K562 feeder cell 残留检测试剂盒说明书

本试剂盒专用于科研，而非用于诊断

Cat.No. HG-KF001

产品简介

基因编辑的 K562 细胞因其良好的促进增殖作用而被广泛研究和使用。研究表明使用基因编辑的 K562 细胞作为滋养细胞能使 NK 细胞的扩增效率提高几十到上万倍。在最近的 FDA 发布的指南文件《Considerations for the Use of Human- and Animal-Derived Materials in the Manufacture of Cellular and Gene Therapy and Tissue-Engineered Medical Products》和药监局发布的《浅析细胞治疗产品中滋养细胞的使用及控制策略》指南文件中，均提及可以使用经过辐照后的 K562 细胞作为滋养细胞，用于体外培养使用。

尽管 K562 细胞经过辐照处理，且易被生长的 NK 细胞杀死，但仍需确保细胞终产品中尽可能没有滋养细胞残留，以保障患者安全。建议研究人员开发灵敏度高的检测方法，例如反转录聚合酶链反应（RTPCR）检测法、微滴式数字聚合酶链反应（ddPCR）检测法等，并对检测方法进行专属性、准确性、精密度、检测限等验证，以保证检测方法能对生产过程及终产品进行有效表征，减少对产品质量、临床疗效及安全性的影响。

本试剂盒使用反转录聚合酶链反应（RTPCR）检测法，设计特异性的靶标位点，进行 K562 feeder cell 残留检测。

本试剂盒的检测范围：10 copies/μL~ 1×10^6 copies/μL，K562 细胞的最低检测限度为 0.05%。

应用

细胞制剂样本中 K562 feeder cell 残留检测。

试剂盒规格

100 Reactions

试剂盒组分

组分	规格	配制
K562 检测定量标准品（1×10^8 copies/μL）	50 μL x 1 管	-20 °C
K562 Primer&Probe MIX	550 μL x 1 管	-20 °C，避光
2×qPCR Reaction Buffer	1.2mL x 1 管	-20 °C，避光
DNA 稀释液	1.5 mL x 3 管	-20 °C
无酶水	1.0 mL x 1 管	-20 °C
50x ROX High	50 μL x 1 管	-20 °C，避光
50x ROX Low	50 μL x 1 管	-20 °C，避光

存储条件及有效期

-20°C储存，有效期 18 个月

适用机型（包括但不限于）

- ABI PRISM 7500
- FQD-96A（博日）
- CFX96(Bio-Rad)
- Roche Light Cycler 480

仪器	ROX 参比染料
ABI 5700, 7000, 7300, 7700, 7900HT Fast, StepOne, StepOne Plus	ROX High
ABI 7500, 7500 Fast, ViiA7, QuantStudio 3 and 5, QuantStudio 6,7,12k Flex. Stratagene MX3000P, MX3005P, MX4000P	ROX Low
Bio-Rad CFX96, CFX384, iCycler iQ, iQ 5, MyiQ, MiniOpticon, Opticon, Opticon 2, Chromo4.Roche Applied Science LightCycler 480, LightCycler 2.0; Lightcycler 96.Eppendorf Mastercycler ep realplex, realplex 2 s. Qiagen Corbett Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000. Thermo Scientific PikoReal Cycler.Cepheid SmartCycler.Illumina Eco qPCR	No ROX

* 请对应机型选择适配的 ROX，如上表中未查询到对应机型可咨我司或仪器厂家。

需自行准备的材料

(1) 荧光定量 PCR 仪器（包括 FAM 和 VIC 荧光通道）
(2) 涡旋振荡器
(3) 掌上离心机
(4) RNA 提取试剂
(5) 逆转录检测试剂
(6) 移液器及吸头
(7) 八联排管加盖或 96 孔半裙边板加封口膜

安全注意事项

为了您的安全和健康，操作时请穿实验服、戴口罩、手套、做好眼睛及面部防护，避免试剂接触皮肤及眼睛。

实验步骤

1. RNA 提取

取一定量的细胞悬液（1E6-5E6 细胞）进行 RNA 提取

2. 逆转录

对提取的细胞 RNA 进行基因组 DNA 去除和逆转录反应，获得检测使用的 cDNA。

3. PCR 扩增

3.1 标准品溶液的配制：

取出定量标准品和 DNA 稀释液，置于 4°C冰箱中融化；待融化完全后，上下颠倒混匀 20 次后，在复合转子离心机中 6000 rpm 离心 5 秒，用 DNA 稀释液将 RNA 定量标准品 (1E+08 copies/μL) 梯度稀释至 1E+06 copies/μL、1E+05 copies/μL、1E+04 copies/μL、1E+03 copies/μL，1E+02 copies/μL，10 copies/μL。具体操作如下：取 7 支 1.5 mL 离心管，分别标记为 STD0，STD1，STD2，STD3，STD4，STD5，STD6，参考下表进行稀释操作（每一步稀释都需充分震荡混匀）：

标准品代号	稀释体积	标准品终浓度（copies/μL）
STD0	10 μL 标准品 +90 μL DNA 稀释液	1E+07
STD1	10 μLSTD0+90 μL DNA 稀释液	1E+06
STD2	10 μL STD1+90 μL DNA 稀释液	1E+05
STD3	10 μL STD2+90 μL DNA 稀释液	1E+04
STD4	10 μL STD3+90 μL DNA 稀释液	1E+03
STD5	10 μL STD4+90 μL DNA 稀释液	1E+02
STD6	10 μL STD5+90 μL DNA 稀释液	1E+01

3.2 PCR 反应液配置

根据样本检测数量计算需要的反应孔数，每个样本进行 3 次重复检测。备注：根据反应孔数计算本次所需的 Mix 混合液总量：Mix 混合液 =（反应孔数 +2）× 15 μL（含有 2 孔的损失量）。在生物安全柜内配制 PCR 混合液，配置情况如表所示：

组分名称	单反应用量（μL）
2X qPCR Reaction Buffer	10
K562 Primer&Probe MIX	4.6
50x ROX	0.4

备注：如果仪器不需要加 ROX，可以将 50x ROX 替换为无酶水。

各个反应孔加样情况如表所示：

类型	体积
标准曲线	15 μL PCR 反应 MIX+5 μL(STD1/STD2/STD3/STD4/STD5/STD6)
空白对照	15 μL PCR 反应 MIX+5 μL DNA 稀释液
供试品	15 μL PCR 反应 MIX+5 μL 供试品 / 加标样本 RNA 提取液

3.3 加完样后，将 8 联排盖子盖上，先盖上两头的盖子，再盖上中间的盖子，并在盖子边 缘做好标记。

3.4 加样完成密封好管子后，先在复合转子离心机中 6000 rpm 离心 10 秒将管壁的液体离心收集至管底，再置于调节至 6 档的旋涡混合器上震荡 10 秒以上，完全混匀反应液，再在复合转子离心机中 6000 rpm 离心 10 秒将管壁的液体离心收集至管底，如有气泡，需将气泡排尽。

3.5 PCR 程序设置

打开 PCR 仪，设置 PCR 反应程序：

类型	温度	时间	循环数	备注
预变性	95°C	3 分钟	1	NA
变性	95°C	15 秒	45	NA
退火 & 延伸	60°C	60 秒		荧光信号采集

3.6 设置样品反应板：按照 PCR 反应液加样位置编辑标准品、NTC、Neg、ERC、待测样本的信息。在反应板图表中，选择样品孔，在 Sample Type 中下拉选择 Unknow，勾选荧光 FAM，Target Name 命名为 K562，勾选荧光 VIC，Target Name 命名 ABL，输入每个样品的重复次数及 Sample Name。输入每个稀释梯度的重复次数及 Sample Name。并且分别在 STD1，STD2，STD3，STD4，STD5，STD6 的 Concentration 一栏赋值为 1E+06、1E+05、1E+04、1E+03、1E+02、1E+01，选择单位（copies/μL）。

3.7 开启加热盖，按照样品板编辑信息放置八联管，关闭加热盖，启动 PCR 运行程序，开始 PCR 反应。

4. 数据处理

4.1 反应结束后，仪器会自动设置基线和阈值。保存并导出结果。

4.2 利用 excel 计算结果 : 将仪器直接导出的检测结果带入预先设计好的检测结果分析表格中，进行最终的检测结果计算，并将计算的 excel 表格附件到检测记录中。

4.3 计算公式

K562 feeder cell 残留比例 =K562 检测结果 /ABL 检测结果 *100%

5. 系统适用性判定

5.1 三个平行孔间的 Ct 值变异系数 CV% ≤ 5%，Ct 值大于 35 的孔除外。

5.2 空白 NTC 应无 Ct 值或大于标准曲线最低浓度 2 个 Ct 值。

5.3 PCR 反应扩增效率 Effective：85.0%~110.0%，R2 ≥ 0.990。

6. 符号及缩写

6.1 标准品 (Standard Products)：STD；

6.2 无模板对照：NTC；

6.3 供试品（Sample）：S。

注意事项

1. 本试剂盒已通过稳定性（冻融等因素）的验证，无需分装。

2. 阴性样品和阳性样品（参考品和待测样品等）的配制环境需区分区域，不可在一个区域内操作，配制人员需穿戴整齐，戴好口罩、手套和穿好洁净服。

3. 注意在不同加样步骤间及时更换吸头，避免交叉污染，避免长时开盖。

4. 试剂盒必须在有效期内使用。

5. 试剂盒内所有组分建议在低温环境融化后使用。

6. 只有严格遵守说明书的操作方法，全部使用本试剂盒配套的试剂才能保证最佳检测效果。

7. 尽量在当天完成样本前处理纯化后立即进行后续 qPCR 检测，以保证检测结果的准确性。

8. 最终的试验结果与试剂的有效性、操作者的操作方法及试验环境密切相关。

9. 公司只对试剂盒本身负责，不对因使用该试剂盒所造成的样本消耗负责，请使用者使用前充分考虑到样本的可能使用量，预留充足的样本。

10. 本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断。

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。

©2024 谱新生物 Hillgene. All right reserved. Ver.6.2406

江苏谱新生物医药有限公司

相关产品（更多产品可咨询谱新生物 https://www.hillgene.com/）

©2024 谱新生物 Hillgene. All right reserved. Ver.4.2410

江苏谱新生物医药有限公司
地址：苏州市吴中经济技术开发区越溪街道吴中大道1463号越旺智慧谷4号楼
电话 : 400-900-1882
邮箱: info@hillgene.com
网址 : www.hillgene.com / www.bluekitbio.com