

栎海生物

CHO 残留 DNA 检测试剂盒

(PCR-荧光探针法) 说明书

货号: CH0100PL4Y

版本: A/5

仅供研究用

北京栎海生物技术有限公司

■ 试剂盒简介

CHO 残留 DNA 检测试剂盒是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。

本试剂盒利用荧光探针原理，定量检测样本中 CHO 残留DNA。检测快速，专一性强，性能可靠，最低检测限可以达到 fg 级别。试剂盒配套有 CHO DNA 定量参考品，已溯源至国家标准品。

本试剂盒与 栎海生物®宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒配套使用，可准确定量样本中残留的微量CHO 细胞 DNA。

■ 试剂盒组份

表 1. 试剂盒组份

组份	装量	数量	储存条件
CHO DNA 定量参考品 CHO ResDNA Positive Control, Lyophilized	15ng/瓶	1瓶	2-8℃及以下
CHO qPCR 冻干试剂 (含ROX校正染料) CHO ResDNA Quant Master Mix, Lyophilized	33test/管	3管	2-8℃及以下, 避光
复溶液 qPCR qualified Buffer	1.5ml/瓶	3瓶	2-8℃及以下

■ **规格:** 100 Reactions。

■ **有效期:** 规定储存条件下 12 个月。

■ 已测试机型：

- PRISM® 7500 Real-Time PCR System (ABI)
- CFX96 (Bio-Rad)
- LineGene 9600 (博日)
- Roche 480 Lightcycler

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 1.5ml 无菌低吸附离心管
- 1000 μ l, 100 μ l, 10 μ l 无菌低吸附带滤芯枪头

■ 相关设备

- 荧光定量 PCR 仪
- 1000 μ l, 100 μ l, 10 μ l 移液枪

■ 操作过程

❖ CHO DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

将试剂盒中提供的CHO DNA冻干定量参考品15ng, 使用 0.5ml 复溶液溶解(浓度：30ng/ml)。之后按照如下步骤依次稀释至浓度为 30ng/ml、3ng/ml、0.3ng/ml、0.03ng/ml、0.003ng/ml(3fg/ μ l)具体操作如下：


1. 向试剂盒中提供的CHO DNA 冻干品中加入 0.5mL DNA复溶液，盖好胶塞，轻微振荡混匀，此样品为ST1。
2. 取 5 支干净的 1.5ml 离心管，分别标记为 ST0，ST2，ST3，ST4，ST5。
3. 每管分别加入 90 μ l DNA 复溶液。
4. 取 10 μ l 的 CHO DNA 定量参考品 ST1，加入 ST2 管，瞬时

振荡混匀后短时间快速离心 5s，重复 3 次以确保定量参考品与 DNA 复溶液充分混匀。

按表 2 依次进行稀释操作，稀释步骤同 4。

表 2. CHO DNA 定量参考品的稀释


稀释管	稀释体积	浓度 (ng/ml)
ST1	1瓶DNA 定量参考品+500 μ l DNA复溶液	30
ST2	10 μ l ST1+90 μ l DNA复溶液	3
ST3	10 μ l ST2+90 μ l DNA复溶液	0.3
ST4	10 μ l ST3+90 μ l DNA复溶液	0.03
ST5	10 μ l ST4+90 μ l DNA复溶液	0.003
ST0	90 μ l DNA 复溶液	0

 已融化未使用的 DNA 复溶液可保存于 2-8℃ 及以下。

❖ 加样回收质控 ERC 的制备

根据需要设置 ERC 中的 CHO DNA 加样浓度（以制备加 0.03ng/ml CHO DNA 量的样本 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. 再加入 11 μ l ST3，混匀，标记为样本 ERC。

 样本 ERC 和同批待测样本一起进行样本前处理，制备成样本 ERC 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 样本基质溶液(或复溶液)加入 1.5ml 干净的离心管中标记为阴性质控 NCS。

 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。


❖ qPCR 反应液的制备和加样

1. 根据所要检测的标准曲线及待测样本数量，计算所需反应孔数，一般做 3 个重复孔/样。

反应孔数= (5 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 \times 2) \times 3

 待测样本 \times 2 是因为我们推荐每个待测样本检测时都应同时做样本ERC。

2. 从试剂盒内取出CHO qPCR 冻干试剂一管，向其中加入 680 μ l qPCR 复溶液，使用移液器轻轻吹打数次，直至冻干物完全溶解。
3. 根据反应孔数计算本次所需的CHO qPCR MIX 总量：

 CHO qPCR MIX = (反应孔数+1) \times 20 μ l (含有 1 孔的损失量)

4. 各试剂置于冰上融化，轻微振荡混匀，按表 3 所示加


样：表 3. 各反应孔加样示例


标准曲线	20 μ l CHO qPCR MIX + 5 μ l ST1/ST2/ST3/ST4/ ST5
NTC	20 μ l CHO qPCR MIX + 5 μ l DNA 复溶液
NCS	20 μ l CHO qPCR MIX + 5 μ l NCS 纯化液
待测样本	20 μ l CHO qPCR MIX + 5 μ l 待测样本纯化液
样本 ERC	20 μ l CHO qPCR MIX + 5 μ l 样本 ERC 纯化液

 加样完成后每孔总体积为 25 μ l，本冻干试剂含有ROX染料。

表 4. 96 孔板排版示例

NTC		S1	S1	S1	S1 ERC	S1 ERC	S1 ERC						A
NTC		S2	S2	S2	S2 ERC	S2 ERC	S2 ERC		ST5	ST5	ST5		B
NTC		S3	S3	S3	S3 ERC	S3 ERC	S3 ERC		ST4	ST4	ST4		C
		S4	S4	S4	S4 ERC	S4 ERC	S4 ERC		ST3	ST3	ST3		D
NCS		S5	S5	S5	S5 ERC	S5 ERC	S5 ERC		ST2	ST2	ST2		E
NCS									ST1	ST1	ST1		F
NCS													G
													H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		

 该示例表示的是检测5个浓度梯度的CHO DNA 标准曲线 (ST1~ST5)、1个无模板对照 NTC、1个阴性质控 NCS、5个待测样本 (S1~S5) 和每个样本的 ERC (S1 ERC~S5 ERC)。每个检测做3个重复孔。

 实际检测时可根据样本多少，参照此示例进行96孔板排版加样。

5. 将96孔板用光学膜封闭，轻微震荡混匀，短时间快速离心10s后放入qPCR仪。

❖ qPCR 程序参数设置

 以AB公司7500 qPCR仪、软件版本2.3为例。

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，猝灭荧光基团为none，检测参比荧光为ROX。
3. 设置两步法反应程序：95℃预变性10min；95℃ 30s，60℃

1 min, 40 个循环; 反应体积 25 μ l。

❖ qPCR 结果分析




以 AB 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 2.3 为例。


1. 在 Results 的 Amplification Plot 面板中, 将 Threshold 设置为 0.02, 点击 Analyze, 此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常。

2. 在 Results 的 Plate 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 30ng/ml、3ng/ml、0.3ng/ml、0.03ng/ml、0.003ng/ml, 并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。

3. 在 Results 的 Plate 面板中, 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, 之后点击 。


4. 在 Results 的 Standard Curve 面板中, 可读取标准曲线的斜率 (Slope)、截距 (Intercept)、 R^2 。


 在 Results 的 Report 面板中, Mean Quantity 一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样本、样本 ERC 的检测值, 单位为 ng/ml。后续可在检测报告中将单位换算为 pg/ μ l 或 pg/ml。



结果分析的参数设置需依据具体的机型及使用的软件版本, 一般也可由仪器自动判读。

 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。

 阴性质控 NCS 的 Ct 值应大于标曲最低浓度 Ct 均值。

 无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值 ≥ 35 。

❖ qPCR 标曲结果如图对照：

