



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。

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 $\times 2$) $\times 3$

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。

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) $\times 30 \mu\text{L}$ (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	13	

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)	循环数
预变性阶段	95°C	10 min	否	1
扩增及荧光收集阶段	95°C	15 sec	否	40
	60°C	1 min	是	
降温阶段	25°C	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 ≤ 32 。