

- 【产品名称】

细胞种属鉴定检测试剂盒（PCR-荧光探针法）
- 【产品货号】

BP-QN44-50
- 【包装规格】

50 Reactions/盒
- 【预期用途】

本试剂盒用于对生物制品生产常用细胞系进行物种鉴定和交叉污染检测，检测细胞基质中是否混入动物源性成分。
- 【产品简介】

本试剂盒采用 PCR-荧光探针法，针对靶标中国仓鼠（Cricetulus griseus）、恒河猴（Macaca mulatta）、人（Homo sapiens）、犬（Canis familiaris）、非洲绿猴（Cercopithecus aethiops）、猫（Felis catus）、大鼠（Rattus norvegicus）、小鼠（Mus musculus）、猪（Sus scrofa）和牛（Bos taurus）的保守序列，设计引物探针，能够定性检测样品中存在的细胞种类。试剂盒含有外源性内标，内标可以与样本一起参与提取扩增，用于监控提取与扩增是否异常，防止假阴性的产生。本试剂盒含有 UDG 酶，用于预防扩增产物的污染。

本试剂盒与珠海横琴宝锐核酸提取或纯化试剂盒 I（磁珠法）搭配使用。

【主要成分与含量】

试剂盒组分	规格（50 Reactions/盒）
细胞种属鉴定 qPCR MIX 1	1.0mL×1 管
细胞种属鉴定 qPCR MIX 2	1.0mL×1 管
细胞种属鉴定 qPCR MIX 3	1.0mL×1 管
细胞种属鉴定内标*	1.0mL×1 管
细胞种属鉴定阴性对照	1.5mL×2 管
细胞种属鉴定阳性对照	1.5mL×2 管

说明：

不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

实验操作中需要但试剂盒中未提供的试剂：核酸提取或纯化试剂盒。

【储存条件及有效期】

- 1、置于≤-18℃下避光保存，有效期 24 个月。
- 2、避免反复冻融，反复冻融次数不超过 10 次。
- 3、产品有效期及失效日期见标签。

【适用机型】

包括但不限于以下机型：SLAN-96P、SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统；ABI7500、ABI QuantStudio™5 实时荧光定量 PCR 仪；Roche LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪；伯乐 CFX96 定量 PCR 仪。

【相关设备】

超净工作台或生物安全柜、掌上离心机、涡旋混匀仪、荧光定量 PCR 仪、不同规格的移液器。

【检验方法】

1. 实验前准备
- 注意实验环境的控制，建议尽量在超净工作台或生物安全柜中进行实验操作，工作台面、移液枪及离心管架用紫外照射 30min 后，用 75%酒精喷洒并擦干。
2. 试剂准备
- 从试剂盒中取出细胞种属鉴定 qPCR MIX 1、细胞种属鉴定 qPCR MIX 2、细胞种属鉴定 qPCR MIX 3、细胞种

属鉴定内标、细胞种属鉴定阴性对照、细胞种属鉴定阳性对照，置于室温融化，充分振荡混匀后瞬时离心备用。

根据所要检测样品的数量，计算所需反应孔数 N，一般做 2 个重复孔。N=（待检样本数+1 个无模板对照 NTC+1 个阴性对照样本 NCS+1 个阳性对照 PC）×2。

根据计算的检测数量，将细胞种属鉴定 qPCR MIX 1、细胞种属鉴定 qPCR MIX 2、细胞种属鉴定 qPCR MIX 3 按照每孔 20μL 的量分装至 96 孔 PCR 板或者 PCR 八连管中。

3. 核酸提取纯化

3.1 样本准备

取 200μL 待测细胞置于 1.5mL 离心管中，1000rpm 离心 5min，弃掉上清，尽可能将上清弃净；在细胞沉淀中加 500μL PBS（pH7.4，无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ）溶液轻微振荡重悬，12000rpm 离心 2min，尽可能将上清弃净，在细胞沉淀中加 200μL PBS 溶液轻微振荡重悬。

3.2 样本提取

使用核酸提取或纯化试剂盒对阴性对照，上述准备好的待测样本进行核酸的提取纯化，操作步骤参照核酸提取或纯化试剂盒说明书，内标加样量为 10μL，样本量为 200μL。

4. 扩增和检测

4.1 按照 20μL/管分装量将细胞种属鉴定 qPCR MIX 1、细胞种属鉴定 qPCR MIX 2、细胞种属鉴定 qPCR MIX 3 分装至反应管后，按下列表格分别加入阴性对照、阳性对照、处理好的待测核酸配制反应液：

针对 MIX 1 体系：

组分	单孔用量（μL）
细胞种属鉴定 qPCR MIX 1	20
模板 DNA	10
总体积	30

针对 MIX 2 体系：

组分	单孔用量（μL）
细胞种属鉴定 qPCR MIX 2	20
模板 DNA	10
总体积	30

针对 MIX 3 体系：

组分	单孔用量（μL）
细胞种属鉴定 qPCR MIX 3	20
模板 DNA	10
总体积	30

*若不使用试剂盒内标功能，提取时无需添加内标。

*若样品提取时未添加内标，扩增时加内标，则配制 MIX 3 时每反应液加 1μL 内标，分装 qPCR MIX 3 时分装 21μL/反应，此时 PCR 总反应体积为 31μL/反应。

4.2 孔板排版布局可参考下表：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC-MIX 1	NTC-MIX 1		S1-MIX 1	S1-MIX 1	S1-MIX 2	S1-MIX 2	S1-MIX 3	S1-MIX 3		PC-MIX 1	PC-MIX 1
B	NTC-MIX 2	NTC-MIX 2		S2-MIX 1	S2-MIX 1	S2-MIX 2	S2-MIX 2	S2-MIX 3	S2-MIX 3		PC-MIX 2	PC-MIX 2
C	NTC-MIX 3	NTC-MIX 3		S3-MIX 1	S3-MIX 1	S3-MIX 2	S3-MIX 2	S3-MIX 3	S3-MIX 3		PC-MIX 3	PC-MIX 3
D				S4-MIX 1	S4-MIX 1	S4-MIX 2	S4-MIX 2	S4-MIX 3	S4-MIX 3			
E				S5-MIX 1	S5-MIX 1	S5-MIX 2	S5-MIX 2	S5-MIX 3	S5-MIX 3			
F	NCS-MIX 1	NCS-MIX 1		S6-MIX 1	S6-MIX 1	S6-MIX 2	S6-MIX 2	S6-MIX 3	S6-MIX 3			

G	NCS-MIX 2	NCS-MIX 2		S7-MIX 1	S7-MIX 1	S7-MIX 2	S7-MIX 2	S7-MIX 3	S7-MIX 3			
H	NCS-MIX 3	NCS-MIX 3		S8-MIX 1	S8-MIX 1	S8-MIX 2	S8-MIX 2	S8-MIX 3	S8-MIX 3			

*该示例表示的是检测 1 个无模板对照 NTC、1 个阴性对照样本 NCS、1 个阳性对照 PC、8 个待测样品，每个检测做 2 个复孔。

**实际检测时可根据样品多少，参照此示例进行排版布局。

PCS 可加可不加，客户可根据实际需求确认是否添加 PCS。

4.3 将上述配制好的反应液，盖好反应管盖，混匀后瞬时离心，转移到荧光 PCR 仪器上。

4.4 将反应管放置在荧光 PCR 仪样品槽中，在荧光 PCR 仪上运行以下程序：

步骤	条件	循环数
UDG 处理	50°C：2 分钟	1
预变性	95°C：3 分钟	1
PCR 扩增	95°C：10 秒，60°C（采集荧光）：30 秒	40
冷却	25°C*：10 秒	1

荧光通道选择 FAM、VIC、ROX、CY5，其中 MIX 1 的 FAM、VIC、ROX、CY5 为靶标基因，MIX 2 的 FAM、VIC、CY5 为靶标基因，MIX 3 的 FAM、VIC、CY5 为靶标基因 ROX 为内标基因。若仪器为 ABI 系列时，参比荧光选择 none。

*若荧光 PCR 仪温度无法设置 25°C，可将冷却步骤温度设置为 37°C。

TaqMan 探针报告基团：

报告基团	MIX 1	MIX 2	MIX 3
FAM	中国仓鼠细胞	非洲绿猴细胞	小鼠细胞
VIC	恒河猴细胞	猫细胞	猪细胞
ROX	人细胞	无此通道，无需关注该通道检测结果	IC
CY5	犬细胞	大鼠细胞	牛细胞

5. 结果判定

5.1 阈值线的设定

阈值线依据仪器噪声情况进行调整，将阈值线设置到超过本底信号波动位置。若需要手动调节，以刚好超过阴性对照品扩增曲线的最高点为准。阈值线设定应基于实验室验证数据，以满足检测限要求为基准。

5.2 实验成立条件

质控样品	靶标信号	内标信号
NTC	2 复孔 Ct $\geq$ 38 或扩增曲线无明显起峰	/
NCS	2 复孔 Ct $\geq$ 38 或扩增曲线无明显起峰	2 复孔 Ct $<$ 35 且有效的“S”型扩增
PC	2 复孔 Ct $<$ 35 且有效的“S”型扩增	/

*质控标准应基于实验室验证数据，以满足检测限要求为基准。

5.3 结果判定

靶标信号 (FAM/VIC/ROX*/CY5)	内标信号 (MIX3 ROX 通道)	结果判断
2 复孔有 1 孔以上 Ct $<$ 38 且有效的“S”型扩增	2 复孔 Ct $<$ 35 且有效的“S”型扩增	阳性
	2 复孔 Ct $\geq$ 35 或扩增曲线无明显起峰	阳性，有抑制
2 复孔 Ct $\geq$ 38 或扩增曲线无明显	2 复孔 Ct $<$ 35 且有效的“S”型扩增	阴性

起峰	2 复孔 Ct $\geq$ 35 或扩增曲线无明显起峰	阴阳性无法判断，有抑制
----	------------------------------	-------------

*MIX1 和 MIX2 的 ROX 通道为靶标信号，MIX3 的 ROX 通道为内标信号。

*内标信号如果有抑制，需重测或查找并排除抑制因子。

*MIX2 检测体系未添加 ROX 信号，由于不同通道间信号的影响，可能导致该通道有异常曲线，无需关注该通道检测结果。

【注意事项】

- 1、试剂盒应在-18℃及以下保存。
- 2、实验前请仔细阅读本试剂盒说明书，严格按照操作步骤执行，在操作过程中对时间、试剂体积等精确控制可以获得最好的结果。
- 3、核酸提取有关耗材确保洁净、无 DNase/RNase，提取过程尽量快速，完成后进入下一步实验或冷冻保存。
- 4、不要使用过期组分或者不同批次组分混合使用。
- 5、冻存试剂使用前应于室温下完全融化，瞬时离心使液体完全沉于管底。避免反复冻融，以免影响试剂性能。
- 6、要带新的一次性 PE 手套对反应管封盖，避免徒手或使用过的手套接触反应管底，检测过程中使用不带荧光物质一次性无粉乳胶手套。
- 7、实验室应严格按照有关规定分区管理，依照配液区→模板提取区→扩增区→分析区顺序进行基因检测。各区间人员、器材、试剂及空气流向应有严格要求。
- 8、样品、校准品等在使用后及时封盖，避免组分间及气溶胶等的污染造成假阳性。
- 9、扩增产物禁止开盖，实验产生的废弃物应及时收集，远离 PCR 实验室进行无害化处理。
- 10、如果样本为强阳性时，由于体系的竞争抑制，可能会对内标检测造成影响。
- 11、建议使用各仪器新版本的软件进行实验及数据分析。

【免责声明】

在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。

【公司信息】

邮箱：marketing@biori.com

网址：www.biori.com

