

短串联重复序列基因分型法鉴定 人源细胞系技术规范

Technical Specification for Authentication of Human Cell Lines
by Short Tandem Repeats Genotyping Method

2017-04-01 发布

2017-05-01 实施

目 次

前言.....	II
引言.....	III
1 范围.....	1
2 规范性文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 缩略语.....	2
5 受检样本及信息获取.....	2
6 样本运输.....	3
7 实验室工作程序.....	3
8 检测报告.....	5
9 受检对象样本和资料的保存.....	5
10 质量控制.....	5
附录 A（资料性附录）细胞系 STR 鉴定检测技术路线图.....	6
附录 B（资料性附录）细胞系 STR 鉴定检测申请单（参考）.....	7
附录 C（资料性附录）细胞系 STR 鉴定检测报告单（参考）.....	8
参考文献.....	9

前 言

本规范按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本规范由深圳市发展和改革委员会归口。

本规范负责起草单位：深圳华大基因研究院。

本规范主要起草人：岳建辉、何娜、刘亚琼、康晖、张曦。

本规范为首次发布。

引言

本规范旨在基于短串联重复序列（STR）基因分型技术进行人源细胞系鉴定，检测细胞系是否存在交叉污染。

细胞系作为体外模型被广泛应用于生命科学研究等领域，然而由于细胞系被交叉污染或错误鉴定而导致的研究结论错误、结果不可重复等问题，给生产和研究造成了困扰。

我国近年先后颁布的《中华人民共和国药典》（2015版）、《人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》、《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）》等法律法规和（/或）技术指导文件都提出了细胞鉴定的重要性。因此，为了有效地进行细胞系的鉴定，及时发现细胞系在体外培养过程中出现的交叉污染等问题，建立一套科学有效的细胞系鉴定检测规范非常重要。

在我国现行技术指导文件基础上，我们参考美国国家标准与技术研究院（National Institute of Standards and Technology, NIST）批准颁布的人源细胞系 STR 基因分型鉴定检测标准《Authentication of Human Cell Lines: Standardization of STR Profiling》（ANSI/ATCC ASN-0002-2011）及其他国内外人源细胞系鉴定相关文献，制定了 STR 基因分型法鉴定人源细胞系技术规范（以下简称“本规范”）。本规范基于 STR 基因分型技术，通过检测 9 个标准的人源细胞系 STR 位点基因图谱，并与 STR 位点数据库进行比对分析，对受检细胞系进行鉴定。该技术具有分型结果稳定可靠、灵敏度高、耗时短等优点；同时，开放的交互式、可搜索的人源细胞系 STR 位点数据库的不断完善将扩大 STR 基因分型技术应用于人源细胞系的鉴定的范围，进一步提高人源细胞系鉴定的准确性。

短串联重复序列基因分型法鉴定人源细胞系技术规范

1 范围

本规范规定了基于短串联重复序列（STR）基因分型技术的人源细胞系鉴定的受检样本获取、样本运输、实验室工作程序、检测报告、受检对象资料和样本保存、质量控制等方面的规范要求。

本规范适用于生命科学研究等领域所涉及的不同个体来源的人源细胞系鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有修改单）适用于本文件。

GB/T 1.1-2009 标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写

GB 19489-2008 实验室生物安全通用要求

GB/T 22278-2008 良好实验室规范原则

GB/T 27025-2008 检测和校准实验室能力的通用要求

SZDB/Z 124-2015 基于第二代测序技术的HLA高分辨分型检测标准

ANSI/ATCC ASN-0002-2011 Authentication of Human Cell Lines: Standardization of STR Profiling

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

细胞系 Cell Line

指由原代细胞群经系列传代培养获得的细胞群。该细胞群通常是非均质的，且具有明确的特性，可供建库用。

3.2

短串联重复序列 Short Tandem Repeats

指重复序列为2到5个碱基对，重复次数为5~50次，且不同的重复序列以相邻形式排列的基因片段。

3.3

交叉污染 Cross-contamination

指细胞在采集、扩增、传代等过程中，不同个体来源的人源细胞系之间发生的相互污染。

3.4

基因分型 Genotyping

指利用生物学检测方法测定个体DNA序列，并将其与其他个体的DNA序列或参考DNA序列进行比对，以确定该个体与其他个体的遗传组成（基因型）差异的过程。

3.5

DNA Ladder

指细胞凋亡时 DNA 在核小体间断裂形成的一些 DNA 片断，经过提取和纯化后在凝胶电泳上产生 n 条带，由于这些 DNA 条带经染色并成像之后的整体类似于梯子上的一一个个踏板，故称之为 DNA 阶梯（DNA Ladder），作为比对 DNA 片段大小的标准品。

4 缩略语

下列缩略语适合于本规范。

ATCC: 美国模式培养物保藏所 (American Type Culture Collection)

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

DSMZ: 德国微生物菌种保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)

JCRB: 日本JCRB细胞库 (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank)

NIST: 美国国家标准与技术研究院 (National Institute of Standards and Technology)

OD: 光密度 (Optical Density)

PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffer Solution)

PCR: 聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction)

STR: 短串联重复序列 (Short Tandem Repeats)

5 受检样本及信息获取

5.1 细胞样本获取

5.1.1 贴壁培养细胞样本收集

- a) 移去细胞培养基，加入无钙、镁离子的 PBS 轻摇细胞，去掉 PBS；
- b) 加入能够完全覆盖细胞的分离缓冲液并轻微晃动直到细胞完全分离；
- c) 加入适量完全培养基轻微晃动混匀，转移细胞悬液至离心管中；
- d) 离心，去掉上清液，加入适量无钙、镁离子 PBS 清洗细胞；
- e) 离心，去掉上清液，收集细胞并检测细胞数量。

5.1.2 悬浮培养细胞样本收集

- a) 转移细胞悬浮液至无菌离心管中；
- b) 离心，去掉上清液，加入适量无钙、镁离子 PBS 清洗细胞；
- c) 离心，去掉上清液，收集细胞并检测细胞数量。

5.1.3 细胞样本质量要求：细胞样本的细胞数量不低于 1×10^6 个。

5.1.4 细胞样本包装：使用1 mL无钙、镁离子的PBS重悬细胞，保存于2 mL细胞冻存管中，采用石蜡封口膜密封，于管壁上粘贴唯一编号标签。保存管应完好，无裂管、开盖等泄漏或样本外溢情况。

5.2 细胞基因组 DNA 样本获取

5.2.1 DNA 样本质量要求：基因组 DNA 总体积 $\geq 20 \mu\text{L}$ ，浓度 $\geq 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，吸光度 A260/A280 的比值应该在 1.8~2.0 之间。

5.2.2 DNA 样本包装：基因组 DNA 应保存于含有 DNA 储存液的 1.5 mL 离心管中，采用石蜡封口膜密封，于管壁上粘贴唯一编号标签。保存管应完好，所含 DNA 储存液不应含有 SDS（十二烷基硫酸钠）等活性剂成分，管体无裂管、开盖等泄漏或样本外溢情况。

5.3 受检样本信息获取

5.3.1 细胞样本信息包括：细胞系名称、细胞系建系日期、细胞种属信息、细胞数量以及取样日期等。

5.3.2 DNA 样本信息包括：DNA 浓度、吸光度 A260/280 的比值、凝胶电泳图谱以及取样日期等。

6 样本运输

6.1 细胞样本运输：细胞样本保存在无钙、镁离子的 PBS 中，进行低温（4~8℃）运输，运输时间不超过 24 小时。

6.2 细胞基因组 DNA 样本运输：细胞基因组 DNA 样本应保存于 DNA 储存液中，进行低温（4~8℃）运输，运输时间不超过 48 小时。

7 实验室工作程序

7.1 细胞系 STR 鉴定检测技术路线图：见附录 A。

7.2 实验室要求：检测实验室应该符合 GB/T 27025-2008 要求，遵循分区明确、单一流向、方便使用的原则，避免交叉污染。

7.3 样本接收

a) 核对样本编号和送检单。

b) 检查待检样本状态：根据 5 中对样本质量的要求，对符合要求的样本接收并登记，对不符合要求的样本拒收、登记并通知重新采样。

7.4 细胞基因组 DNA 提取

a) 使用 DNA 提取试剂盒，按照试剂盒说明书操作，提取采集的细胞样本基因组 DNA。

b) 利用紫外分光光度计检测提取后 DNA 的吸光度 A260/A280 的比值，吸光度 A260/A280 的比值在 1.8~2.0 之间。

c) DNA 样本要求：DNA 体积 $\geq 20 \mu\text{L}$ ，浓度 $\geq 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

d) 提取后的 DNA 置于 -20℃ 条件下保存 6 个月，或 -80℃ 长期保存，避免反复冻融。

7.5 PCR 扩增

a) 采用细胞系鉴定的 9 个标准 STR 位点，包括 D13S317、TH01、D5S818、D16S539、TPOX、D7S820、CSF1PO、vWA、Amelogenin (AMEL)，按照标准 PCR 扩增方法对各 STR 位点进行 PCR 扩增，也可采用经过质量检验合格的商业化 STR 细胞鉴定试剂盒，按照试剂盒说明书进行

STR 位点的 PCR 扩增。

b) PCR 扩增过程设置阴性对照组、样本检测组和阳性对照组。阴性对照组采用无菌水为模板进行 PCR 扩增，样本检测组以样本提取的 DNA 为模板进行 PCR 扩增，阳性对照组采用阳性 DNA 模板进行 PCR 扩增。

c) 采用琼脂糖凝胶电泳快速确认 PCR 扩增产物的质量，PCR 扩增产物条带应该明亮清晰，片段大小正确，阴性对照组无目的条带，阳性对照组有清晰的目的条带。

7.6 STR 基因分型检测

a) STR 基因分型检测对象包括 7.5 中阴性对照组、样本检测组和阳性对照组的 PCR 扩增产物，以及 DNA 片段标准品 (DNA Ladder)。

b) 配制去离子甲酰胺和荧光标记的分子量内标混合物，并等量分装于上样板中。

c) 准备标准上样体系：将 a) 中的各组 PCR 扩增产物及 DNA 片段标准品分别加入 b) 的分装混合物中，预变性处理，冰上冷却后立即点样电泳 (参考上样体系配制：去离子甲酰胺 8.5 μL ~8.8 μL ，荧光标记分子量内标 0.2 μL ~0.5 μL ，PCR 产物/DNA Ladder 0.5 μL ~1.5 μL)。

d) 使用毛细管电泳基因分析仪对 PCR 扩增产物进行检测。

7.7 STR 遗传图谱数据分析

将毛细管电泳基因分析仪检测所得的 STR 遗传图谱数据与国际细胞系认证委员会推荐的 ATCC (美国模式培养物保藏所：http://www.atcc.org/STR_Database.aspx) 的人源细胞系 STR 数据库进行比对分析，判断受检细胞系样本的检测结果。

注：国际细胞系认证委员会推荐可参考的其他人源 STR 数据库还包括：DSMZ (德国微生物菌种保藏中心：<https://www.dsmz.de/services/services-human-and-animal-cell-lines/online-str-analysis.html>)、JCRB (日本 JCRB 细胞库：http://cellbank.nibiohn.go.jp/legacy/cgi-bin2/str2/str_searchform3.cgi)、Cellosaurus (瑞士生物信息学研究所：http://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0030) 等。

7.8 参考判定标准

7.8.1 检测有效性判定

a) 根据相对分子量内标获得 PCR 扩增产物大小 (碱基数)，计算出每个 STR 位点的两个等位基因的重复次数。

b) 当 STR 位点的两个等位基因含有相同的重复次数时，图谱仅出现 1 个等位基因峰；当含有不同的重复次数时，图谱出现 2 个等位基因峰；此外，当阴性对照组无等位基因峰出现，阳性对照组检测结果与其标准基因分型数据一致。

c) 当检测结果满足 b) 中情况时，则判定该检测有效。

7.8.2 人源细胞系交叉污染检测判断标准

a) 在检测有效的前提下，若受检样本的 STR 图谱中所有 STR 位点仅出现单一或者 2 个等位基因峰，判定受检细胞系来源单一，为同一个体，判定受检细胞系不存在交叉污染。

b) 在检测有效的前提下，若受检样本的 STR 图谱中的 STR 位点出现 2 个以上的等位基因峰，同时经过重复检测试验排除 PCR 扩增体系或引物结合区点突变等的干扰因素，判定受检细胞系存在交叉污染。

7.8.3 人源细胞系鉴定判定标准

a) 在检测有效的前提下，受检细胞系的 STR 位点基因分型数据与其对应的标准 STR 基因分型

数据进行比对，若两者的匹配率不低于80%，判定受检细胞系为标准细胞系或为标准细胞系的衍生细胞系。

b) 在检测有效的前提下，受检细胞系的STR位点基因分型数据与其对应的标准STR基因分型数据进行比对，若两者的匹配率小于80%，同时不低于56%，建议结合细胞系形态、细胞系特异性标记物等辅助分析进行综合判断。

c) 在检测有效的前提下，受检细胞系的STR位点基因分型数据与其对应的标准STR基因分型数据进行比对，若两者的匹配率低于56%，判定受检细胞样本与标准细胞系不相关。

8 检测报告

8.1 检测报告包含受检者基本信息、送检单位信息。

8.2 检测报告包括样本检测指标和检测结果，以及相关的检测结论和解释。细胞系 STR 鉴定检测报告单参见附录 B。

9 受检对象资料和样本的保存

受检 DNA 样本及受检对象资料包括送检单、检测记录和检测结果，保存半年，另有要求的除外。细胞系 STR 鉴定检测申请单参见附录 C。

10 质量控制

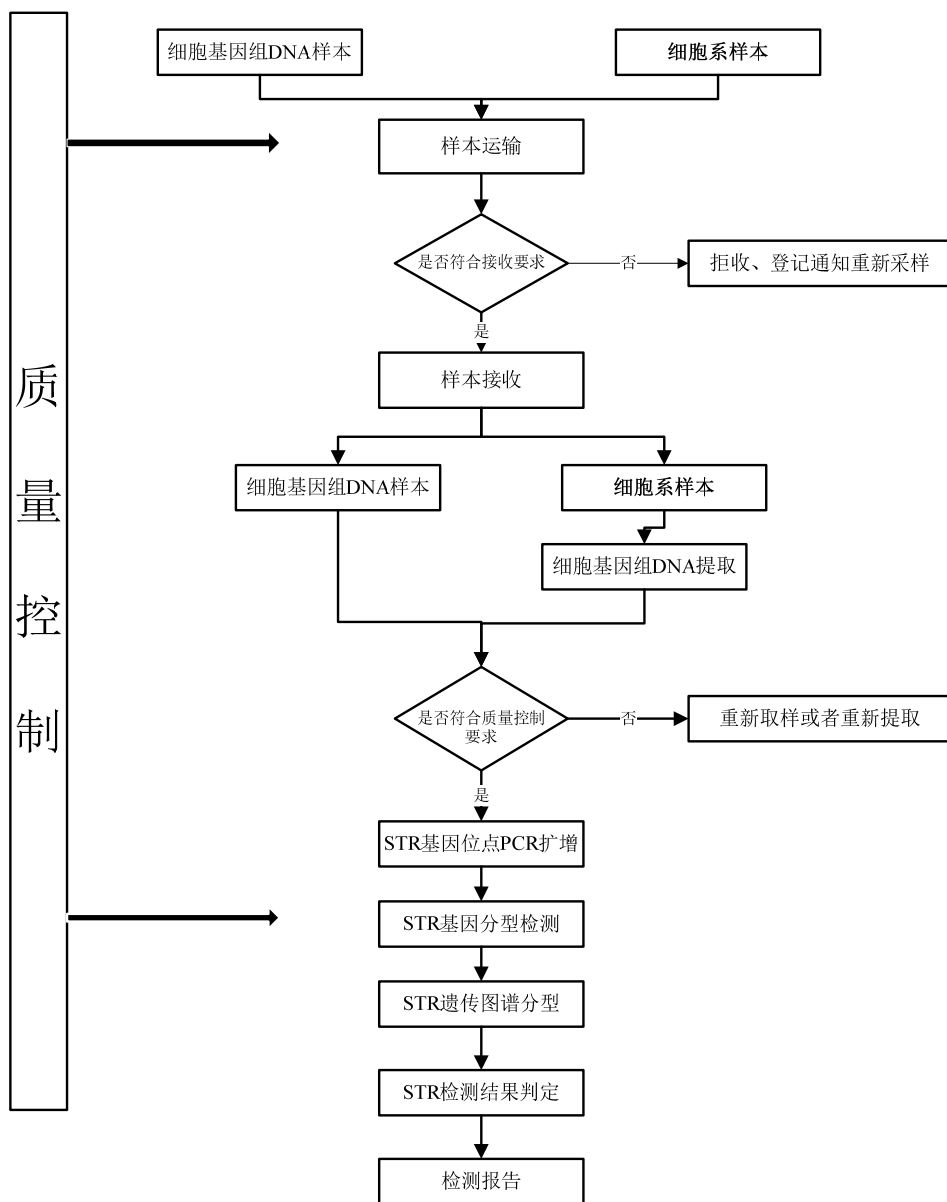
10.1 检测技术人员应由具备分子生物学、细胞生物学教育背景，接受过上岗前培训并考核合格的人员担任。

10.2 检测技术人员的职责是接收到样本后，按要求对样本进行分类标注，遵循 GB/T 22278-2008，GB/T 27025-2008 规定，按照标准操作规范对样本进行检测。

10.3 检测实验过程设立阴性、阳性对照，确保每次检测的质量。如对照组与预期结果不相符时，进行原因分析并采取纠正措施，形成书面记录。

10.4 为防止交叉污染，建议在 PCR 扩增实验过程中使用手套和防污染加样头。所有的扩增前试剂和扩增后试剂须分别放于不同的实验室，在专门的实验室配制扩增反应液。

附录 A
 (资料性附录)
 细胞系 STR 鉴定技术路线图



图A.1 细胞系STR鉴定技术路线图

附录 B
(资料性附录)
细胞系STR鉴定检测报告单 (参考)

一、基本信息

送检者姓名: _____ 送检者电话: _____
 送检单位: _____ 送样日期: _____
 原样本编号: _____ 样本类型: _____
 细胞系名称: _____ 样本组织来源: _____

二、检测结果

1. 图谱数据:

1) STR 图谱

--

2) STR 数据

Loci(Human)	Allele 1	Allele 2	Allele 3
D5S818			
D13S317			
D7S820			
D16S539			
vWA			
TH01			
TPOX			
CSF1PO			
AMEL			
...			

3) STR 位点数据比对结果

Designation (Human)	Atcc number	% Match	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	vWA	TH01	TPOX	CSF1PO	AMEL	...
e. g. HeLa	CCL-2	31.25	11, 12	12, 13.3	8, 12	9, 10	16, 18	7	8, 12	9, 10	X	...

2. 结论:

备注:

1. 本实验共检测 9 个标准的人源细胞系 STR 位点: AMEL、D5S818、D13S317、D7S820、D16S539、vWA、TH01、TPOX、CSF1PO。
2. 根据细胞研究应用对细胞系鉴定精度的不同需求, 除以上 9 个基本检测位点以外, 可使用更多检测位点的试剂盒进行 STR 基因分型检测。
3. 本报告结果只对送检样本负责。

操作者: _____

审核者: _____

报告日期: _____

附录 C
(资料性附录)
细胞系 STR 鉴定检测申请单 (参考)

一、说明:

1. 请您认真并尽量完整填写相关信息,以便我们及时与您联系。
2. 请您将填好的表格电子版发送邮件至: **@mail.com, 同时将纸质版随样品寄送给我们。

二、客户信息 (以下*为必填内容, 请您填写完整, 以便我们及时与您联系沟通)

* 姓名			
* 电话			
* E-mail			
* 单位名称			
所在的课题组		课题组负责人	
发票抬头			
* 联系地址		邮编	
* 发票寄送地址			
* 报告寄送地址			
备注			

三、细胞系鉴定信息: (*为必填内容, 请您填写完整)

样本编号	样品名称*	样本类型及规格*	检测选项*	备注

备注

1. 请选择样本类型: I. 细胞悬液/沉淀, 细胞数 $\geq 10^6$ 个; II. 基因组 DNA, 体积 $\geq 20 \mu\text{L}$, 浓度 $\geq 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$; III. 其他 (请在样本类型及规格栏中注明)。
2. 规格: 须注明样本的浓度、送样体积, 若为 DNA 样本, 需标注吸光度 A260/280 的比值。
3. 请选择所需服务 (检测选项): I. 人源细胞系鉴定; II. 人源细胞系交叉污染检测; III. 均需要。

送检者:

送检日期:

接收人:

接收日期:

参考文献

- [1] Chatterjee R., Cell biology. Cases of mistaken identity. *Science*, 2007. 315 (5814): p. 928-31.
- [2] Neimark J., Line of attack. *Science*, 2015. 347 (6225): p. 938-40.
- [3] Zhao M., et al., Assembly and initial characterization of a panel of 85 genomically validated cell lines from diverse head and neck tumor sites. *Clin Cancer Res*, 2011. 17 (23): p.7248-64.
- [4] McLaren,R.S., Y. Reid, and D.R. Storts Human cell line authentication: the critical first step in any project using human cell lines. *Methods Mol Biol*, 2013. 963 : p. 341-53.
- [5] Announcement: Time to tackle cells' mistaken identity. *Nature*, 2015. 520 (7547): p. 264-264.
- [6] ANSI/ATCC, Authentication of Human Cell Lines: Standardization of STR Profiling. 2011, ASN-0002-2011.
- [7] Masters JR., et al., Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98 (14): p. 8012-7.
- [8] American Type Culture Collection Standards Development Organization Workgroup, A.S.N., Cell line misidentification: the beginning of the end. *Nat Rev Cancer*, 2010. 10 (6): p. 441-8.
- [9] Ronald J, Duffy KJ, et al. Loss of Heterozygosity Detected in a Short Tandem Repeat (STR) Locus Commonly Used for Human DNA Identification. *Journal of Forensic Sciences*. 2000;45(5):1087–1089.
- [10] Reid Y, Storts D, Riss T, and Minor L, Authentication of Human Cell Lines by STR DNA Profiling Analysis, in *Assay Guidance Manual*, G.S. Sittampalam, N.P. Coussens, H. Nelson, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, B. Bejcek, M. Glicksman, J. Inglese, P.W. Iversen, Z. Li, J. McGee, O. McManus, L. Minor, A. Napper, J.M. Peltier, T. Riss, O.J. Trask, Jr., and J. Weidner, Editors. 2004: Bethesda (MD).
- [11] Cell Line Authentication Test Recommendations. www.atcc.org
-