



团 体 标 准

T/CSCB 0029—2024

分化细胞中残留多能干细胞检测 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 法通则

Detection of residual pluripotent stem cells in differentiated cells—
General requirements on TaqMan quantitative PCR assay

中国细胞生物学学会
CHINESE SOCIETY FOR CELL BIOLOGY

2024-10-28 发布

2024-12-31 实施

中国细胞生物学学会 发 布
中国标准出版社 出 版

目 次

前言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 一般要求 1

5 细胞样本的抽样方式和取样量 2

6 RNA 提取..... 2

7 反转录 2

8 中间样本的保存与效期验证 3

9 检测靶标基因和内参基因的选择与引物和探针的设计 3

10 定量 PCR 反应的程序设计 4

11 检出限..... 4

12 检测对照的设置..... 5

13 结果判定..... 5

14 检测方法的验证..... 5

附录 A（资料性） RNA 提取方法的性能评价 核酸产量/纯度 7

附录 B（资料性） RNA 提取方法的性能评价 完整性;电泳检测 8

附录 C（资料性） RNA 提取方法的性能评价 完整性;加标定量 PCR 方法 9

附录 D（资料性） 残留基因组 DNA 评价 10

附录 E（资料性） 反转录效率评价 11

附录 F（资料性） 中间样本保存条件与效期的验证 12

附录 G（资料性） 多能干细胞残留检测靶标基因示例 14

附录 H（资料性） 检出限确立的研究方案..... 15

参考文献 16

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国细胞生物学学会标准工作委员会提出。

本文件由中国细胞生物学学会归口。

本文件起草单位：北京泽辉辰星生物科技有限公司、北京干细胞与再生研究院、中国科学院动物研究所、北京工商大学、中国计量科学研究院、安徽中盛溯源生物科技有限公司、中国食品药品检定研究院、中国医学科学院医学实验动物研究所、北京昭衍药物检定研究有限公司、贝康医学科技有限公司、清华珠三角研究院、艾普拜生物科技(苏州)有限公司、深圳华大生命科学研究院(国家基因库)、中国科学院北京基因组研究所(国家生物信息中心)、广东省中医院(广州中医药大学第二附属医院)、苏州大学、中国测试技术研究院生物研究所、浙江霍德生物工程有限公司。

本文件主要起草人：曹佳妮、徐然然、魏军、张愚、赵同标、马爱进、傅博强、俞君英、纳涛、郝捷、王磊、魏强、饶春明、王浩、杨子江、张艳辉、郑祖亮、李启沅、张维绮、陈曲波、赵红玲、胡士军、周李华、范靖、孙思明、颀健、李聪、张婷婷、甘一迪、王淑艳。



分化细胞中残留多能干细胞检测 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 法通则

1 范围

本文件规定了分化细胞中残留多能干细胞检测的一般要求，以及细胞样本的抽样方式和取样量、RNA 提取、反转录、中间样本的保存与效期验证、检测靶标基因和内参基因的选择与对应引物和探针的设计、检测对照、定量 PCR 反应程序设计、结果判定、检测方法验证中的相关要求。

本文件适用于多能干细胞分化细胞中残留多能干细胞检测 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 方法的开发与验证。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 42077 生物技术 核酸靶序列定量方法的性能评价要求 qPCR 法和 dPCR 法
GB/T 42753 实时荧光定量 PCR 仪性能评价通则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

分化细胞 **differentiated cell**

由干细胞分化产生的具有特定形态结构、功能特征的细胞类群。

3.2

多能干细胞 **pluripotent stem cell**

一类能够在体外无限制的自我更新，并且具有向三胚层细胞分化潜能的干细胞。

示例：胚胎干细胞、诱导多能干细胞。

注：人的胚胎干细胞称为人胚干细胞。

[来源：GB/T 42466—2023, 3.2]

3.3

残留多能干细胞 **residual pluripotent stem cell**

在定向诱导分化过程中未分化，依旧保持多能干细胞特性，残留于分化细胞群体中的细胞。

3.4

阴性质控细胞 **cells for negative control**

与待检分化细胞同等类型的成体原代分离细胞或经验证无残留多能干细胞的待检分化细胞。

4 一般要求

多能干细胞残留检测宜参照对于微量或痕量靶标检测的基本原则进行方法开发。检出限为对检测

结果进行定性判定的核心参数。因此,选择在多能干细胞中高特异、高表达的检测靶标和在分化过程中稳定表达的内参基因对检出限优化、检测结果的正确度的保障至关重要。

鉴于不同种类分化细胞和不同来源多能干细胞的基因表达差异,宜对由不同多能干细胞分化获得的不同类型的功能细胞进行针对性的方法开发,以筛选出最优最适的检测靶标基因和内参基因。

多能干细胞残留检测方法的设计宜考虑以下因素,包括但不限于:

- a) 样本的抽样方式和取样量;
- b) RNA 提取方法与质量控制;
- c) 反转录与质量控制;
- d) 细胞裂解液、RNA、cDNA 中间样本的保存条件及最长保存时间;
- e) 检测靶标基因和内参基因的选择与引物和探针的设计;
- f) 检测对照的设置;
- g) 定量 PCR 反应的程序设计;
- h) 试验过程的标准化。

5 细胞样本的抽样方式和取样量

5.1 抽样

在同一批的供试品细胞产品中应随机抽取至少 3 个最小包装单元。

5.2 取样

细胞取样量宜考虑治疗用剂量、最小包装单元规格、检出限等因素,且应在所使用的 RNA 提取方法的提取细胞数限量范围内。

6 RNA 提取

6.1 RNA 提取宜充分考虑获得核酸样本的纯度和完整性,并满足细胞样本取样和制样的适用性要求(如提取细胞的类型、数量范围)。

注 1: 对于残留检测,所提取核酸样本的完整性是影响方法检出限和检测结果准确度的关键因素。

注 2: 如所提取的样本的细胞数量超出了提取方法的提取细胞量的适用范围,存在所得核酸样本的完整性与纯度降低的风险。

6.2 开发方法时应对 RNA 提取方法的性能进行评估,可通过核酸产量(见附录 A),或电泳检测(见附录 B),或加标定量 PCR 方法(见附录 C)评价 RNA 提取方法的性能。

6.3 RNA 提取过程中宜充分考虑残留基因组 DNA 对检测结果的影响,RNA 提取过程中宜包含去除基因组 DNA 的操作步骤,如使用 DNA 结合柱,DNA 酶处理等方法。必要时,如扩增引物未进行跨内含子设计,或所跨内含子长度较小(小于或等于 500 bp),可参考附录 D 中的方法对残留基因组 DNA 进行评估。

6.4 纯度与浓度的测定: 用微量紫外分光光度计测定 RNA 提取物的纯度与浓度,分别读取 260 nm 和 280 nm 处的吸光度(OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀),RNA 的纯度以 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值计算,RNA 的浓度以 OD₂₆₀ 和相应的稀释倍数进行计算。

6.5 RNA 样品的纯度应符合: $1.8 \leq \text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} \leq 2.2$, 且 $1.8 \leq \text{OD}_{260}/\text{OD}_{230} \leq 2.5$ 。

7 反转录

7.1 反转录方法与试剂的选择宜充分考虑获得 cDNA 样本的完整性。

7.2 应对反转录效率进行评价,可参考附录 E 中的方法对反转录效率进行性能评价。

7.3 反转录的 RNA 总量宜 $\geq 1 \mu\text{g}$ /反应,且应在试剂盒使用说明中的限量范围内。

7.4 反转录的 cDNA 可经适当稀释后进行下一步检测反应。稀释宜遵循以下原则:

- a) 当未稀释的 cDNA 内参检测基因的 Ct 值在定量线性范围内时,无需对 cDNA 样本进行稀释;
- b) 当未稀释的 cDNA 内参基因的 Ct 值过低,超出在样本定量线性范围时,可对 cDNA 进行适当的稀释;
- c) 如需稀释样本,尽量减少样本的稀释程度;
- d) 内参基因的检测线性范围进行评价宜参照 GB/T 42077 中的技术要求。

注:对于残留检测,样本中靶标的丰度一般较低,对样本的稀释可能会影响检测方法的检出限。

8 中间样本的保存与效期验证

8.1 检测操作过程中的中间样本(细胞裂解液、RNA、cDNA 中)宜立即进行下一步检测,以降低由于低丰度残留靶标不稳定而造假阴性结果的风险。

8.2 如需进行中间样本保存,保存的条件与效期应通过在多能干细胞残留检测限条件下的验证。不同中间样本推荐的保存条件与验证方法可参考附录 F。

8.3 中间样本宜避免反复冻融。

9 检测靶标基因和内参基因的选择与引物和探针的设计

9.1 靶标基因的选择

9.1.1 选择的原则:

- 应选择在多能干细胞中特异且稳定表达,在待检分化细胞中不表达的基因作为检测靶标;
- 在满足上述条件的前提下,应优先选择在多种分化细胞中都阴性表达的基因。

9.1.2 可通过多能干细胞与其分化获得的供试细胞的高通量基因表达组学分析来对多能干细胞残留检测靶标基因进行前期筛选。已公开报道的多能干细胞残留检测靶标基因列表见附录 G。

9.1.3 靶标基因的确认

多能干细胞残留检测靶标基因的确认满足以下条件。

- a) 宜使用与供试品细胞同等类型的成体原代分离细胞作为阴性质控细胞用于靶基因的确认试验。
- b) 如直接使用供试品细胞作为阴性质控细胞进行靶基因的确认试验,所用的供试品批次应经体内成瘤法、体外培养法检查,且结果为阴性。
- c) 检测靶标基因在阴性质控细胞中不表达,qPCR 检测结果为未检出(无典型扩增曲线)或 Ct 值 ≥ 35 。
- d) 如选择的靶标基因在阴性质控细胞中扩增 Ct 值 ≥ 35 ,且稳定检出特异扩增曲线,宜通过多个不同批次的阴性质控细胞的检测试验确立阴性质控细胞基础 Ct 值($C_{t_{\text{基础值}}}$)用于检测结果的判定。 $C_{t_{\text{基础值}}}$ 的测定宜在确立检测细胞取样量、RNA 提取/反转录、测试样本模板上样量、qPCR 反应体系/程序等关键参数的条件下,检测至少 3 个不同生产批次的阴性质控细胞中靶标基因的定量表达,根据检测结果确立 $C_{t_{\text{基础值}}}$ 。如 $C_{t_{\text{基础值}}} < 35$,则不推荐该基因作为干细胞残留检测靶标。
- e) 检测靶标基因应在多能干细胞中稳定表达,在多能干细胞 qPCR 检测结果为阳性,且 Ct 值宜 ≤ 25 。

9.2 内参基因的选择

9.2.1 应选择在分化前后表达稳定、变化小的基因作为内参。

9.2.2 内参基因在确定的检测条件下(样本细胞数量、核酸提取、反转录、qPCR 检测体系)的 Ct 值宜满足: $10 \leq \text{Ct 值} \leq 25$ 。

9.3 引物和探针的设计

9.3.1 应分别针对靶标基因和内参基因 mRNA 序列设计引物和探针序列,且设计原则和目的基因扩增长度应满足 GB/T 42077 中的相关要求。引物和探针设计时宜考虑跨内含子设计,以控制基因组 DNA 残留导致的假阳性扩增风险。

9.3.2 可通过设置不同的荧光基团标记的靶标基因和内参基因的探针进行检测。

注: 荧光基团的波长范围呈正态分布的,有一定的带宽,不同荧光基团的荧光信号会有一定的交集,因此,在同时选择多个荧光基团时,要注意尽量选择波长差距较大的荧光基团,避免不同荧光通道之间的互相干扰。

10 定量 PCR 反应的程序设计

10.1 通则

可选择一步法扩增反应(以 RNA 为检测模板)或两步法扩增反应(以 cDNA 为检测模板)检测试剂盒按照试剂盒说明书进行反应体系配置和程序设置。

10.2 实时定量 PCR 反应

10.2.1 反应体系配置:按照扩增试剂使用说明配置反应体系,每管反应体积宜大于或等于 $20 \mu\text{L}$ 。模板量宜参照最大量添加,每个测试样品应至少设置 3 个重复。

10.2.2 实时定量 PCR 反应程序如下。

实时荧光 PCR 仪:应符合 GB/T 42753 的要求,且应含有 TaqMan 探针上荧光报告基团的检测通道。

根据不同型号实时荧光 PCR 仪和所选扩增试剂的使用说明设置实时荧光 PCR 反应程序参数,包括但不限于反应温度、变温速率、反应时间、扩增循环数、荧光收集条件等;扩增循环数应大于或等于 40 个。

宜参照 GB/T 42077 中的相关要求设定阈值。

11 检出限

11.1 宜采用在阴性质控细胞中加标梯度数量多能干细胞的检测试验来确立残留检测方法的检出限(试验方案可参照附录 H)。

11.2 检测限的确认符合以下要求:

- 如靶标基因在阴性质控细胞 qPCR 检测结果为未检出(无典型扩增曲线),宜选取每个批次,每个复孔均能检出的最低加标比例,作为对应检测程序的检出限;
- 如靶标基因在阴性质控细胞 qPCR 检测结果中可检出,扩增 Ct 值 ≥ 35 , 宜选取每个批次,每个复孔均能检出,且靶基因相对表达值最低的检出限加标样本反应孔与靶基因相对表达值最高的阴性质控细胞样本反应孔之间 $\Delta\text{Ct} \leq -1$ 的最低加标比例,作为对应检测程序的检出限。

11.3 报告未检出时应附上方法的检测限。

12 检测对照的设置

检测中应设置对照以评估产生数据的总体质量和可靠性,包括但不限于:

- a) 阳性对照:以含有靶标扩增序列的质粒质控品或具有同等效果的核酸溶液(如多能干细胞的 cDNA)为模板进行的扩增反应,阳性模板的添加量应确保定量 PCR 试验可稳定检出,检出 Ct 值宜 ≤ 25 ;
- b) 模板阴性对照:以无菌水或缓冲溶液为模板进行扩增的反应;
- c) 反转录阴性对照:如使用的引物和探针定位于同一外显子区域,或所跨内含子长度较小(小于或等于 500 bp),应设置不添加逆转录酶的对照反应,以分析基因组 DNA 对检测结果的干扰程度;
- d) 细胞阴性对照:使用经验证靶标基因表达阴性的细胞(如与供试品细胞同等类型的成体原代分离细胞,或靶标基因表达阴性的其他类型体细胞)作为阴性表达细胞,与检测样本细胞平行处理的检测反应。

13 结果判定

13.1 质量控制

检测对照应满足以下条件,检测试验结果方可成立,出现任一项不符合,则检测试验不成立,需重新进行实时荧光 PCR 扩增:

- a) 阳性扩增对照检测结果 Ct 值应 ≤ 25 ;
- b) 模板阴性对照检测结果应为未检出或最低 Ct 值 ≥ 35 ;
- c) 反转录阴性对照检测结果应为未检出或最低 Ct 值 ≥ 35 ;
- d) 细胞阴性对照检测结果应为未检出或最低 Ct 值 ≥ 35 ;
- e) 供试品内参基因检测结果应为: $10 \leq \text{Ct 值} \leq 25$ 。

13.2 结果描述及判定

对检测结果做定性判定时,应满足以下要求:

13.2.1 阴性结果:供试品样本检测靶标基因无 Ct 值,无特异性的扩增曲线;或供试品样本检测靶标最低 Ct 值($\text{Ct}_{\text{供试品最低值}}$)大于或等于 $\text{Ct}_{\text{基础值}}$,则判定该样品残留多能干细胞未检出,残留量在检出限以下。

13.2.2 阳性结果:供试品样本检测靶标基因最高 Ct 值小于 $\text{Ct}_{\text{基础值}}$,出现特异性的扩增曲线,判定残留多能干细胞阳性,残留量大于检出限。

13.2.3 可疑结果:供试品样本检测靶标基因最高 Ct 值 $\geq \text{Ct}_{\text{基础值}}$,且任一反应孔 Ct 值小于 $\text{Ct}_{\text{基础值}}$ 的样品应复检,如复检结果靶标基因 Ct 值均 $\geq \text{Ct}_{\text{基础值}}$,则判定该样品残留多能干细胞未检出,残留量在检出限以下。如复检结果靶标基因任一反应孔 Ct 值 $< \text{Ct}_{\text{基础值}}$,且扩增曲线为典型 S 形态,则判定残留多能干细胞阳性,残留量大于检出限。

14 检测方法的验证

14.1 在应用已确认参数的干细胞残留检测方法前,应对检测方法进行验证。宜参照 GB/T 40277 中的考虑要素对检测方法性能参数进行验证,包括但不限于:

- a) 特异性;

- b) 精密度；
- c) 线性范围；
- d) 定量限；
- e) 检出限；
- f) 正确度；
- g) 稳健性。

14.2 应在检测过程中充分考虑可能影响结果评定或造成检出限漂移的因素,包括但不限于:

- a) 供试品细胞类型；
- b) RNA 提取与反转录方法；
- c) 检测引物探针；
- d) 扩增试剂的组分；
- e) 定量 PCR 检测仪器及其参数设定。

当上述因素发生变更时,应按照 GB/T 40277 中的内容对检测方法进行再次验证。



附 录 A
(资料性)

RNA 提取方法的性能评价 核酸产量/纯度

A.1 评价方案概述

使用细胞数目溯源法计算比较单位细胞数 RNA 产量。对平行样本进行不同待评价方法进行 RNA 提取,每种提取方法设定至少 6 个平行样本,提取获得的 RNA 样本使用分光光度法进行浓度、纯度测量,根据所得 RNA 体积计算得到总 RNA 产量,并通过细胞数目计算得到单位细胞数 RNA 产量,对其进行统计分析,并结合纯度值综合评价 RNA 提取方法的性能。

A.2 评价试验设计示例

样本准备:按试验需求取足够数量的供试品细胞样本,通过细胞计数制备成适合浓度(Con_{cell})的细胞悬液,按试验检测需求将按一定量体积(V_{cell})分装至足够数量的 EP 管中,离心去上清后获得细胞沉淀平行样本。

分组:将上述样品随机分组进行不同提取方法(方法 A,方法 B,方法 C……)检测,每组设定至少 6 个平行样本,记录每组样本数量 N_{sample} 立即进入下一步提取检测。

RNA 提取:按照不同检测方法的规范操作步骤进行 RNA 提取,使用分光光度法对所得每个样本进行浓度、纯度测量,并记录检测结果 RNA 浓度 Con_{RNA} , OD_{260}/OD_{280} 值, OD_{260}/OD_{230} 值和 RNA 体积 V_{RNA} 。

纯度评价:记录每组 OD_{260}/OD_{280} 值不在 1.8~2.2 范围内的样本数量 $N_{OD_{260}/OD_{280}}$ 和 OD_{260}/OD_{230} 值不在 1.8~2.5 范围内的样本数量 $N_{OD_{260}/OD_{230}}$ 。

按公式(A.1)计算提取不纯提取概率 P_{np} 百分比:

$$P_{np} = (N_{OD_{260}/OD_{280}} + N_{OD_{260}/OD_{230}}) / (2 \times N_{sample}) \times 100\% \dots\dots\dots (A.1)$$

P_{np} 百分比值越大,表明提取方法产生不纯样本的概率越高。

产量评价:按公式(A.2)计算细胞数 RNA 产量 Pro 值:

$$Pro = Con_{RNA} \times V_{RNA} / (Con_{cell} \times V_{cell}) \dots\dots\dots (A.2)$$

Pro 值越大,表明提取方法的产量越高。

附 录 B

(资料性)

RNA 提取方法的性能评价 完整性:电泳检测

通过琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 完整度。哺乳动物完整的总 RNA 一般会有清晰的三条带,相对分子质量从大到小分别为 28S、18S、5S,并且一般情况下 28S 是 18S 条带亮度的两倍;若能看见三条带,但带型模糊或弥散,则说明 RNA 有部分降解;若只能看见相对分子质量很小的一条带或没有条带,则 RNA 已完全降解,需要重新提取。



附 录 C

(资料性)

RNA 提取方法的性能评价 完整性:加标定量 PCR 方法

C.1 评价方案概述

在一定数量的供试品细胞中定量加入含有供试品中阴性表达核酸序列(以此序列做为检测靶标)的核酸样品,对平行样本用不同待评价方法进行 RNA 提取,每种提取方法设定至少 6 个平行样本,使用经验证的 qPCR 检测程序对样本中靶标序列含量进行荧光定量 PCR 检测,根据靶标扩增 Ct 值,评估提取方法的性能。

C.2 评价试验设计示例

样本准备:按试验需求取足够数量的供试品细胞样本,通过细胞计算制备成适合浓度的细胞悬液,按试验检测需求将按一定量体积分装至足够数量的 EP 管中,离心去上清后获得细胞沉淀平行样本,在每个样本中加入等量含有供试品中阴性表达核酸序列(以此序列作为检测靶标)的核酸样品(RNA_{ref})。

分组:将上述样品随机分组进行不同提取方法(方法 A,方法 B,方法 C……)检测,每组设定至少 6 个平行样本,立即进入下一步提取检测。

RNA 提取:按照不同检测方法的规范操作步骤进行 RNA 提取,使用分光光度法对所得每个样本进行浓度、纯度测量,并记录检测结果 RNA 浓度和 RNA 体积 V_{RNA} 。

阳性参考品 (REF): 将等量的 RNA_{ref} 样品稀释至终体积 V_{RNA} 。

荧光定量 PCR 检测:使用经验证的固定一步法 qPCR 检测程序对样本和阳性参考品中靶标序列进行检测,每个样本至少设置三个检测复孔。分别记录每个样本靶标序列的扩增 Ct 值和阳性参考品的扩增 Ct 值,并计算每组样本的平均靶标序列的扩增 Ct 值($\text{Ct}_{\text{target}}$)和平均阳性参考品的扩增 Ct 值(Ct_{ref})。

产量评价: $\text{Ct}_{\text{target}}$ 值越小,且越接近 Ct_{ref} ,表明提取方法的获得的 RNA 完整性越高。

附 录 D
(资料性)
残留基因组 DNA 评价

D.1 评价方案概述

以基因组中恒定非转录序列为检测靶标,并使用经验证的一步法 qPCR 检测程序对样本中靶标序列含量进行荧光定量 PCR 检测,根据靶标扩增 Ct 值,评估残留基因组 DNA 含量。

D.2 评价试验设计示例

样本准备:按试验需求取足够数量的供试品细胞样本,通过细胞计算制备成适合浓度的细胞悬液,按试验检测需求将按一定量体积分装至足够数量的 EP 管中,离心去上清后获得细胞沉淀平行样本。

分组与 RNA 提取:将上述样品随机分组进行 RNA 提取,进行不同去除基因组 DNA 处理(方法 A,方法 B,方法 C……),每组设定至少 6 个平行样本,立即进入下一步检测。

参考品 (REF):同类细胞样本的基因组 DNA。

荧光定量 PCR 检测:使用经验证的 qPCR 检测程序对样本和阳性参考品中靶标序列进行检测,样品靶标使用体系最大加样量。每个样本至少设置三个检测复孔。分别记录每个样本靶标序列的扩增 Ct 值和参考品的扩增 Ct 值,并计算每组样本的平均靶标序列的扩增 Ct 值($C_{t_{\text{target}}}$)和平均阳性参考品的扩增 Ct 值($C_{t_{\text{ref}}}$)。

产量评价:在参考品的扩增阳性的前提下,样本靶标序列检测阴性表明基因组 DNA 去除效果足够优秀, $C_{t_{\text{target}}}$ 值越低,表明基因组 DNA 去除效果越差,当 $C_{t_{\text{target}}} < 35$ 时,不推荐使用对应的基因组 DNA 去除方法进行残留多能干细胞的检测。

附录 E
(资料性)
反转录效率评价

E.1 评价方案概述

制备梯度 RNA 样本反转获得的 R-cDNA 样本与当量梯度稀释的 C-cDNA 样本,选定适宜检测靶标(在细胞样本中稳定阳性表达),并使用经验证的 qPCR 检测程序对样本中靶标序列含量进行检测,根据靶标扩增 Ct 值,评估反转录效率。

E.2 评价试验设计示例

R-cDNA 样本准备:使用梯度量的 RNA 进行反转录,得到一系列的 cDNA;比如使用 1 μg 、500 ng、250 ng、125 ng、62.5 ng 的 RNA 进行反转录,得到一系列的 cDNA 样品,记为 R-cDNA。

C-cDNA 样本准备:取 1 μg 反转录得到的 cDNA 进行 2 倍梯度稀释,具体同 RNA 的稀释,记为 C-cDNA。

荧光定量 PCR 检测:使用经验证的 qPCR 检测程序对 R-cDNA 和 C-cDNA 同时进行荧光定量检测,记录每个样本的检测 Ct 值。

效率评价:根据荧光定量 PCR 检测结果分别绘制 R-cDNA 梯度样品和 C-cDNA 梯度样品的标准曲线。根据两条标准曲线的重合程度评价反转录效率,反转录效率与两条标准曲线的重合程度正相关。

中国细胞生物学学会
CHINESE SOCIETY FOR CELL BIOLOGY

附 录 F
(资料性)

中间样本保存条件与效期的验证

F.1 验证方案概述

在检出限条件下制备平行待检测中间样本(如细胞离心沉淀、细胞裂解液、RNA、cDNA),设置不同保存条件与梯度保存时间,在不同时间点取出试验组样本进行后续检测,组内检出限样本结果均判定为阳性的试验组对应保存条件与效期通过验证。

F.2 保存条件

参考的保存条件如表 F.1 所示:

表 F.1 中间样本参考保存条件

样本类型	保存条件
细胞离心沉淀	短期保存:2℃~8℃;长期保存:-80℃
细胞裂解液	短期保存:2℃~8℃;长期保存:-80℃
RNA	短期保存:2℃~8℃;长期保存:-80℃
cDNA	短期保存:2℃~8℃;长期保存:-20℃或-80℃

F.3 效期验证

F.3.1 验证样品准备。

- a) 阴性质控细胞样本与检出限样本:
- 按试验需求取足够数量的阴性质控细胞样本,通过细胞计数制备成适合浓度的细胞悬液,根据检测方法中规定的测试细胞数量,按定量体积分装至 EP 管中,按下述方案分别准备阴性质控细胞样品与检出限样本;
 - 阴性质控细胞样品:在 a) 步骤中所得的分装样本直接离心去上清后获得细胞沉淀平行样本;
 - 检出限样本:按照检出限条件在 a) 步骤中所得的分装样本中加入规定数量的种子多能干细胞,离心去上清后获得细胞沉淀平行样本。
- b) 阳性对照样本:多能干细胞样本。

F.3.2 验证试验设计与对应接受标准示例见表 F.2:

表 F.2 中间样本保存效期验证方案

验证样本	试验设计	可接受标准
细胞离心 样本	按照试验需求平行准备足够数量阴性质控细胞样品、检出限样本和阳性对照样本。分别按照 2℃~8℃ 保存梯度时间点(如立即检测、1 h、2 h、4 h) 和-80℃ 保存梯度时间点(如立即检测、3 d、5 d、10 d) 设组,每组的每类样本至少设计 3 个平行样。其中取一组样本立即进行后续检测,其余样本按试验设计方案保存于 2℃~8℃ 冰箱或冻存于-80℃ 冰箱,分别在所设计的时间点取出进行后续检测,按照检测程序中规定的参数进行结果判定	检测结果满足以下条件的试验组判定为通过验证: a) 试验组中所有阴性质控细胞判定为阴性; b) 试验组中所有的检出限样本判定为阳性; c) 试验组中所有的阳性对照样本判定为阳性
细胞裂解 液样本	按照试验需求平行裂解足够数量阴性质控细胞、检出限样本和阳性对照样本。分别按照 2℃~8℃ 保存梯度时间点(如立即检测、1 h、2 h、4 h) 和-80℃ 保存梯度时间点(如立即检测、3 d、5 d、10 d) 设组,每组的每类样本至少设计 3 个平行样。其中取一组样本立即进行后续检测,其余样本按试验设计方案保存于 2℃~8℃ 冰箱或冻存于-80℃ 冰箱,分别在所设计的时间点取出进行后续检测,按照检测程序中规定的参数进行结果判定	
RNA 样本	按照试验需求平行准备足够数量阴性质控细胞样品、检出限样本和阳性对照样本,在同一次试验中,完成所有样本 RNA 的提取,将提取的 RNA 按照试验设计的所需的模板量进行等量分装,分别按照 2℃~8℃ 保存梯度时间点(如立即检测、4 h、24 h、48 h) 和-80℃ 保存梯度时间点(如立即检测、3 d、5 d、10 d) 设组,每组的每类样本至少设计 3 个平行样。其中取一组样本立即进行后续检测,其余样本按试验设计方案保存于 2℃~8℃ 冰箱或冻存于-80℃ 冰箱,分别在所设计的时间点取出进行后续检测,按照检测程序中规定的参数进行结果判定	
cDNA 样本	按照试验需求平行准备足够数量阴性质控细胞样品、检出限样本和阳性对照样本,在同一次试验中,完成所有样本的反转录,将获得的 cDNA 样本,按照试验设计的所需的模板量进行等量分装,分别按照 2℃~8℃ 保存梯度时间点(如立即检测、4 h、24 h、48 h) ,-20℃ 保存梯度时间点(如立即检测、3 d、10 d、30 d) 和-80℃ 保存梯度时间点(如立即检测、3 d、30 d、60 d) 设组,每组的每类样本至少设计 3 个平行样。其中取一组样本立即进行后续检测,其余样本按试验设计方案保存于 2℃~8℃ 冰箱或冻存于-20℃ 或-80℃ 冰箱,分别在所设计的时间点取出进行后续检测,按照检测程序中规定的参数进行结果判定	

F.3.3 中间样本保存效期设定:在通过验证的前提下,在一定条件下保存的最长时间设定为该条件下样本的效期。

附 录 G

(资料性)

多能干细胞残留检测靶标基因示例

已公开报道的多能干细胞残留检测靶标基因示例见表 G.1。

表 G.1 已公开报道的多能干细胞残留检测靶标基因示例

检测靶标基因	供试品细胞类型	参考资料
LIN28A	心肌细胞	Highly sensitive droplet digital PCR method for detection of residual undifferentiated cells in cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells, Regen Ther. 2015
miR-489-3p, miR-1/133a-3p, let-7c-5p	心肌细胞	Seamless and non-destructive monitoring of extracellular microRNAs during cardiac differentiation from human pluripotent stem cells, Stem Cell Reports. 2023
ESRG, ZSCAN10	心肌细胞、肝细胞、神经细胞	Universal Markers for hiPSCs Residue Detection, Front Biosci. 2022
ESRG, CNMD, SFRP2	肝细胞、胰细胞、神经细胞	Robust detection of undifferentiated iPSC among differentiated cells, Sci Rep. 2020
LIN28A, IDO1, CNMD	肌管、肌母细胞、神经元、肝细胞、心肌细胞、巨噬细胞和单核细胞	Identification of marker genes to monitor residual iPSCs in iPSC-derived products, Cytotherapy. 2023
POU5F1, LIN28, TRA-2-49	多巴胺能神经前体细胞	Pre-clinical study of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitor cells for Parkinson's disease, Nat Commun. 2020
LNCPRESS2, LINC00678, LOC105370482	胰岛细胞	Estimating residual undifferentiated cells in human chemically induced pluripotent stem cell derived islets using lncRNA as biomarkers, Sci Rep. 2020
miR-302a-5p, miR-302c-3p, miR-302d-5p	NK 细胞	Development of an induced pluripotent stem cell specific microRNA assay for detection of residual undifferentiated cells in natural killer cell therapy products, Cytotherapy. 2022
LIN28A	视网膜色素上皮细胞	Highly Sensitive In Vitro Methods for Detection of Residual Undifferentiated Cells in Retinal Pigment Epithelial Cells Derived from Human iPS Cells, PLoS One. 2012

附录 H

(资料性)

检出限确立的研究方案

H.1 方案概述

在确定干细胞残留检测程序下对梯度加标样本进行检测,筛选出可稳定检出且表达量显著高于阴性质控细胞样品的最低加标量,该最低加标量设为对应检测程序的检出限。

H.2 验证试验设计与判定接受标准示例

H.2.1 样本准备

H.2.1.1 阴性质控细胞和梯度加标样品准备:

- 按试验需求取足够数量的阴性质控细胞样本,通过细胞计算制备成适合浓度的细胞悬液,按检测方法中规定的测试细胞数量(如 2×10^6 /样本)按定量分装至足够数量的 EP 管中,按下述方案分别准备阴性质控细胞样品与检出限加标样本;
- 阴性质控细胞样品:在 a) 步骤中所得的分装样本直接离心去上清后获得细胞沉淀平行样本;
- 梯度加标样品:按照检出限条件在 a) 步骤中所得的分装样本中加入梯度数量的种子多能干细胞(如 2、20、200、2 000 个多能干细胞),离心去上清后获得细胞沉淀平行样本。

H.2.1.2 阳性对照样本:与供试品样本同等数量的多能干细胞样品,离心去上清后获得细胞沉淀平行样本。

H.2.2 检测试验与重复确认

H.2.2.1 在确定干细胞残留检测程序下对阴性质控细胞样品、梯度加标样品、阳性对照样本进行检测,每个样本至少设计 10 个平行检测复孔。分析并记录检测结果。

H.2.2.2 按照相同的试验方案,完成至少 3 个不同批次的阴性质控细胞的检出限试验。

H.2.3 检出限确认判定

H.2.3.1 检出限确认前提条件:在满足下列条件的前提下,试验研究数据可用于检出限确认:

- 在阴性质控细胞 qPCR 检测结果为未检出(无典型扩增曲线)或 C_t 值 ≥ 35 ;
- 阳性对照样本检测结果为阳性,且 C_t 值 ≤ 25 。

H.2.3.2 检出限确认:

- 情况 A:所有阴性质控细胞 qPCR 检测结果为未检出(无典型扩增曲线):
比较测试结果,选取每个批次,每个复孔均能检出的最低加标量,作为对应检测程序的检出限;
- 情况 B:有阴性质控细胞反应孔中 qPCR 检测结果扩增 C_t 值 ≥ 35 :
比较测试结果,选取每个批次,每个复孔均能检出,且靶基因相对表达值最低的检出限加标样本反应孔与靶基因相对表达值最高的阴性质控细胞样本反应孔之间 $\Delta C_t \leq -1$ 的最低加标量,作为对应检测程序的检出限。

参 考 文 献

- [1] GB/T 42466—2023 生物样本库多能干细胞管理技术规范
- [2] ICH 协调指导原则 Q14:分析方法开发
- [3] ICH 协调指导原则 Q2(R2):分析方法验证
- [4] Highly sensitive droplet digital PCR method for detection of residual undifferentiated cells in cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells, Regen Ther. 2015
- [5] Seamless and non-destructive monitoring of extracellular microRNAs during cardiac differentiation from human pluripotent stem cells, Stem Cell Reports. 2023
- [6] Universal Markers for hiPSCs Residue Detection, Front Biosci. 2022
- [7] Robust detection of undifferentiated iPSC among differentiated cells, Sci Rep. 2020
- [8] Identification of marker genes to monitor residual iPSCs in iPSC-derived products, Cytotherapy. 2023
- [9] Pre-clinical study of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitor cells for Parkinson's disease, Nat Commun. 2020
- [10] Estimating residual undifferentiated cells in human chemically induced pluripotent stem cell derived islets using lncRNA as biomarkers, Sci Rep. 2020
- [11] Development of an induced pluripotent stem cell specific microRNA assay for detection of residual undifferentiated cells in natural killer cell therapy products, Cytotherapy. 2022
- [12] Highly Sensitive In Vitro Methods for Detection of Residual Undifferentiated Cells in Retinal Pigment Epithelial Cells Derived from Human iPS Cells, PLoS One. 2012

中国细胞生物学学会
CHINESE SOCIETY FOR CELL BIOLOGY