

CHO 残留 DNA 检测试剂盒

(PCR-荧光探针法) 说明书

货号：BP-QN06-100

版本：03 版

本产品仅供研究用

珠海横琴宝锐生物科技有限公司

【产品名称】

CHO 残留 DNA 检测试剂盒 (PCR-荧光探针法)

【包装规格】

100 Reactions/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定量检测各种生物制品及药品的中间品、半成品和成品中残留的 CHO 宿主细胞 DNA。

【产品简介】

本试剂盒采用 PCR-荧光探针法，针对 CHO 细胞的保守序列，设计引物探针，能够定量检测样本中 CHO 残留 DNA。试剂盒含有外源性内标，内标可以与样本一起参与提取扩增，用于监控提取与扩增是否异常，防止假阴性的产生。本试剂盒含有 UDG 酶，用于预防扩增产物的污染。

本试剂盒与珠海横琴宝锐核酸提取或纯化试剂盒搭配使用。

【主要成分与含量】

试剂盒组分	规格 (100 Reaction/盒)
CHO qPCR MIX	1.0mL×2 管
CHO 内标*	1.0mL×1 管
CHO 阴性对照	1.0mL×2 管
CHO 校准品 ST1	0.5mL×1 管 (3fg/μL)
CHO 校准品 ST2	0.5mL×1 管 (30fg/μL)
CHO 校准品 ST3	0.5mL×1 管 (300fg/μL)
CHO 校准品 ST4	0.5mL×1 管 (3pg/μL)
CHO 校准品 ST5	0.5mL×1 管 (30pg/μL)
CHO 校准品 ST6	0.5mL×1 管 (300pg/μL)

说明：

不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

实验操作中需要但试剂盒中未提供的试剂：核酸提取或纯化试剂盒。

*若不使用试剂盒内标功能，提取时无需添加内标，程序设置时可以不设置内标通道，结果分析时无需关注内标结果。

*若样品提取时未添加内标，扩增时加内标，则配制 MIX 时每反应液加 1μL 内标，分装 qPCR MIX 时分装 21μL/反应，此时 PCR 总反应体积为 31μL/反应。

【储存条件及有效期】

1. 置于≤-20°C下避光保存，有效期 24 个月。
2. 避免反复冻融，反复冻融次数不超过 10 次。
3. 产品有效期及失效日期见标签。

【适用机型】

包括但不限于以下机型：SLAN-96P、SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统；ABI7500、ABI QuantStudio™ 5 实时荧光定量 PCR 仪；Roche LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪；伯乐 CFX96 定量 PCR 仪。

【检验方法】

从试剂盒中取出 CHO qPCR MIX、CHO 内标、CHO 阴性对照、CHO 校准品 ST1-ST6，置于室温融化，充分震荡混匀后瞬时离心备用。

1. 加样回收质控 ERC 制备

根据需要设置 ERC 中的 CHO DNA 加样浓度 (以制备加 3pg CHO DNA 量的 ERC 为例) , 具体操作如下:

1) 取 100 μ L 待测样本加入 1.5mL 干净的离心管中;

2) 加入 10 μ L ST3 后混匀瞬时离心, 标记为样本 ERC。样本 ERC 和同批待测样本一起进行核酸提取纯化, 得到的核酸即为样本 ERC 核酸。

2. 反应液准备

2.1 根据待测标本数, 计算所需的 PCR 反应液数, 一般建议做 3 个重复/样。

PCR 反应液数= (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+待测样本+待测样本 ERC) \times 3。然后将相应数量的 PCR 反应液, 按照一孔 20 μ L 的量分装至 96 孔 PCR 板或者 PCR 八连管中。

2.2 各反应孔加样示例:

组分	加样量
标准曲线	20 μ L CHO qPCR MIX + 10 μ L ST1/ST2/ST3/ST4/ST5/ST6
NTC	20 μ L CHO qPCR MIX + 10 μ L 阴性对照
NCS	20 μ L CHO qPCR MIX + 10 μ L NCS 纯化液
待测样本	20 μ L CHO qPCR MIX + 10 μ L 待测样本纯化液
样本 ERC	20 μ L CHO qPCR MIX + 10 μ L 样本 ERC 纯化液

3. 样本核酸提取

操作步骤参照核酸提取或纯化试剂盒说明书, 样本量为 100 μ L, 内标添加量为 10 μ L。

4. 荧光 PCR 反应

4.1 按照 2.2 的方法将核酸加入到 CHO qPCR MIX 中, 盖好反应管盖或者用光学膜封闭 96 孔 PCR 板, 混匀后瞬时离心, 转移到荧光 PCR 仪器上。

4.2 在荧光 PCR 仪上运行以下程序:

步骤	条件	循环数
UDG 处理	50°C: 2 分钟	1
预变性	95°C: 3 分钟	1
PCR 扩增	95°C: 10 秒, 60°C (采集荧光) : 30 秒	45

荧光通道选择 FAM、CY5, 其中 FAM 为 CHO DNA, CY5 为内标。若仪器为 ABI 系列, 参比荧光选择 ROX。

5. 结果判定

5.1 阈值线设定

阈值线依据仪器噪声情况进行调整, 以刚好超过 CHO 阴性对照品扩增曲线的最高点为准。若仪器自动阈值线超过了 CHO 阴性对照品扩增曲线最高点, 也可以采用仪器自动阈值。

5.2 内标的判读

对于阴性结果内标 Ct 值应 \leq 35; 对于阳性结果, 可能会因为竞争抑制, 导致阳性结果内标不出值或者出值较差。

5.3 试验成立条件

NTC, NCS 的 FAM 通道显示无 Ct 值或 Ct 值 $>$ 35; 标准曲线线性相关性 $R^2 > 0.98$ 。

6. 结果分析

6.1 以 SLAN-96P 为例:

1) 若需要调整阈值线, 在“实验分析”面板的“参数设置”中, 将阈值设置到合适高度;

2) 在“孔板编辑”面板中, 将校准品的“样本类型”一栏设置为标准品, 并且在“属性”一栏分别赋值为 300000、30000、3000、300、30、3 (含义为每孔的 DNA 浓度, 单位为 fg/ μ L) , 并且

在相应的“样本名称”一栏中命名为 ST6、ST5、ST4、ST3、ST2、ST1；

- 3) 在“实验分析”的“标准曲线”面板中，可读取标准曲线的斜率、截距、相关系数、扩增效率；
- 4) 在“实验分析”的“反应孔信息表”面板中，“浓度”一栏可读取检测结果的浓度值，单位为 fg/ μ L。后续可在检测报告中依据用户需要将单位换算为 pg/ μ L 或 pg/mL。根据待测样本和样本 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。

6.2 以 ABI 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 2.4 为例：

1) 若需要调整阈值线，在 Analysis 的 Amplification Plot 面板中，将 FAM 通道、CY5 通道 Threshold 设置到合适位置；

2) 在 Setup 的 Plate Setup 面板中，将标准曲线孔的 Task 一栏设置为 Standard，并且在 Quantity 一栏分别赋值为 300000、30000、3000、300、30、3（含义为每孔的 DNA 浓度，单位为 fg/ μ L），并且在相应的 Sample 一栏中命名为 ST6、ST5、ST4、ST3、ST2、ST1。将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC，将阴性质控 NCS 孔、待测样本孔、样本 ERC 孔的 Task 一栏设置为 Unknown，并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 NTC、NCS、S、ERC，点击 Analyze；

3) 在 Analysis 的 Standard Curve 面板中，可读取标准曲线的 Slope、Y-Inter、R² 等；

4) 在 Analysis 的 View Well Table 面板中，Quantity 一栏可读取检测结果的浓度值，单位为 fg/ μ L。根据待测样本和样本 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。

【注意事项】

1、试剂盒应在-20°C 以下保存运输。

2、实验前请仔细阅读本试剂盒说明书，严格按照操作步骤执行，在操作过程中对时间、试剂体积等精确控制可以获得最好的结果。

3、核酸提取有关耗材确保洁净、无 DNase/RNase，提取过程尽量低温、快速，完成后进入下一步实验或冷冻保存。

4、不要使用过期组分或者不同批次组分混合使用。

5、冻存试剂使用前应于室温下完全融化，瞬时离心使液体完全沉于管底。避免反复冻融，以免影响试剂性能。

6、对于顶部采光仪器要带新的一次性 PE 手套对反应管封盖，对于底部采光仪器要避免徒手或使用过的手套接触反应管底，检测过程中使用不带荧光物质一次性无粉乳胶手套。

7、实验室应严格按照有关规定分区管理，依照配液区→模板提取区→扩增区→分析区顺序进行基因检测。各区间人员、器材、试剂及空气流向应有严格要求。

8、样品、校准品等在使用后及时封盖，避免组分间及气溶胶等的污染造成假阳性。

9、扩增产物禁止开盖，实验产生的废弃物应及时收集，远离 PCR 实验室进行无害化处理。

10、如果样本为强阳性时，由于体系的竞争抑制，可能会对内标检测造成影响。

11、建议使用各仪器新版本的软件进行实验及数据分析。

【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。

【公司信息】

邮箱：marketing@biori.com.cn

网址：www.biori.com

