

CHO Host Cell DNA Residue Detection Kit

CHO 宿主细胞 DNA 残留检测试剂盒

产品信息

产品名称	产品编号	规格
CHO Host Cell DNA Residue Detection Kit	41301ES50	50T
CHO 宿主细胞 DNA 残留检测试剂盒	41301ES60	100T

产品描述

CHO 宿主细胞 DNA 残留检测试剂盒是用于定量分析检测各种生物制品的中间品、半成品和成品中的 CHO 残留 DNA 含量的试剂盒。

本试剂盒采用探针法荧光定量 PCR 原理，可专一快速的检测 CHO 细胞的残留 DNA，其最低检测限可以达到 fg 水平。该试剂盒可与本公司的磁珠法残留 DNA 样本前处理试剂盒（Cat#18461ES/18462ES）配套使用。

产品组分

组分编号	组分名称	产品编号/规格	
		41301ES50 (50T)	41301ES60 (100T)
41301-A	CHO qPCR mix	1 mL	2 mL
41301-B	DNA Dilution Buffer	2×2 mL	4×2 mL
41301-C	CHO DNA Control (30 ng/μL)	25 μL	50 μL

【注】：本试剂盒不含 ROX 参比染料，若您目前使用的 Real Time PCR 扩增仪需要添加 ROX 参比染料，推荐您购买本公司的 50× ROX Reference Dye (Cat#10200ES)。

运输和保存方法

1. 所有组分均干冰运输，-20℃保存，有效期 2 年。
2. 收到货后，请检查共 3 个组分是否齐全，并立即放入对应的保存温度中储存。

注意事项

1. 使用本试剂前请仔细阅读本说明书，实验应规范操作，包括样本处理、反应体系的配制及加样。
2. 加样和配液步骤尽量都在冰上操作。
3. 每个组分在使用前都应充分震荡混匀，低速离心。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
5. 本产品仅作科研用途。

适用机型

包含但不限于以下仪器：

Bio-Rad: CFX96 Optic Module;

Thermo Scientific: ABI 7500; ABI Quant Studio 5; ABI Step OnePlus.

使用方法

一、CHO DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

用试剂盒中提供的 DNA 稀释液将 DNA 定量参考品进行梯度稀释，稀释浓度依次为 300 pg/μL、30 pg/μL、3 pg/μL、300 fg/μL、30 fg/μL、3 fg/μL。

具体操作如下：

1. 将试剂盒中的 DNA 定量参考品和 DNA 稀释液置于冰上融化，待完全融化后，轻微振荡混匀，低速离心 10 sec。
2. 取 7 支洁净的 1.5 mL 离心管，分别标记为 3 ng/μL，①，②，③，④，⑤，⑥。
3. 在标记为 3 ng/μL 的 1.5 mL 离心管中加入 90 μL DNA 稀释液和 10 μL DNA 定量参考品（30 ng/μL），即稀释为 3 ng/μL，振荡混匀后短时间快速离心 10 sec，该浓度可分装置于 -20°C 短期保存（不超过 3 个月），使用时避免反复冻融。
4. 在 ①，②，③，④，⑤，⑥ 管中先分别加入 90 μL DNA 稀释液，再进行梯度稀释，稀释方法如下：

稀释管	稀释比例	终浓度
①	10 μL 3 ng/μL + 90 μL DNA 稀释液	300 pg/μL
②	10 μL ① + 90 μL DNA 稀释液	30 pg/μL
③	10 μL ② + 90 μL DNA 稀释液	3 pg/μL
④	10 μL ③ + 90 μL DNA 稀释液	300 fg/μL
⑤	10 μL ④ + 90 μL DNA 稀释液	30 fg/μL
⑥	10 μL ⑤ + 90 μL DNA 稀释液	3 fg/μL

【注】：

1. 每个浓度做 3 个复孔，该试剂可测试 3 fg/μL-300 pg/μL 线性范围。若需要，可适当扩大或缩小线性范围。
2. 为减少反复冻融次数和避免污染，建议初次使用时将 DNA 定量参考品分装储存于 -20°C。
3. 已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于 2-8 °C 7 天，若长时间不用，请放置于 -20°C。
4. 为确保模板完全混匀，每个梯度稀释时需轻微震荡混匀约 1 min。

二、样本加标回收质控 QC 的制备

根据需要设 QC 中的 CHO DNA 标准品浓度（以制备加 3 pg/μL DNA 量的样本加标回收为例），具体操作如下：

1. 取 100 μL 待测样本加入 1.5 mL 洁净的离心管中，再加入 10 μL 溶液③，混匀，标记为加标回收 QC。
2. 加标回收 QC 和同批待测样本一起进行样本前处理，制备加标回收 QC 纯化液。

三、标准品回收质控 QC 的制备（可选）

根据需要设 QC 中的 CHO DNA 标准品浓度（以制备加 3 pg/μL DNA 量的标准品回收为例），具体操作如下：

1. 取 100 μL 溶液③加入 1.5 mL 洁净的离心管中，标记为标准品回收 QC。
2. 标准品回收 QC 和同批待测样本一起进行样本前处理，制备标准品回收 QC 纯化液。

四、阴性质控 NCS 的制备

根据实验设置阴性质控，具体操作如下：

1. 取 100 μL 样本基质溶液（或 DNA 稀释液）加入 1.5 mL 洁净的离心管中，标记为阴性质控 NCS。
2. 阴性质控 NCS 和同批待测样本一起进行样本前处理，制备成阴性质控 NCS 纯化液。

五、无模板对照 NTC 的制备

根据实验设置无模板对照 NTC，具体操作如下：

1. 无模板对照 NTC 无需进行样本前处理，在 qPCR 法检测残留 DNA 含量阶段开始配置即可。
2. 每管或孔中的 NTC 样本为 20 μL CHO qPCR Mix + 20 μL DNA Dilution Buffer，建议配置 3 个重复孔的量。

六、反应体系

组分	体积 (μL)
CHO qPCR Mix	20
DNA template	20
总体积	40

【注】:

- 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR Mix 总量: $\text{qPCR Mix} = (\text{反应孔数} + 2) \times 20 \mu\text{L}$ (含有 2 孔的损失量)。通常, 每个样本做 3 个重复孔。
- 加样完成密封好管子后, 请先低速离心 10 sec 将管壁的液体离心收集至管底, 再震荡混匀 5 sec 以上, 完全混匀反应液, 再低速离心 10 sec 将管壁的液体离心收集至管底, 如有气泡, 需将气泡排尽。

下图为参考板位:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC		标准曲线①	标准曲线①	标准曲线①		加标回收 QC1	加标回收 QC1	加标回收 QC1	待测样本 1	待测样本 1	待测样本 1
B	NTC		标准曲线②	标准曲线②	标准曲线②		加标回收 QC2	加标回收 QC2	加标回收 QC2	待测样本 2	待测样本 2	待测样本 2
C	NTC		标准曲线③	标准曲线③	标准曲线③		加标回收 QC3	加标回收 QC3	加标回收 QC3	待测样本 3	待测样本 3	待测样本 3
D			标准曲线④	标准曲线④	标准曲线④							
E			标准曲线⑤	标准曲线⑤	标准曲线⑤		标准品回收 QC1	标准品回收 QC1	标准品回收 QC1	阴性质控 NC1	阴性质控 NC1	阴性质控 NC1
F			标准曲线⑥	标准曲线⑥	标准曲线⑥		标准品回收 QC2	标准品回收 QC2	标准品回收 QC2	阴性质控 NC2	阴性质控 NC2	阴性质控 NC2
G							标准品回收 QC3	标准品回收 QC3	标准品回收 QC3	阴性质控 NC3	阴性质控 NC3	阴性质控 NC3
H												

该示例是对 CHO 残留 DNA qPCR 法检测操作的展示, 检测样本包括: 1 个无模板对照 NTC、6 个浓度梯度的 DNA 标准曲线、3 个样本加标回收 QC、3 个待测样本、3 个标准品回收 QC (可选)、3 个阴性质控 NCS (1 个即可)。建议每个样本做 3 个重复孔。

七、扩增程序参数设置 (两步法) (以 Bio-Rad 公司 CFX 96 qPCR 仪、软件版本 4.1.2433.1219 为例)

- 创建空白新程序, 选择绝对定量检测模板。
- 创建 1 个检测探针, 命名为“CHO-DNA”, 选择“run setup”栏中的“select run type”下方的“user-define”, 在“run setup”界面中开始程序、板位、通道的设置:
 - 首先, 在“protocol”下点击“Create New”开始设置 PCR 程序, 设置好后点击“OK”, 保存程序文件。
 - 点击“Next”或者“plate”进入孔位设置界面, 点击“create new”, 在“Scan Mode”中可以选择“All Channels”或者“SYBR/FAM Only”选项。用鼠标勾选反应格, 点击“select fluorophores”选项, 勾选“FAM”后点击“OK”, 在“sample type”选项下选择“unknow” (或其他样本类型), 勾选“target name 栏下的“load”右边的框, 同时根据个人需求设置“target name”, 也可不设置。根据个人需求在选项“Sample names”和“Biological Group”中输入样本名称和组别, 也可不设置。点击“OK”保存好最后的结果文件。
 - 点击“Next”或“Start run”, 开始仪器运行。
- 扩增程序设置: 设置反应体积 40 μL。

循环步骤	温度 (°C)	时间	循环数
预变性	95 °C	5 min	1
变性	95 °C	15 sec	40
退火/延伸 (收集荧光)	60 °C	30 sec	

八、qPCR 结果分析

- 上机结束后, 在程序的右上角点击“plate setup”栏下的“view/edit plate”, 选中标准品的反应格, 在右侧的“sample type”栏下选择“standard”, 设置好每个梯度的重复孔, 在“loda concentration”下输入所做的浓度后按“enter”键确认, 依次将标准品的梯度设置完成。
- 点击“OK”, 返回到初始界面, 即可读取标准曲线的 R^2 、扩增效率 (Eff%)、斜率 (Slope)、截距 (Intercept) 等。正常的标曲: $R^2 > 0.99$; 扩增效率在 $90\% \leq \text{Eff}\% \leq 110\%$ 范围内; Slope 在 -3.4 左右。
- 根据设置的样本名称和组别, 读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样本和样本加标回收等的检测值, 单位为 $\text{fg}/\mu\text{L}$, 后续可在检测报告中将单位换算成 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 或 pg/mL 。