



CHO残留DNA检测试剂盒(PCR-荧光探针法)

目录号：CW3027S (100 rxns)

保存条件：-20℃，避光保存，如需频繁使用，可存放于2-8℃，尽量避免反复冻融。

产品内容

Component	CW3027S 100 rxns
CHO DNA 定量参考品 (30 ng/μl)	30 μl
CHO DNA扩增试剂	4× 800 μl
DNA聚合酶	2× 50 μl
DNA稀释液	4×1 ml

产品简介

CHO 残留DNA检测试剂盒是用于定量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的专用试剂盒。

本试剂盒基于实时荧光定量PCR平台，采用Taqman探针法，定量检测样本中CHO残留DNA。检测方便、快速、准确，与其他生物基因组均无交叉反应。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。扩增试剂中配有内标指示体系，可确保实验结果的真实性。本试剂盒与康为世纪的细胞残留DNA提取试剂盒配套使用，可准确定量样本中CHO残留DNA。

有效期

规定储存条件下12个月。

适用机型

ABI 7500 Real-Time PCR System

Roche LightCycler 480

Mx3000PTM (Stratagene)

CFX96(Bio-Rad)

LineGene 9600

操作步骤

1. 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30 ng/μl的CHO 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，3 fg/μl。具体操作如下：

1.1 将试剂盒中的CHO 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，CHO DNA定量参考品需10000 rpm高速离心1 min。

1.2 按下表稀释CHO DNA定量参考品。稀释后的参考品均需混匀后再进行下一步稀释。

注意：如果是震荡混匀后需进行10000 rpm高速离心1 min。

表2 CHO DNA定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度
ST0	10 μl CHO DNA 定量参考品+90 μl DNA 稀释液	3 ng/μl
ST1	10 μl ST0+90μl DNA 稀释液	300 pg/μl
ST2	10 μl ST1+90μl DNA 稀释液	30 pg/μl
ST3	10 μl ST2+90μl DNA 稀释液	3 pg/μl
ST4	10 μl ST3+90μl DNA 稀释液	300 fg/μl
ST5	10 μl ST4+90μl DNA 稀释液	30 fg/μl
ST6	10 μl ST5+90μl DNA 稀释液	3fg/μl

注：稀释后3 ng/μl浓度的DNA (ST0管)可在-18℃及以下保存2周，期间可重复冻融使用；3 ng/μl以下浓度的DNA (ST1~ST6 管)可在2~8℃保存1天，-18℃及以下保存1周，尽量避免反复冻融。已融化未使用的DNA稀释液可保存于2-8℃。

2. 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30 pg CHO DNA量的样本 ERC为例），具体操作如下：

2.1 取100 μl待测样本加入1.5 ml干净的离心管中。

2.2 再加入10μl 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DNA提取，制备成样本 ERC 纯化液。

3. 阴性质控NCS的制备

根据实验设置阴性质控，具体操作如下：

3.1 取100 μl样本基质溶液(或DNA稀释液)加入 1.5ml 干净的离心管中；

3.2 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DNA提取，制备成阴性质控NCS纯化液。

4. qPCR反应液的制备和加样

4.1 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=（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×2）×3

待测样本×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。

4.2 根据反应孔数计算本次所需的 CHO DNA扩增试剂总量：

CHO DNA扩增试剂=（反应孔数+2）× 30 μl（含有 2 孔的损失量）

4.3 各试剂置于冰上融化，轻微振荡混匀，按表3所示加样：加样完成后每孔总体积为 40 μl。

表3 各反应孔加样示例

标准曲线	30 μl CHO DNA扩增试剂+1 μl DNA聚合酶+9 μl ST1/ST2/ST3/ST4/ST5/ST6
无模板对照NTC	30 μl CHO DNA扩增试剂+1 μl DNA聚合酶+9 μl DNA 稀释液
阴性质控NCS	30 μl CHO DNA扩增试剂+1 μl DNA聚合酶+ 9 μl 阴性质控 NCS 纯化液
待测样本	30 μl CHO DNA扩增试剂+1 μl DNA聚合酶+ 9 μl 待测样本纯化液
样本 ERC	30 μl CHO DNA扩增试剂+1 μl DNA聚合酶+ 9 μl 样本ERC纯化液

表4 96孔板排版示例

S1	S1	S1		S1 ERC	S1 ERC	S1 ERC			ST1	ST1	ST1	A
S2	S2	S2		S2 ERC	S2 ERC	S2 ERC			ST2	ST2	ST2	B
S3	S3	S3		S3 ERC	S3 ERC	S3 ERC			ST3	ST3	ST3	C
S4	S4	S4		S4 ERC	S4 ERC	S4 ERC			ST4	ST4	ST4	D
S5	S5	S5		S5 ERC	S5 ERC	S5 ERC			ST5	ST5	ST5	E
									ST6	ST6	ST6	F
												G
NCS	NCS	NCS		NTC	NTC	NTC						H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

注：该示例表示的是检测6个浓度梯度的CHO DNA标准曲线（ST1~ST6）、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。

4.4 将 96孔板封闭后，短时间快速离心,放入荧光PCR仪。

5. qPCR 程序参数设置

5.1打开参数设置窗口，创建检测探针，选择报告荧光基团为FAM，猝灭荧光基团为none；创建内标探针，选择报告荧光基团为VIC，猝灭荧光基团为none。每孔反应孔同时选择检测探针和内标探针。

5.2设置两步法反应程序：

阶段	温度	时间	是否检测荧光（FAM和VIC）	浓度
预变性阶段	95℃	10 min	否	1
扩增及荧光收集阶段	95℃	15 sec	否	40
	60℃	1 min	是	
降温阶段	25℃	1 min	否	1

6. qPCR 结果分析

6.1 结果判定：本产品的CHO DNA检测结果参考FAM荧光曲线，VIC荧光曲线为内标曲线。基线设定原则为start值为3到5，end值为15到20，阈值设置原则为在荧光曲线的拐点处略高于阴性对照。

6.2 一般情况下，样本检测孔的VIC荧光曲线Ct值 ≤ 32 ，但如果FAM荧光曲线过强，VIC荧光曲线Ct值可以大于32或无Ct值。

6.3 对程序进行标准曲线设置，设置好标准曲线后样本检测孔会显示所测样本的浓度值。

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。

无模板对照NTC、阴性质控NCS的检测结果应为Undetermined或者Ct值 ≥ 35 ，VIC荧光曲线Ct值应 ≤ 32 。

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其它用途