板,分别以 8 和 4  $\mu$ L 的模板用量进行 PCR 扩增。反应体系为:2  $\times$  Multiplex PCR Buffer 12.5  $\mu$ L,混合引物 4.5  $\mu$ L,加入 8 或 4  $\mu$ L 模板,DEPC 水补足反应体系至 25  $\mu$ L。将配制好的 PCR 反应液混匀后置于 PCR 仪进行扩增,反应条件同 1.3.1 项。扩增结束后进行产物检测和分析。

**1.4 方法的验证**

**1.4.1 灵敏度** 制备 10 个种属不同细胞数量的细胞样品,除 CHO 细胞数分别为 5 E5、5 E4、5 E3 和 5 E2 个外,其余 9 个种属细胞样品数量均分别为 5 E5、5 E3、5 E2 和 5 E1 个。制备各样品细胞核酸粗提物,并利用优化后的 PCR 程序进行 PCR 扩增,评估方法的灵敏度。

**1.4.2 交叉污染检测限度** 制备污染细胞添加模型,以 MDCK、Vero、CHO 和 HEK293 中的一种细胞为主细胞,在 5 E5 个主细胞中分别添加不同数量的其余 3 种细胞,添加细胞数为 50 ~ 5 000 个,对应添加比例为 1 : 10 000 ~ 1 : 100。针对各样品制备细胞核酸粗提物,并利用优化后的 PCR 程序进行 PCR 扩增,评估方法的交叉污染检测限度。

**1.4.3 复核验证** 复核验证单位包括 3 家药品检验机构(A ~ C)及 1 家生物制药公司(D)。复核验证样本包括 8 个种属的盲样,编号分别为 S1 ~ S8,细胞种属依次为非洲绿猴、人、中国仓鼠、牛、猪、恒河猴、小鼠和犬,同时包括 1 份交叉污染样本 S9,为在非洲绿猴细胞中按 500 : 1 掺入人细胞。各复核验证单位接收到样本后,按照验证方案对样本进行检测及分析。

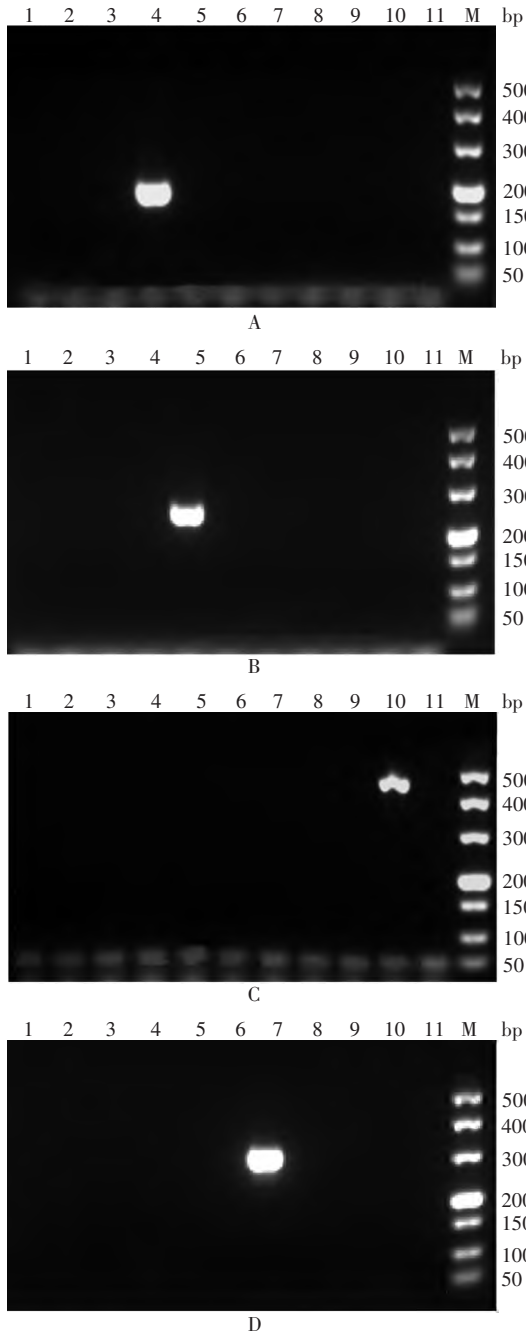
**1.5 PCR 产物的检测及分析** 配制含凝胶染色剂的 2% 琼脂糖凝胶,将 PCR 产物 5  $\mu$ L 加入上样孔中,进行琼脂糖凝胶电泳,使用 DNA marker DL500 或 50 bp DNA ladder 作为标记,80 ~ 110 V 恒压跑电泳,至溴酚蓝条带跑至接近凝胶(胶长至少为 60 mm)边缘处停止电泳,将凝胶置于凝胶成像系统中观察结果并照像。若结果显示阳性质控 10 条条带清晰可见且位置正确(猪:464 bp,人:394 bp,猫:355 bp,中国仓鼠:315 bp,恒河猴:287 bp,非洲绿猴:256 bp,大鼠:200 bp,犬:172 bp,小鼠:147 bp,牛:93 bp),则表明电泳条件合适,待测样品可通过与 marker 或阳性质控比对条带大小,判定待测细胞的种属;若待测样品有 2 条及以上扩增条带,可判定为细胞交叉污染,需与 marker 或阳性质控的扩增条带进行比对,判断污染的细胞种属。

**1.6 数据采集及分析** 采用 CLINX Geno Sens 2200 凝胶成像系统进行图像采集,配套的 GenoSens Capture 软件用于后续图像分析。

## 2 结果

### 2.1 方法的优化

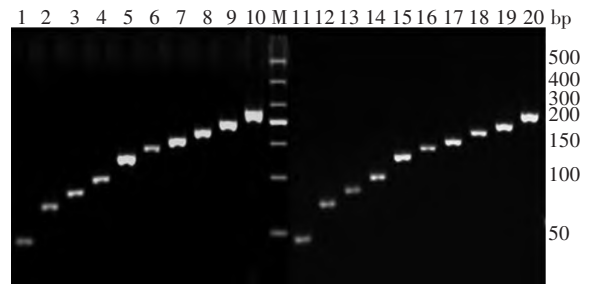
**2.1.1 引物** 利用优化后的引物对10个物种的细胞基因组DNA分别进行检测,优化后的引物只在对应种属的样品上扩增出单一条带,其他9个种属的细胞样品上均无扩增,见图1。表明优化后的引物具有较高的特异性。



A:大鼠引物;B:非洲绿猴引物;C:猪引物;D:中国仓鼠引物;1:MDBK;2:SP2/0;3:MDCK;4:C6;5:VERO;6:LLC-MK2;7:CHO;8:CRFK;9:HEK293;10:PK15;11:水;M:DNA marker DL500。

**图1** 优化后的引物对不同种属细胞样品的扩增产物电泳图  
**Fig. 1** Electrophoretic diagram of amplification products of cell samples of different species with optimized primers

**2.1.2 核酸提取方式** 使用核酸提取试剂盒以及细胞裂解液分别对10个种属的细胞样本进行核酸提取,两种方法提取的核酸均可扩增出特异条带,两种方法均可用,见图2。由于使用细胞裂解液获得细胞核酸粗提物操作更为简便,因此,后续使用细胞核酸粗提物作为反应的模板。

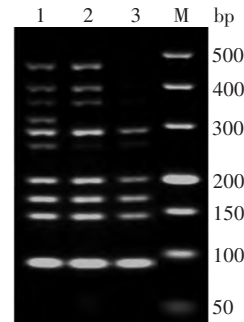


1~10:细胞粗提物;11~20:细胞基因组DNA;1,11:MDBK;2,12:SP2/0;3,13:MDCK;4,14:C6;5,15:VERO;6,16:LLC-MK2;7,17:CHO;8,18:CRFK;9,19:HEK293;10,20:PK15;M:DNA marker DL500。

**图2** 不同核酸提取方式扩增产物电泳图

**Fig. 2** Electrophoretic diagram of amplification products with different nucleic acid extraction methods

**2.1.3 引物和参比细胞混合基因组DNA的配比** 体系1中10个种属的条带清晰可见,且大小正确,体系2和3有个别条带缺失,见图3。因此,选择混合引物体系1和混合基因组DNA体系1用于PCR扩增。



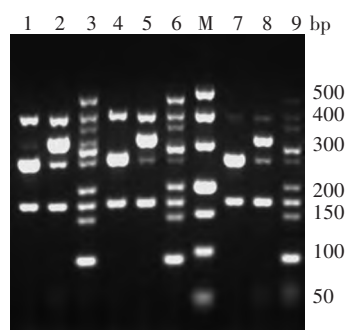
1:引物体系1及混合基因组DNA体系1;2:引物体系2及混合基因组DNA体系2;3:引物体系3及混合基因组DNA体系3;M:DNA marker DL500。

**图3** 引物和混合细胞基因组DNA配比优化扩增产物电泳图

**Fig. 3** Electrophoretic diagram of amplification products with optimized ratios of primers and mixed cell genomic DNA

**2.1.4 扩增程序** 使用程序1扩增,所有组目的条带均清晰可见;而使用程序2和3扩增,均存在CHO条

带的缺失。见图4。因此选择程序1作为本方法的扩增程序。

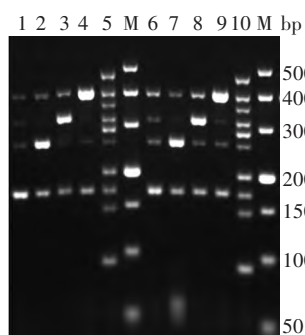


1,4,7:模板分别为5 E5个Vero细胞中添加5 E3个MDCK、CHO和HEK293细胞;2,5,8:模板分别为5 E5个CHO细胞中添加5 E3个MDCK、Vero和HEK293细胞;3,6,9:模板分别为10个种属的混合细胞基因组DNA;1~3:程序1扩增;4~6:程序2扩增;7~9:程序3扩增;M:DNA marker DL500。

图4 不同扩增程序扩增产物电泳图

Fig. 4 Electrophoretic diagram of amplification products with different amplification programs

**2.1.5 模板用量** 模板量为8 μL的扩增条带比4 μL的更亮,见图5。因此,选择8 μL的模板量用于PCR扩增。



1,6:模板为5 E5个MDCK细胞中掺入5 E3个CHO、Vero和HEK293细胞;2,7:模板为5 E5个Vero细胞中掺入5 E3个MDCK、CHO和HEK293细胞;3,8:模板为5 E5个CHO细胞中掺入5 E3个MDCK、Vero和HEK293细胞;4,9:模板为5 E5个HEK293细胞中掺入5 E3个MDCK、CHO和Vero细胞;5,10:模板为10个种属的混合细胞基因组DNA;1~5:模板量为4 μL;6~10:模板量为8 μL;M:DNA marker DL500。

图5 不同模板用量扩增产物电泳图

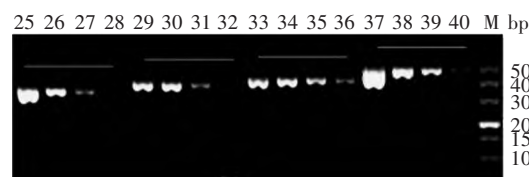
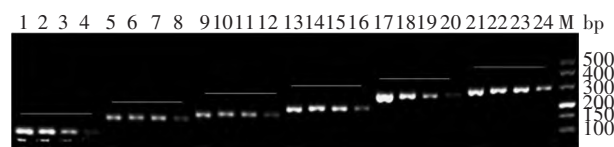
Fig. 5 Electrophoretic diagram of amplification products with different amount of templates

**2.1.6 优化后的方法操作程序** 利用细胞裂解液对5 E5个细胞沉淀进行细胞核酸的粗提,根据混合引物体系1配制混合引物。PCR反应体系为:2 × Mul-

tiplex PCR Buffer 12.5 μL,混合引物4.5 μL,细胞基因组粗提物8 μL,加水补充总反应体系至25 μL。将配制好的PCR反应液混匀后置于PCR仪进行扩增,反应条件为:95 °C 5 min;95 °C 30 s,62 °C 3 min,68 °C 30 s,共30个循环;68 °C 30 min。试验中同时设无模板对照(NTC,DEPC水代替细胞核酸粗提物)、阴性对照(NCS,模板为无细胞沉淀的粗提对照)、阳性质控(PC,模板为按体系1配置的10个种属细胞混合DNA)。

**2.2 方法的验证**

**2.2.1 灵敏度** 除中国仓鼠CHO细胞的灵敏度为5 000个,猫CRFK细胞的灵敏度为500个,其他8个种属细胞的灵敏度均为不高于50个,见图6。因此,该方法的检测灵敏度为50~5 000个细胞。



1:MDBK-5E5;2:MDBK-5E3;3:MDBK-5E2;4:MDBK-5E1;5:SP2/0-5E5;6:SP2/0-5E3;7:SP2/0-5E2;8:SP2/0-5E1;9:MDCK-5E5;10:MDCK-5E3;11:MDCK-5E2;12:MDCK-5E1;13:C6-5E5;14:C6-5E3;15:C6-5E2;16:C6-5E1;17:Vero-5E5;18:Vero-5E3;19:Vero-5E2;20:Vero-5E1;21:LLC-MK2-5E5;22:LLC-MK2-5E3;23:LLC-MK2-5E2;24:LLC-MK2-5E1;25:CHO-5E5;26:CHO-5E4;27:CHO-5E3;28:CHO-5E2;29:CRFK-5E5;30:CRFK-5E3;31:CRFK-5E2;32:CRFK-5E1;33:HEK293-5E5;34:HEK293-5E3;35:HEK293-5E2;36:HEK293-5E1;37:PK15-5E5;38:PK15-5E3;39:PK15-5E2;40:PK15-5E1;M:DNA marker DL500。

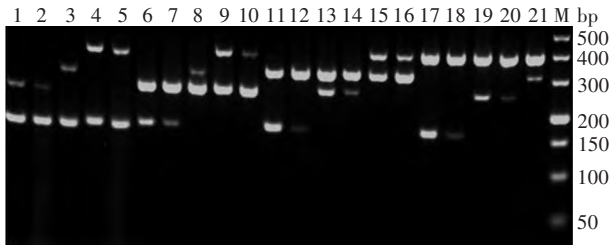
图6 方法的灵敏度验证

Fig. 6 Verification for sensitivity

**2.2.2 交叉污染检测限度** CHO污染比例达1:100、Vero污染比例达1:1 000或1:10 000、HEK293污染比例达1:1 000、MDCK污染比例达1:10 000时,均能成功检测到污染细胞,见图7。因此,本方法检测交叉污染的水平可达1:100~1:10 000。

**2.2.3 复核验证** 各复核验证实验室使用我单位提供的检测试剂对8个种属来源的细胞沉淀样本(编号S1~S8)和1种交叉污染样本(编号S9)进行多重PCR检测,8个种属细胞均能扩增得到单一、特异的

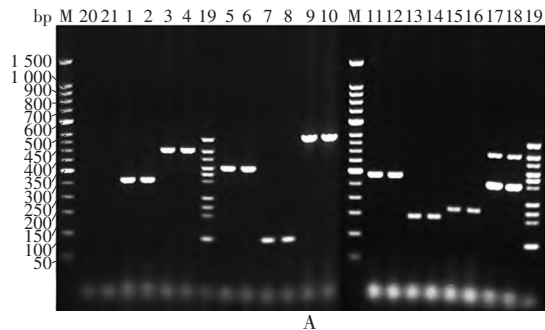
条带,且根据扩增条带大小,4家实验室均可正确判定各样品的种属来源;对1种交叉污染样本进行检测,4家实验室均能扩增得到2条特异性扩增条带,并可根据条带大小位置正确判定样本中的主细胞和污染细胞种属。见图8。表明优化后的多重PCR检测方法适用于不同实验室细胞种属的鉴别及细胞之间交叉污染的检测。



1:MDCK细胞添加Vero细胞(比例为1 000 : 1);2:MDCK细胞添加Vero细胞(比例为10 000 : 1);3:MDCK细胞添加CHO细胞(比例为100 : 1);4:MDCK细胞添加HEK293细胞(比例为100 : 1);5:MDCK细胞添加HEK293细胞(比例为1 000 : 1);6:Vero细胞添加MDCK细胞(比例为1 000 : 1);7:Vero细胞添加MDCK细胞(比例为10 000 : 1);8:Vero细胞添加CHO细胞(比例为100 : 1);9:Vero细胞添加HEK293细胞(比例为100 : 1);10:Vero细胞添加HEK293细胞(比例为1 000 : 1);11:CHO细胞添加MDCK细胞(比例为1 000 : 1);12:CHO细胞添加MDCK细胞(比例为10 000 : 1);13:CHO细胞添加Vero细胞(比例为100 : 1);14:CHO细胞添加Vero细胞(比例为1 000 : 1);15:CHO细胞添加HEK293细胞(比例为100 : 1);16:CHO细胞添加HEK293细胞(比例为1 000 : 1);17:HEK293细胞添加MDCK细胞(比例为1 000 : 1);18:HEK293细胞添加MDCK细胞(比例为10 000 : 1);19:HEK293细胞添加Vero细胞(比例为100 : 1);20:HEK293细胞添加Vero细胞(比例为1 000 : 1);21:HEK293细胞添加CHO细胞(比例为100 : 1);M:DNA marker DL500。

图7 交叉污染的检测限度分析

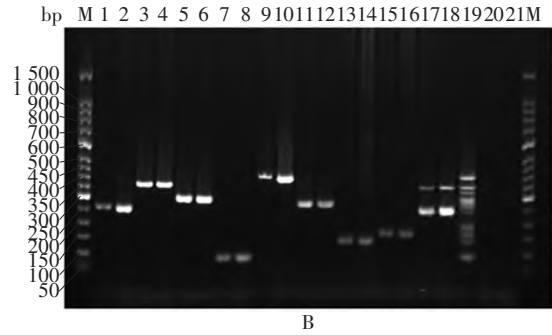
Fig. 7 Limit detection of cross contamination



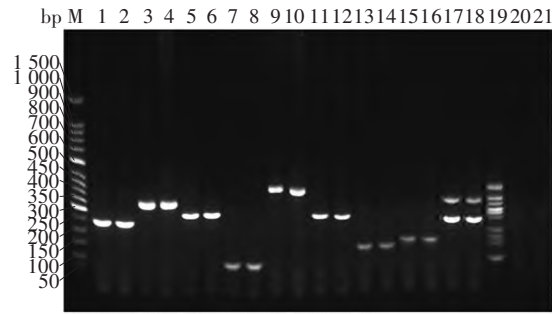
A ~ D: 分别为4家复核验证实验室(1,2:S1;3,4:S2;5,6:S3;7,8:S4;9,10:S5;11,12:S6;13,14:S7;15,16:S8;17,18:S9;19:10个种属的混合细胞基因组DNA;20:NTC;21:NCS;M:50 bp DNA ladder)。

图8 复核验证结果

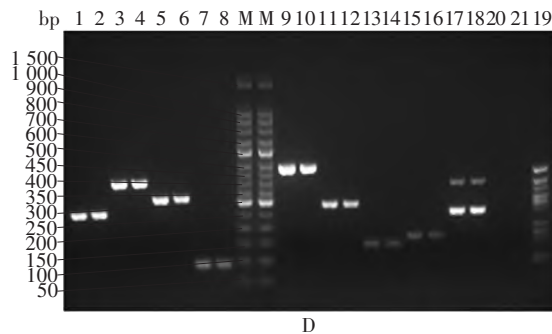
Fig. 8 Review and verification results



B



C



D

A ~ D: 分别为4家复核验证实验室(1,2:S1;3,4:S2;5,6:S3;7,8:S4;9,10:S5;11,12:S6;13,14:S7;15,16:S8;17,18:S9;19:10个种属的混合细胞基因组DNA;20:NTC;21:NCS;M:50 bp DNA ladder)。

续图8 复核验证结果

Fig. 8 (Continued) Review and verification results

### 3 讨论

对生产或检定用细胞进行种属鉴定,保证所用细胞正确,是保证产品安全、有效及检定数据真实、可靠的前提。本研究通过对本实验室已有的多重PCR法进行多参数优化,包括引物序列、核酸提取方式、引物和参比细胞混合基因组DNA的配比、扩增程序和模板用量,建立了高效、灵敏的种属鉴别方法,可实现一个反应中对10个细胞种属的鉴定,检测细胞灵敏度可达50~5 000个细胞,同时在交叉污染的检测上灵敏度也较高,可检测到1 : 10 000的细胞污染,比传统方法如同工酶法检测交叉污染的灵敏度(约1 : 100)高100倍,比DNA条形码法(1 : 10)

高1 000倍。同时,如污染的细胞种属是方法可检测范围内的种属,可直接判定所污染的种属种类,直观、高效。更重要的是,本研究解决了原方法在不同实验室应用时发生的非特异性反应问题,通过对反应体系的不断优化和调整,实现了方法在不同实验室的成功应用,使该方法具有高度的耐用性。

本方法也存在自身的局限性,首先,针对每个种属仅采用1种常见的生产用细胞株进行验证,未对其他细胞株进行适用性研究,因此,在后续的方法应用中,如遇到个别细胞株因线粒体基因变异等原因导致非特异性扩增或扩增产物大小与理论大小不符的情况,可对非特异性扩增产物或片段大小异常产物进行序列测定及分析,以确定待检细胞的种属及是否为细胞交叉污染;其次,该方法所能鉴定的种属虽已能够覆盖生产中常见的细胞基质种类,但数量仍相对有限,如待检细胞不在本方法中覆盖的10个种属范围内,还需在反应体系中增加相应种属的引物,并进行方法的优化和验证,或结合其他方法(如DNA条形码法)进行检测;另外,本研究中的PCR体系为经验证的反应体系,如需更改PCR体系成分如扩增酶,可能会对扩增结果存在影响,出现扩增不出某条或某几条目的条带,或产生非特异性扩增条带的情况,使用者可根据所用扩增酶的特性对反应体系和反应条件进行优化和调整,但应对优化或调整后的反应体系进行验证,确保其检测结果的可靠性,并达到较高的污染检测灵敏度。

综上所述,本研究建立了一种简单、经济、快速、灵敏及耐用性好的细胞种属鉴别方法,对于基础研究及生物制药领域的细胞鉴定和交叉污染的检测提供了新的技术手段,为进一步提高研究数据的可靠性及产品的安全性奠定了基础。

**利益冲突** 所有作者声明无利益冲突

#### 参考文献

- [1] NELSON-REES W A, FLANDERMEYER R R, HAWTHORNE P K. Banded marker chromosomes as indicators of intraspecies cellular contamination [J]. *Science*, 1974, 184 (4141): 1093-1096.
- [2] DIRKS W, MACLEOD R A, JAGER K, et al. First searchable database for DNA profiles of human cell lines: sequential use of fingerprint techniques for authentication [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-legrand)*, 1999, 45 (6): 841-853.
- [3] PARODI B, ARESU O, BINI D, et al. Species identification and confirmation of human and animal cell lines: a PCR-based method [J]. *Biotechniques*, 2002, 32 (2): 432-434, 436, 438-440.
- [4] WEISKIRCHEN S, SCHRÖDER S K, BUHL E M, et al. A Beginner's Guide to Cell Culture: Practical Advice for Preventing Needless Problems [J]. *Cells*, 2023, 12 (5): 682.
- [5] HALTON D M, PETERSON W D, HUKKU B. Cell culture quality control by rapid isoenzymatic characterization [J]. *In Vitro*, 1983, 19 (1): 16-24.
- [6] STEUBE K G, GRUNICKE D, DREXLER H G. Isoenzyme analysis as a rapid method for the examination of the species identity of cell cultures [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1995, 31 (2): 115-119.
- [7] STACEY G N, HOELZL H, STEPHENSON J R, et al. Authentication of animal cell cultures by direct visualization of repetitive DNA, aldolase gene PCR and isoenzyme analysis [J]. *Biologicals*, 1997, 25 (1): 75-85.
- [8] O'BRIEN S J, SHANNON J E, GAIL M H. A molecular approach to the identification and individualization of human and animal cells in culture: isozyme and allozyme genetic signatures [J]. *In Vitro*, 1980, 16 (2): 119-135.
- [9] GRUBER-BZURA B M, BUBKO I, SZTYBOR P, et al. Quality and purity of L929 cell cultures: Isoenzyme profiles as a sensitive marker of cross-contamination [J]. *Biopreservation and Biobanking*, 2023, 21 (1): 90-97.
- [10] MILLER O J, MILLER D A, ALLDERDICE P W, et al. Quinacrine fluorescent karyotypes of human diploid and heteroploid cell lines [J]. *Cytogenetics*, 1971, 10 (5): 338-346.
- [11] NELSON-REES W A, DANIELS D W, FLANDERMEYER R R. Cross-contamination of cells in culture [J]. *Science*, 1981, 212 (4493): 446-452.
- [12] RUSH L J, HEINONEN K, MROZEK K, et al. Comprehensive cytogenetic and molecular genetic characterization of the TI-1 acute myeloid leukemia cell line reveals cross-contamination with K-562 cell line [J]. *Blood*, 2002, 99 (5): 1874-1876.
- [13] YUSOFF N A, ABD HAMID Z, CHOW P W, et al. Chromosomal Analysis in Lineage-Specific Mouse Hematopoietic Stem Cells and Progenitors [J]. *Methods Mol Biol*, 2024, 2736: 65-76.
- [14] LIU M Y, LIN S C, LIU H, et al. Identification and authentication of animal cell culture by polymerase chain reaction amplification and DNA sequencing [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2003, 39 (10): 424-427.
- [15] HEBERT P D, STOECKLE M Y, ZEMLAK T S, et al. Identification of Birds through DNA Barcodes [J]. *PLoS Biol*, 2004, 2 (10): e312. DOI: 10.1371/journal.pbio.0020312.
- [16] SAVOLAINEN V, COWAN R S, VOGLER A P, et al. Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005, 360 (1462): 1805-1811.
- [17] PULLANDRE N, LAMBERT A, BROUILLET S, et al. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation [J]. *Mol Ecol*, 2012, 21 (8): 1864-1877.
- [18] HUANG Z, RUAN R. DNA barcodes and insights into the phylogenetic relationships of Corvidae (Aves: Passeriformes)[J]. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*, 2018, 29 (4): 529-534.

- [19] HALIL IBRAHIM S, SEZAI E, MURAT A, et al. Evaluation of genetic diversity using iPBS-SCoT marker methods in native Hawthorn genetic resources and species identification by using DNA barcoding method [J]. Cell Mol Biol, 2023, 69 (10): 43-55.
- [20] ADENIRANA A, HERNÁNDEZ-TRIANA LM, ORTEGA-MORALES A I, et al. Identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Mexico State, Mexico using morphology and COI DNA barcoding [J]. Acta Tropica, 2021, 213: 105730. DOI: 10.1016/j.actatropica.2020.105730.
- [21] PEREIRA F, CARNEIRO J, AMORIM A. Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges [J]. Recent Pat DNA Gene Seq, 2008, 2 (3): 187-199.
- [22] MILLAN T, OSUNA F, COBOS S, et al. Using RAPDs to study phylogenetic relationships in Rosa [J]. Theor Appl Genet, 1996, 92 (2): 273-277.
- [23] XIAO J, LI J, YUAN L, et al. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance and heterosis in rice as revealed by PCR-based markers [J]. Theor Appl Genet, 1996, 92 (6): 637-643.
- [24] WOLF C, RENTSCH J, HUBNER P. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification [J]. J Agric Food Chem, 1999, 47 (4): 1350-1355.
- [25] ESCOBAR D, PÉREZ F, ORTIZ B, et al. PCR-RFLP assays for the identification of Anopheles (Diptera: Culicidae) species circulating in Honduras [J]. Malaria J, 2023, 22 (1): 57.
- [26] NA T, YUAN B Z. A cytochrome b based PCR method to rapidly determine cell species and inter-species cross-contamination [J]. Chin J Pharm Analysis, 2014, 34 (11): 6. (in Chinese)  
纳涛, 袁宝珠. 基于细胞色素 b 序列差异 B 细胞种属鉴别及种属间细胞交叉污染的快速检测方法 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34 (11): 6.

收稿日期: 2025-05-12 编辑: 何巍

## (上接第 179 页)

- [14] ZANG R C, GOMEZ CASTRO M F, MCCUNE B T, et al. TMPRSS2 and Tmprss4 promote SARS-CoV-2 infection of human small intestinal enterocytes [J]. Sci Immunol, 2020, 5 (47): 1-14.
- [15] YANG Z Y, LI B B, ZHOU L T, et al. Application of recombinant trypsin in preparation of quadrivalent influenza virus-split vaccine in (MDCK cells) [J]. Prog Microbiol Immunol, 2023, 51 (5): 17-24. (in Chinese)  
杨卓圆, 李贝贝, 周琳婷, 等. 重组胰酶在四价流感病毒裂解疫苗(MDCK 细胞)制备中的应用 [J]. 微生物学免疫学进展, 2023, 51 (5): 17-24.
- [16] GU Y L, NIU B, RUAN J C, et al. Application of recombinant porcine trypsin in preparation of rabies vaccine (chicken embryo fibroblasts) [J]. Chin J Biologicals, 2021, 34 (1): 5-9. (in Chinese)  
顾玉林, 牛彪, 阮俊程, 等. 重组猪胰蛋白酶在制备狂犬病疫苗(鸡胚成纤维细胞)中的应用 [J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34 (1): 5-9.
- [17] The United States Pharmacopoeial Convention. United States Pharmacopeia USP 38-NF 33, Second Supplement [S]. Maryland: The United States Pharmacopoeial Convention, 2024: 6894-6898.
- [18] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(三部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 5-7.
- [19] BESNARD L, FABRE V, FETTIG M, et al. Clarification of vaccines: An overview of filter based technology trends and best practices [J]. Biotechnol Adv, 2016, 34 (1): 1-13.
- [20] ROSA S S, ZHANG S, SARI Y, et al. A (RP)UHPLC/UV analytical method to quantify dsRNA during the mRNA vaccine manufacturing process [J]. Anal Methods, 2024, 16 (30): 5146-5153.
- [21] HICKEY J M, JACOB S I, TAIT A S, et al. Measurement of Adenovirus-Based Vector Heterogeneity [J]. J Pharm Sci, 2023, 112 (4): 974-984.
- [22] DISELA R, NEIJENHUIS T, LE BUSSY O, et al. Experimental characterization and prediction of *Escherichia coli* host cell proteome retention during preparative chromatography [J]. Biotechnol Bioeng, 2024, 121 (12): 3848-3859.
- [23] HALTAUFDERHYDE K, ROBERTS B J, KHAN S, et al. Immunoinformatic Risk Assessment of Host Cell Proteins During Process Development for Biologic Therapeutics [J]. AAPS J, 2023, 25 (5): 87-98.
- [24] LIU S X, LI J Q, CHENG Q T, et al. A Single-Step Method for Harvesting Influenza Viral Particles from MDCK Cell Culture Supernatant with High Yield and Effective Impurity Removal [J]. Viruses, 2024, 16 (5): 768-780.
- [25] SHI X C, QIN X, YU L, et al. General technical requirements for the quality control of gene therapy products [J]. Drug Stand China, 2022, 23 (3): 229-235. (in Chinese)  
史新昌, 秦玺, 于雷, 等. 基因治疗制品质量控制通用技术要求考虑要点 [J]. 中国药品标准, 2022, 23 (3): 229-235.
- [26] BI H, LU N, NIU L R, et al. Development and verification of double antibody sandwich ELISA for quantitative detection of TrypLE [J]. Chin J Biologicals, 2023, 36 (2): 187-192. (in Chinese)  
毕华, 卢宁, 牛林茹, 等. TrypLE 双抗体夹心定量 ELISA 检测方法的建立及验证 [J]. 中国生物制品学杂志, 2023, 36 (2): 187-192.

收稿日期: 2025-05-24 编辑: 何巍