

CHO DNA残留检测试剂盒(qPCR法)说明书

【产品介绍】

CHO DNA残留检测试剂盒(qPCR法)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CHO宿主细胞DNA残留量的专用试剂盒。

本试剂盒利用TaqMan荧光探针法定量PCR原理, 定量检测生物制品样本中残留的宿主DNA, 其检测快速, 专一性强, 最低检测限可以达到fg水平。

试剂盒配套的CHO细胞DNA定量参考品, 其定标通过与国家标准品对比。

***本试剂盒专用于科研, 而非用于诊断**

【规格】

100 Reactions

【试剂盒组成】

组分	规格	货号	储存条件
qPCR Reaction Mix	1.0mL×1管	D102-1	-20°C及以下条件 避光保存
Primer & Probe Mix	1管	D102-2	
定量参考品(20ng/μL)	20μL×1管	D102-3	
DNA稀释液	1.5mL×2管	D102-4	

表1 试剂盒组分及储存条件

【运输和保存方法】

1. 规定储存条件下暂定12个月, 具体见试剂盒标签。
2. 收到货后, 请检查共4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、反应体系的配置及加样。
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, 请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
5. 本产品仅作科研用途。

【实验所需自备器材】

- a. 荧光定量PCR仪
- b. 1000 μL, 100 μL, 10 μL 移液枪
- c. 1000 μL, 100 μL, 10 μL 无菌低吸附带滤芯枪头
- d. 1.5 mL 无菌离心管
- e. 无菌无酶八连管或96孔qPCR板

【使用方法】

▪ 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 3 ng/μL、300 pg/μL、30 pg/μL、3 pg/μL、300 fg/μL、30 fg/μL。

具体操作如下:

1. 将试剂盒中的 DNA 定量参考品和 DNA 稀释液置于冰上或 2-8°C 条件下融化, 待完全融化后, 轻弹数下混匀, 短时间快速离心 3~5 sec, 如此重复 3 次。
2. 取 7 支干净的 1.5 mL 离心管, 分别标记为 ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6。
3. 在 ST0 管中用 DNA 稀释液将 DNA 定量参考品稀释至 3 ng/μL, 振荡混匀后短时间快速离心 3~5 sec, 重复 3 次以确保定量参考品与 DNA 稀释液充分混匀。
4. 在 ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6 管中分别加入 90 μL DNA 稀释液。
5. 按表 2 依次进行 6 次稀释操作。

表2 CHO DNA 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度
ST1	20 μL ST0+180 μL DNA 稀释液	300 pg/μL
ST2	20 μL ST1+180 μL DNA 稀释液	30 pg/μL
ST3	20 μL ST2+180 μL DNA 稀释液	3 pg/μL
ST4	20 μL ST3+180 μL DNA 稀释液	300 fg/μL
ST5	20 μL ST4+180 μL DNA 稀释液	30 fg/μL
ST6	20 μL ST5+180 μL DNA 稀释液	3 fg/μL

- ▶ 已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于 2-8°C
- ▶ 若 DNA 稀释液中有析出, 建议于 37°C 条件下进行孵育
- ▶ 标准曲线浓度点可根据实际验证结果选择, 应至少有 5 个浓度点
- ▶ 定量参考品浓度标注于管壁标签上, 请确认浓度后再进行稀释

▪ 样本加样回收质控 ERC 的制备

根据需要设 ERC 中的 DNA 标准品浓度(以制备加 2 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 ST3, 混匀, 标记为加标回收 ERC。
2. 加标回收 ERC 和同批待测样本一起进行样本前处理, 制备加标回收 ERC 纯化液。

▪ 标准品回收质控QC的制备(可选)

根据需要设 QC 中的 DNA 标准品浓度(以制备加 3 pg/ μ L DNA 量的标准品回收为例)

具体操作如下:

1. 取 100 μ L 溶液ST3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。

▪ 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 μ L DNA 稀释液加入 1.5 mL 干净的离心管中, 标记为阴性质控 NCS。
2. 阴性质控 NCS 和同批待测样品一起进行样品前处理, 制备成阴性质控 NCS 纯化液。

▪ 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 10.24 μ L qPCR Mix + 9.76 μ L DNA 稀释液, 建议配置 3 个重复孔的量。

▪ qPCR 反应体系的制备和加样

1. 各试剂放在冰上或 2-8 $^{\circ}$ C条件下融化。
2. qPCR Mix: qPCR Mix 配制: 将1管qPCR Reaction Mix反复颠倒混匀10次, 瞬时离心10秒, 全部移至 Primer & Probe Mix 管(棕色管), 涡旋混匀, 瞬时离心10秒, 备用。
3. 根据所要检测的标准曲线及待测样品数量, 计算所需反应孔数, 一般做 3 个重复孔/样。反应孔数=(6 个浓度梯度的标准曲线+ 1 个无模板对照 NTC+ 1 个阴性质控 NCS +待测样品 \times 2) \times 3
4. 各试剂置于冰上, 轻微振荡混匀, 按表3所示加样(总体积20 μ L)。

表3 各反应孔加样示例

模板	模板量
标准曲线	10.24 μ L qPCR Mix + 9.76 μ L ST1/ST2/ST3/ST4/ ST5/ST6
NTC	10.24 μ L qPCR Mix + 9.76 μ L DNA稀释液
NCS	10.24 μ L qPCR Mix + 9.76 μ L 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	10.24 μ L qPCR Mix + 9.76 μ L 待测样品纯化液
样品ERC	10.24 μ L qPCR Mix + 9.76 μ L 样品 ERC 纯化液

5. 试验可使用无菌无酶的八联管或者 96 孔板进行反应, 需去除反应体系中的气泡, 并离心至管底准备反应。

▪ 扩增程序参数设置(三步法)

1. 创建空白新程序, 选择绝对定量检测模板。
2. 创建新检测探针, 命名为“CHO-DNA”, 选择报告荧光基团为FAM, 淬灭荧光基团为NONE, 检测参比荧光为ROX(可选):
3. 设置三步法反应程序: **50°C, 2 min; 95°C预变性10 min; 95°C 15 s, 60°C 1min(读取荧光), 40个循环; 设置反应体积 20 μL。**

▪ qPCR 结果分析

1. 上机结束后, 按照仪器数据分析方法进行相关设置与操作: 依次将标准品的梯度设置完成。
2. 即可读取标准曲线的 R^2 、扩增效率(Eff %)、斜率(Slope)等。正常的标曲: $R^2 > 0.98$; 扩增效率在 $80\% \leq \text{Eff \%} \leq 120\%$ 范围内; Slope 在 $-3.8 \sim -3.1$ 之间。
3. 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 fg/μL, 后续可在检测报告中将单位换算成 pg/μL 或 pg/mL。
4. 根据待测样品和样品ERC的检测结果计算加样回收率, 加样回收率要求在50%~150%之间。
5. 无模板对照 NTC 的检测结果为其均值不超过 4 fg/μL, 或根据实验室自身验证结果设定具体标准。

上述示例结果分析的参数设置仅供参考, 具体需依据实验室机型及使用的软件版本进行设定, 一般也可由仪器自动判读。