

细胞种属鉴定检测试剂盒

Cell Species Authentication Kit

Cat NO: IMC-C01

产品信息

产品名称	产品编号	产品规格	保质期
CELLTEK™细胞种属鉴定检测试剂盒	IMC-C01-50	50 rxns	-20°C保存 2 年
CELLTEK™细胞种属鉴定检测试剂盒	IMC-C01-100	100 rxns	-20°C保存 2 年

试剂盒组成

Component		IMC-C01-50	IMC-C01-100
Species Positive Control Templates Mix		100 μ l	200 μ l
Cell Extraction Buffer		750 μ l	1.5ml
PCR Master Mix (2X)		500 μ l	1ml
DNA Primers Mix	Homo Sapiens	50 μ l × 3 管	100 μ l × 3 管
	Rattus Norvegicus		
	Mus Musculus		
Nucleic Acid Free Water		500 μ l	1mL

产品简介

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定检查，以确认细胞系的起源，检测是否存在其他细胞系的污染。细胞种属鉴定检测试剂盒利用线粒体基因细胞色素氧化酶 I (COI) 作为生物制品生产常用的细胞系的分子鉴定靶标，使用特异性引物对靶基因进行扩增，通过 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人 (Homo sapiens)、大鼠 (Rattus norvegicus)、小鼠 (Mus musculus) 3 个物种，如需进一步验证，其产物还可用于一代测序，测序引物使用 SeqPh (Homo sapiens)、SeqPr (Rattus norvegicus)、SeqPm (Mus musculus)。

本产品通过 PCR 方法检测培养细胞等生物材料中的种属，针对人、大鼠、小鼠 DNA 序列保守区域设计特异引物，直接使用细胞培养液作为模板，特异性扩增待测细胞 DNA，具有操作简便、快速、特异性强、灵敏度高的特点 (结果见图 1、图 2)。



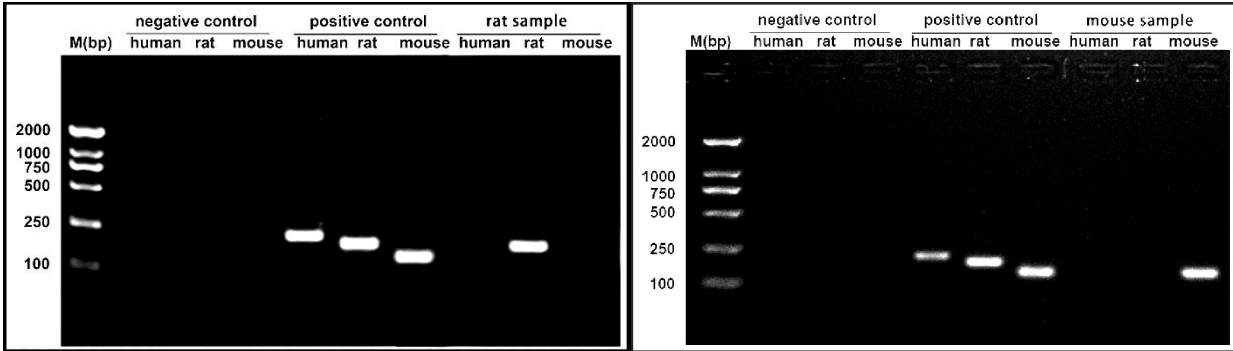


图 1

图 2

- | | |
|---|--|
| 1、negative control 阴性对照
3、human 人
5、mouse 小鼠
7、mouse sample 小鼠细胞样品 | 2、positive control 阳性对照
4、rat 大鼠
6、rat sample 大鼠细胞样品 |
|---|--|

操作过程

1. 制备细胞基因组 DNA 提取液（样品制备区）：

a、细胞准备

待细胞培养 2-3 天，生长至汇

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-20℃及以下保存。

b、PCR 模版制备

加入 50 μl Cell Extraction Buffer，置于 PCR 仪中 60℃热处理 30 分钟，98℃热处理 2 分钟后用作 PCR 模版。

注意：

制备好的样品-20℃及以下保存时间不要超过 1 个月，避免反复冻融。

c、阴性对照

样品：50 μl Cell Extraction Buffer，提取步骤同上样品处理。

2. PCR：

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。

a、在阴性区间内制备 PCR 的反应液

(a) 反应孔数=3*待测样品数+3 个阴性对照+3 个阳性对照

(b) 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）：

$$\text{PCR MIX} = (\text{反应孔数} + 1) \times 18 \mu\text{l}$$

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

Component		Volume
DNA Primers Mix	Homo Sapiens	1 μl
	Rattus Norvegicus	
	Mus Musculus	
PCR Master Mix (2X)		10 μl
Nucleic Acid Free Water		7 μl
总体积		18 μl

c、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 18 μl/管分装至 8 联管中，然后按表 3 所示进行加样：



注意:

制备好的样品-20℃及以下保存时间不要超过 1 个月，避免反复冻融。

样品类型	加样示例	加样区域
待测样品	18 μl PCR MIX + 2 μl 待测样品基因组 DNA 提取液	样品制备区
阳性对照	18 μl PCR MIX + 2 μl Species Positive Control Templates Mix	阳性区
阴性对照	18 μl PCR MIX + 2 μl 阴性对照	阴性区

3. PCR 循环:

进程	温度	时间	循环
1	94℃	4 分钟	1
2	94℃	30 秒	35cycles
3	60℃	30 秒	
4	72℃	40 秒	
5	72℃	5 分钟	1

4. 凝胶电泳:

反应结束，取 10 μl PCR 产物，使用 TBE 电泳缓冲液配置 2%琼脂糖凝胶，检测 PCR 结果。

5. 结果解读:

通过与阳性对照、阴性对照检测结果比较，确认样品种属，阳性条带大小为大鼠 196bp、小鼠 150bp、人 228bp。

6. 测序引物:

SeqPh (Homo sapiens) TTCGGCGCATGAGCTGGAGTCC
 SeqPr (Rattus norvegicus) CGGCCACCCAGAAGTGTACATC
 SeqPm (Mus musculus) ATTACAGCCGTACTGCTCCTAT

注意事项

1. 试剂在使用前彻底化冻、混匀（混匀时禁止激烈振荡，只需要进行上下倒置多次进行混匀）。
2. 细胞培养物中含有的青霉素和链霉素等抗生素以及血清不会影响本产品的检测结果。
3. 整个检测过程中，反应体系的配制、样本处理及加样、PCR 扩增应分区域进行，以避免交叉污染。
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 2 所示 3 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（小鼠 150bp、大鼠 196bp、人 228bp）。
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: 2024 年 10 月 10 日

生效日期: 2024 年 10 月 10 日

