

通则 3430 细胞种属鉴别法

细胞种属鉴别是生物制品生产用细胞基质质量控制要求之一，也是保障生物制品生产使用正确细胞基质、防止细胞误用或交叉污染的重要措施。细胞种属鉴别是对细胞基质的物种来源进行鉴定，生物制品生产用细胞基质均应进行种属鉴别可选择以下一种或两种方法进行。如已知供试品的细胞种属信息且在多重 PCR 法可检测的种属范围内，可选择多重 PCR 法进行鉴别并判定是否存在其他种属来源细胞的交叉污染；如供试品为未知样本，可选择 DNA 条形码法进行检测，根据序列比对结果确定细胞种属。

第一法 多重 PCR 法

多重 PCR 法系通过扩增动物细胞线粒体细胞色素 b、细胞色素氧化酶 I（COX I）或细胞色素氧化酶 II（COX II）基因，鉴别细胞种属来源。本法适用于猪、人、猫、中国仓鼠、恒河猴、非洲绿猴、大鼠、犬、小鼠和牛的细胞种属鉴别。

试剂（1）PCR 反应预混液（2×）含 MgCl₂、扩增酶、dNTPs 等，按照试剂使用说明书配制，如需要可适当增加扩增酶用量。也可使用符合条件的其他配方预混液。

（2）推荐的检测引物

猪

正向引物：5'- CGGTGAATAGGAAGATGAAGCCCAG-3'

反向引物：5'- TCTACTATCCCTGCCAGTTCTAGCAGCTG -3'

人

正向引物：5'-TAGACATCGTACTACACGACACGTACTACG-3'

反向引物：5'-CACTCCAGGTTTATGGAGGGTTCTTCT-3'

猫

正向引物：5'-TATTGCCATTCTACCGGGGTG -3'

反向引物：5'- GTGCTGAGGGAAGAACGTTATATTGACTC -3'

中国仓鼠

正向引物: 5'- ACTAACCCGCTTCTTCGCATTC -3'

反向引物: 5'- GCGTAGGCGAACAGGAAGTATC -3'

恒河猴

正向引物: 5'- CCCACCCAGTTCAACTAAGCCTAC -3'

反向引物: 5'- GATGGTGAAGGATGGGTCATTGACTTC -3'

非洲绿猴

正向引物: 5'- CCTGCTACTTATGGGATCAACCATAATCGA -3'

反向引物: 5'- TAGGATTGCTGTGATTAGGACAGATCAGAC -3'

大鼠

正向引物: 5'- CTTCGGCCACCCAGAAGTGTAC -3'

反向引物: 5'- AGGCTCGGGTGTCTACATCTAGG -3'

犬

正向引物: 5'- GAACTAGGTCAGCCCGGTACTTTACT -3'

反向引物: 5'- TTCGGGGGAATGCCATGTCC -3'

小鼠

正向引物: 5'- ACAGCCGTACTGCTCCTATTATCACTAC -3'

反向引物: 5'- CCCAAAGAATCAGAACAGATGCTGGT -3'

牛

正向引物: 5'- GCTATTCCAACCGGGGTAAAAGTCTTC -3'

反向引物: 5'- GCCTAGGGCTCACATTATAGCAGG -3'

(3) 引物贮备液 取各种属引物适量, 加用焦碳酸二乙酯处理过的水 (DEPC 水) 分别配制成 100 μ mol/L 的溶液, 置-20 $^{\circ}$ C 及以下保存备用。

(4) 混合引物工作液 分别取各引物贮备液适量, 用 DEPC 水稀释并制成, 各引物终浓度分别为: 猪 400nmol/L、人 100nmol/L、猫 100nmol/L、中国仓鼠 600nmol/L、恒河猴 70nmol/L, 非洲绿猴 400nmol/L, 大鼠 80nmol/L, 犬 180nmol/L, 小鼠 70nmol/L, 牛 200nmol/L。充分混合, 分装, 置-20 $^{\circ}$ C 及以下保存备用。

阳性质控品贮备液的制备 混合种属阳性质控品包含 10 个种属的细胞基因组 DNA, 其中人、猫、非洲绿猴、大鼠、犬、小鼠和牛的细胞基因组 DNA 终浓度为 1ng/ μ l, 猪细胞基因组 DNA 终浓度为 4 ng/ μ l, 中国仓鼠细胞基因组 DNA

终浓度为 6 ng/μl, 恒河猴细胞基因组 DNA 终浓度为 0.5 ng/μl, 充分混合, 分装, 置-20℃及以下保存备用。亦可使用单一或部分种属阳性质控品, 细胞基因组 DNA 的浓度按上述相应种属终浓度配制。

供试品的制备 收集活细胞 $1\times10^5\sim1\times10^6$ 个, 以每分钟 250g 离心 5 分钟, 弃去上清, 取细胞沉淀。若不立即检测, 可置-70℃及以下保存不超过 6 个月。

检查法 (1) 核酸提取 取供试品细胞沉淀样品管, 用核酸提取试剂盒或细胞裂解液提取 DNA, 作为供试品基因组 DNA 提取液, 置-20℃及以下保存备用。取空白管同法操作, 作为阴性质控品 (NCS)。

(2) PCR 反应液制备
阳性质控品工作液: 取 DEPC 水 18μl, 置 1.5ml 离心管中, 加阳性质控品贮备液 2μl, 混匀。

PCR 反应液:
PCR 反应液所需成分与体积如下 (不同的反应体系可适当调整):

PCR 反应预混液 (2×)	12.5μl
混合引物工作液	4.5μl
总体积	17μl

反应孔数 = 无模板对照 1 个+阴性质控 1 个+供试品数+阳性质控 1 个。
PCR 反应液体积 (预估 1 孔损失量)=17 μl× (反应孔数+1)
取各试剂置冰上或 2~8℃融化后配制多重 PCR 反应液。混匀, 按照每管 17μl 分装至 8 联管中备用。

④按下表在相应区间加入样品 8μl, 反应总体积为 25μl。

无模板对照	DEPC 水	阴性区间
阴性质控	阴性质控品	阴性区间
供试品	供试品基因组 DNA 提取液	阳性区间
阳性质控	阳性质控品工作液	阳性区间

(3) PCR 扩增
在 PCR 仪器上设置反应程序, 设定如下参数:
阶段 1: 95℃, 5 分钟;

阶段 2: 95℃, 30 秒, 62℃, 3 分钟, 68℃, 30 秒, 重复 25~30 个循环 (循环数可根据仪器及电泳结果调整);

阶段 3: 68℃, 30 分钟。

(4) 琼脂糖凝胶电泳

取 PCR 产物及 DNA 分子量标准品 (50bp DNA ladder 或 DL500 Marker) 5~8 μ l, 上样于 2%~2.5% 琼脂糖凝胶泳道 (胶长至少 60mm), 照电泳法 (通则 0541 第三法), 80~110V 恒压电泳, 溴酚蓝条带接近凝胶边缘处时停止电泳。采用凝胶成像仪, 以 50bp DNA ladder (或 DL500 Marker) 为标记, 分析电泳结果。

试验有效性判定

(1) 无模板对照和阴性质控应无条带;

(2) 阳性质控各条带应清晰可见。混合种属阳性质控应有 10 条扩增条带, 且条带大小分别为: 猪 460bp、人 390bp、猫 360bp、中国仓鼠 320bp、恒河猴 290bp、非洲绿猴 260bp、大鼠 200bp、犬 170bp、小鼠 150bp、牛 100bp。单一或部分种属阳性质控扩增条带应与上述相应种属条带大小一致。

结果判定 通过比对供试品和阳性质控的扩增条带, 判定供试品的种属。若供试品有两条及以上扩增条带, 需与阳性质控的扩增条带进行比对, 判断污染的细胞种属。

注意事项 (1) 为避免污染, PCR 反应液制备需对实验环境进行阳性区间和阴性区间的划分。在阳性区间制备阳性质控品工作液, 在阴性区间制备 PCR 反应液:

(2) 为便于结果判定, 电泳时, 建议将供试品与阳性质控选择在非边缘的临近孔上样。

(3) 本法也可采用核酸分析仪进行扩增产物分析。

(4) 本法也可使用经验证后的商品化试剂盒进行核酸扩增, 可根据试剂盒说明书操作。

第二法 DNA 条形码法

DNA 条形码法系采用 PCR 法扩增动物细胞线粒体细胞色素 C 氧化酶亚单位 I 基因, 通过序列比对分析鉴别细胞种属来源。本法适用于人、猴、小鼠、仓鼠、

大鼠、犬、猪、兔、水貂、豚鼠、地鼠、土拨鼠、猫、牛、鸡、鸭及昆虫 17 个种属来源的细胞种属鉴别。

试剂 （1）核酸提取试剂 核酸提取可使用细胞基因组提取试剂盒或其他核酸提取试剂，实验选用的试剂需能够提取到满足后续实验要求的模板 DNA。

（2）PCR 扩增试剂 应使用合适的扩增酶或 PCR 反应预混液。实验选用的 PCR 扩增试剂应能够满足试验有效性要求。

（3）引物序列 见下表。

引物缩写	引物名称	引物序列
V 引物	VF1	<u>TGTAAAACGACGGCCAGT</u> TCTCAACCAACCACAARGAYATYGG
	VR1	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCRAARAAYCA
L 引物	LepF	<u>TGTAAAACGACGGCCAGT</u> ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG
	LepR	CAGGAAACAGCTATGACTAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA

注：①下划线部分序列为 M13 通用引物序列。

②扩增引物选择：本法所列引物已验证可用于鉴别 17 个种属来源的细胞，包括人、猴、小鼠、仓鼠、大鼠、犬、猪、兔、水貂、豚鼠、地鼠、土拨鼠、猫、牛、鸡、鸭和昆虫来源的细胞。其它种属来源的细胞需验证后使用。可根据供试品可能的物种来源选择引物进行检测，如人、猴、小鼠、仓鼠、大鼠、犬、猪、兔及水貂来源细胞可选择 V 引物，豚鼠、地鼠、土拨鼠和昆虫来源细胞可选择 L 引物，猫、牛、鸡和鸭种属来源细胞选择 V 引物或 L 引物均可。

供试品的制备 收集活细胞 $1\times10^5\sim1\times10^6$ 个，以每分钟 250g 离心 5 分钟，弃去上清，取细胞沉淀。若不立即检测，可置-70℃及以下保存不超过 6 个月。

检查法 （1）核酸提取 取供试品细胞沉淀，用核酸提取试剂进行核酸提取。模板 DNA 纯度应满足 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.0 之间。

（2）PCR 反应液制备 按照核酸扩增试剂说明书配制 PCR 反应液，PCR 反应体系以 50 μ l 为参照，其中引物终浓度为 0.2 μ mol/L，DNA 模板加样量根据扩增试剂说明书要求范围添加，实验包括阴性对照（模板为水）、阳性对照（模板为种属来源正确的细胞提取的核酸）和待检细胞提取的核酸样本。

(3) PCR 扩增 在 PCR 仪器上设置反应程序，设定如下参数：

阶段 1：94℃，2 分钟，94℃，30 秒，50℃，40 秒，72℃，1 分钟，重复 5 个循环；

阶段 2：94℃，30 秒，54℃，40 秒，72℃，1 分钟，重复 35 个循环；

阶段 3：72℃，10 分钟。

(4) 琼脂糖凝胶电泳 取 PCR 产物 5 μ l，上样于含核酸凝胶染色剂的 1.5% 琼脂糖凝胶泳道，照电泳法（通则 0541 第三法），100~150V 恒压电泳。不含上样缓冲液的供试品需与适量上样缓冲液混合后上样。在凝胶成像仪上检视，DNA 分子量标准品（100bp DNA ladder 或其它合适的 DNA ladder）与反应产物同时电泳作为标记，PCR 产物应在约 750bp 的位置出现一条目的条带。

(5) 序列测定 回收 750bp 位置的扩增产物，使用 M13 通用引物对回收产物进行双向测序，获得目标核酸序列。测序模板制备和测序过程中应防止外源 DNA 污染，避免外部因素对测序模板的破坏和降解。测序完成后，需对核酸测序结果进行序列质量核查，并对合格的测序结果进行拼接。

(6) 利用数据库进行比对及分析，根据序列比对分析结果确定细胞种属来源。

试验有效性判定 (1) 阴性对照应无扩增条带。

(2) 阳性对照应能在 750bp 左右检测到一条目的条带，且序列分析结果应与相应阳性对照细胞的种属一致。

结果判定 供试品在 750bp 左右有一条目的条带，且测序结果未出现套峰，根据序列比对结果，选择与数据库中同源性最高且满足同源性 95%以上的物种判定为该细胞的种属。如测序结果出现套峰（排除测序异常），说明细胞存在不同种属细胞的交叉污染，需要结合其他方法对污染细胞的种属进行进一步鉴定。

注意事项 (1) 试验操作应符合聚合酶链式反应法（通则 1001）和 DNA 测序技术指导原则（通则 9108）的相关要求。

(2) 本法不适用于鉴别发生交叉污染的细胞种属。

起草说明

1、概况

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,以及直接作为细胞治疗性产品用于疾病的治疗。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,最著名的例子是不同类型细胞与人宫颈癌 HeLa 细胞的交叉污染,细胞的错误使用和交叉污染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,有效判定细胞的种属来源,确保细胞在制备及体外操作过程中无其他种属细胞的交叉污染,是保证细胞质量的重要措施之一。

2、质量标准制订的意见或理由

2.1 国内外相关标准比较和法规要求考察

WHO（国际卫生组织, World Health Organization）于 2010 年发布的“Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks”中要求应对细胞库进行鉴定,以排除细胞在建库和生产过程中发生的错误使用和交叉污染。在该文件中,列出了常用的细胞鉴别方法,并对方法的优缺点进行了比较,如对于人源细胞,可以使用 DNA 图谱如 STR 图谱法对细胞来源的个体进行鉴别,另外,还可以使用 HLA 配型的方法以及特异性较差的同工酶分析和核型分析的方法。对于重组蛋白生产用细胞,在进行细胞鉴定时,还应对载体完整性、表达质粒拷贝数、插入、缺失、整合位点的数量、阳性表达细胞比例、蛋白编码序列以及蛋白表达水平进行鉴定。

FDA（美国食品药品监督管理局, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration）在 2010 年发布“Guidance for Industry Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications”

（<https://www.fda.gov/media/78428/download>）中,也明确要求应对细胞进行鉴定,方法包括生物化学、细胞遗传学、DNA 指纹图谱及免疫学检查等方法。

欧洲药典（EP10.0）”5.2.3 Cell substrates for the production of vaccines for human use”中也要求对细胞进行细胞鉴别检查,并提出鉴别方法包括但不限于:

核酸指纹图谱法与以下任一种方法，包括生物化学法、免疫学检查、遗传标志检测及核酸检测方法。

现行 2020 年版中国药典三部生物制品通则“生物制品生产用细胞制备及检定规程”中也明确规定：“生物制品生产用细胞必须进行细胞鉴别检查，以确认为本细胞，且无其他细胞的交叉污染。”在检测方法上应至少选择其中一种或几种方法对细胞进行种属和细胞株间及专属特性的鉴别，包括但不限于细胞形态、生物化学法、免疫学检查、遗传标志检测及其他方法如杂交法、PCR 法、报告基因法等。

而美国药典和日本药典中目前尚没有细胞检定规程的相关内容，因此也没有细胞鉴别的相关要求。

虽然 WHO、FDA、欧洲药典及我国药典都规定了对于生产用细胞应进行细胞鉴别检查，且推荐了可使用的检测方法，但是这些文件及规定中并没有具体的检测方法，在方法的使用上缺乏指导性，不能满足行业的发展。

2.2 细胞种属鉴别方法

细胞鉴别的方法很多，从方法学上可以分为生物化学法，如同工酶法、基因检测方法、表面标记检测方法等，这些方法按照细胞鉴别的程度又可以分为种属鉴别和个体鉴别方法。其中种属鉴别主要是对细胞来源宿主的种属进行鉴定，目前常用的细胞来源种属包括人、猴、小鼠、大鼠、猪、牛、猫、犬、兔、马、昆虫及植物等。经典的种属鉴别方法为同工酶法，但该方法操作繁琐、准确性差、灵敏度低、重复性不足，且可检测细胞的动物种属数量非常有限，在细胞交叉污染的鉴定上，灵敏度较低，不同种属的细胞只有在发生明显污染时（约 10%）才可明确鉴别，再加上近年来一些商业化检测试剂盒停产，进一步限制了该方法的应用。

基于传统检测方法的局限性，迫切需要开发新的种属鉴别方法，其中研究最多的是基于聚合酶链反应（PCR）开发的方法，即首先进行靶基因的扩增，然后对扩增产物进行检测。这些方法非常灵敏，可以对 DNA 量非常有限的样本进行检测，同时具有操作简单、经济的特点。

多重 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一种种属鉴别方法。由于动物细胞线粒体细胞色素 b、细胞色素氧化酶 I（COX

I) 或细胞色素氧化酶 II (COX II) 基因在不同物种间的差异较大, 而在物种内高度保守, 因此, 将动物细胞线粒体细胞色素 b、细胞色素氧化酶 I (COX I) 或细胞色素氧化酶 II (COX II) 基因选作本方法检测的靶基因。本法同时将针对 10 个物种的引物混合, 使用混合引物对目的基因进行扩增, 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。该方法操作简单, 快速、经济, 且重复性较好, 在检测交叉污染上, 灵敏度较高, 但所能鉴定种属仍然相对有限, 对以上 10 个种属以外的其他种属的鉴别, 仍需要利用其他方法(如 DNA 条形码法)进行补充。

DNA 条形码法是通过对一个靶基因的 DNA 序列进行分析从而进行物种鉴定的技术。由于线粒体基因细胞色素 C 氧化酶亚单位 I (cytochrome c oxidase subunit I, COI) 基因在不同物种间有较大的差异, 且该基因具有较为可靠的参考序列数据库, 因此, 选择 COI 作为扩增的靶基因。操作时首先进行样本 DNA 的提取, 然后利用通用引物对目的片段进行 PCR 扩增及测序, 再将目的片段的序列与数据库进行比对分析, 确定待检细胞的物种。该方法简单、快速、经济, 重复性好, 适于高通量分析。同时, 该方法利用相对少的通用引物就可以对多个物种进行检测, 可鉴定的细胞种类非常广。但该方法在检测其他物种来源细胞的污染上, 灵敏度差, 且不能明确污染细胞的物种, 需要配合使用其他方法, 如 PCR 法进行污染细胞物种的鉴定。

本研究建立了两种细胞种属鉴别方法, 即多重 PCR 法和 DNA 条形码法, 并对方法进行了优化和验证。

起草单位: 中国食品药品检定研究院

联系电话: 010-53851709