

HEK293 Host Cell Residue DNA Size Analysis Kit

HEK293 宿主细胞残留 DNA 片段分析试剂盒

产品简介

HEK293 宿主细胞残留 DNA 片段分析试剂盒是用于定量分析检测各种生物制品的中间品、半成品和成品中不同长度的 HEK293 残留 DNA 含量的试剂盒。

本试剂盒采用 qPCR 荧光探针原理，专一快速检测 200 bp 以下及以上的 HEK293 DNA 残留，其定量限可以达到 10 fg/μL 水平，且配套有 HEK293 DNA Control（DNA 定量参考品）。该试剂盒可与本公司的磁珠法残留 DNA 样本前处理试剂盒（Cat#18461ES/18462ES）配套使用。

产品信息

货号	41316ES70 / 41316ES74
规格	4×50 T / 4×100 T

组分信息

组分编号	组分名称	41316ES70	41316ES74
41316-A	HEK293 qPCR Mix	0.75 mL×4 管	1.5 mL×4 管
41316-B1	HEK293 Primer&Probe Mix-82	250 μL×1 管	500 μL×1 管
41316-B2	HEK293 Primer&Probe Mix-133	250 μL×1 管	500 μL×1 管
41316-B3	HEK293 Primer&Probe Mix-227	250 μL×1 管	500 μL×1 管
41316-B4	HEK293 Primer&Probe Mix-515	250 μL×1 管	500 μL×1 管
41316-C	DNA Dilution Buffer	1.8 mL×2 管	1.8 mL×4 管
41316-D	HEK293 DNA Control (30 ng/μL)	25 μL×1 管	50 μL×1 管

储存条件

1. 所有组分均干冰运输，-25~-15℃保存，有效期 2 年。其中 A 组分和 B1、B2、B3、B4 组分均需避光保存。
2. 收到货后，请检查共 7 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. 本产品仅作科研用途。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
3. 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、反应体系的配制及加样。
4. 每个组分在使用前都应充分震荡混匀，低速离心。

适用机型

包含但不限于以下仪器：

Thermo Scientific：ABI 7500，ABI Quant Studio 5，ABI Step OnePlus；

Bio-Rad：CFX96 Optic Module；

使用说明

1. HEK293 DNA Control 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

HEK293 片段分析试剂盒中含有四种不同长度的扩增片段，分别为：82 bp、133 bp、227 bp、515 bp。在建立标曲时，需分别对不同的扩增片段设置标曲，并根据对应扩增片段的标曲来计算其残留量和分布相对量。

用试剂盒中提供的 DNA Dilution Buffer (DNA 稀释液) 将 HEK293 DNA Control 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 HEK293 DNA Control 和 DNA Dilution Buffer 置于冰上融化，待完全融化后，轻微振荡混匀，低速离心 10 sec。
- 2) 取 6 支洁净的 1.5 mL 离心管，分别标记为 Std0、Std1、Std2、Std3、Std4、Std5。
- 3) 在标记为 Std0 的 1.5 mL 离心管中加 90 μL DNA Dilution Buffer 和 10 μL HEK293 DNA Control，即稀释为 3 ng/μL，振荡混匀后低速离心 10 sec，该浓度可分装置于 -20°C 短期保存（不超过 3 个月）^{**}，使用时避免反复冻融。
- 4) 在 Std0、Std1、Std2、Std3、Std4、Std5 离心管中先分别加入 90 μL DNA Dilution Buffer^{***}，再进行梯度稀释^{****}，具体稀释方法如下：

稀释管	稀释比例	终浓度
Std1	10 μL Std0 + 90 μL DNA Dilution Buffer	300 pg/μL
Std2	10 μL Std1 + 90 μL DNA Dilution Buffer	30 pg/μL
Std3	10 μL Std2 + 90 μL DNA Dilution Buffer	3 pg/μL
Std4	10 μL Std3 + 90 μL DNA Dilution Buffer	300 fg/μL
Std5	10 μL Std4 + 90 μL DNA Dilution Buffer	30 fg/μL

表 1 标准品梯度稀释

^{*}每个浓度做 3 个复孔，该试剂可测试 300 pg/μL-30 fg/μL 线性范围。若需要，可适当扩大或缩小线性范围。

^{**}为减少反复冻融次数和避免污染，建议初次使用时将 DNA 定量参考品分装储存于 -20°C。

^{***}已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于 2-8°C 7 天，若长时间不用，请放置于 -20°C。

^{****}为确保模板完全混匀，每个梯度稀释时需轻微震荡混匀约 1 min。

2. 待测样本 TS 的制备

根据实验设置待测样本 TS，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，标记为 TS，进行样本前处理，制备待测样本 TS 纯化液。
- 2) 为了满足同步进行四个不同扩增长度的片段分析检测需求，前处理后的待测样品量需 ≥120 μL，因此建议每个样品同时准备 2 管进行前处理，提取完成后混匀使用。

3. 阴性抽提质控 NCS 的制备

根据实验设置阴性抽提质控 NCS，具体操作如下：

- 1) 取 100 μL 样本基质溶液（或 DNA 稀释液）加入 1.5 mL 洁净的离心管中，标记为 NCS。
- 2) 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。
- 3) 为了满足同步进行四个不同扩增长度的片段分析检测需求，前处理后的 NCS 样品量需 ≥120 μL，因此建议每个样品同时准备 2 管进行前处理，提取完成后混匀使用。

4. 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 NTC 样本为 20 μL Mix 混合液（即 15 μL HEK293 qPCR Mix + 5 μL 对应 HEK293 Primer&Probe Mix）+ 10 μL DNA Dilution Buffer，建议配置 3 个重复孔的量。

5. 反应体系

82 bp 反应体系	体积(μL)
HEK293 qPCR Mix [†]	15
HEK293 Primer&Probe Mix-82	5
DNA Template ^{**}	10
总体积 ^{***}	30

表 2 82 bp 扩增片段的反应体系

133 bp 反应体系	体积(μL)
HEK293 qPCR Mix [†]	15
HEK293 Primer&Probe Mix-133	5
DNA Template ^{**}	10
总体积 ^{***}	30

表 3 133 bp 扩增片段的反应体系

227 bp 反应体系	体积(μL)
HEK293 qPCR Mix [†]	15
HEK293 Primer&Probe Mix-227	5
DNA Template ^{**}	10
总体积 ^{***}	30

表 4 227 bp 扩增片段的反应体系

515 bp 反应体系	体积(μL)
HEK293 qPCR Mix [†]	15
HEK293 Primer&Probe Mix-515	5
DNA Template ^{**}	10
总体积 ^{***}	30

表 5 515 bp 扩增片段的反应体系

[†]根据反应孔数计算本次所需的 Mix 混合液总量：Mix 混合液=（反应孔数+2） \times （15+5） μL （含有 2 孔的损失量）。通常，每个样本做 3 个重复孔。

^{**}反应孔数=（5 个浓度梯度的标准曲线+1 个无模板对照 NTC+1 个阴性抽提质控 NCS+N 个待测样 TS） \times 3。

NTC (No Template Control): DNA Dilution Buffer

NCS (Negative Control Solution): 样本基质溶液或 DNA Dilution Buffer 进行样本前处理后，所得纯化液为 NCS

TS (Test Sample): 待测样本

^{***}加样完成密封好管子后，请低速离心 10 sec 将管壁的液体离心收集至管底，再震荡混匀 5 sec 以上，完全混匀反应液，再低速离心 10 sec 将管壁的液体离心收集至管底，如有气泡，需将气泡排尽。

下表为参考板位：

	82 bp			133 bp			227 bp			515 bp		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std1	Std1	Std1	Std1	Std1	Std1	Std1	Std1	Std1	Std1	Std1	Std1
B	Std2	Std2	Std2	Std2	Std2	Std2	Std2	Std2	Std2	Std2	Std2	Std2
C	Std3	Std3	Std3	Std3	Std3	Std3	Std3	Std3	Std3	Std3	Std3	Std3
D	Std4	Std4	Std4	Std4	Std4	Std4	Std4	Std4	Std4	Std4	Std4	Std4
E	Std5	Std5	Std5	Std5	Std5	Std5	Std5	Std5	Std5	Std5	Std5	Std5
F	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS
G	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
H	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC

表 6 上机参考板位

该示例是对 HEK293 残留 DNA 各扩增片段分析的 qPCR 法检测操作的展示，检测样本均包括：5 个浓度梯度的 HEK293 DNA 标准曲线、1 个待测样本 TS、1 个阴性质控 NCS、1 个无模板对照 NTC。建议每个样本做 3 个重复孔。

6. 扩增程序参数设置（两步法）（以 ABI 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 2.0 为例）

- 1) 创建空白新程序，选择绝对定量检测模板。
- 2) 针对四种不同长度扩增片段创建新检测探针，分别命名为“HEK293-82”、“HEK293-133”、“HEK293-227”、“HEK293-515”，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”（参比荧光可根据仪器型号等情况，选择是否需要添加）。
- 3) 在“Assign target (s) to the selected wells”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”（含义为每孔的 DNA 浓度，单位为 fg/μL），并且在相应的“Sample Name”一栏中命名为“300 pg/μL”、“30 pg/μL”、“3 pg/μL”、“300 fg/μL”、“30 fg/μL”；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 TS 孔的“Task”一栏设置为“Unknown”，并且在相应的“Sample Name”一栏中分别命名为“NCS”、“TS”，之后点击“Start Run”，开始仪器运行。
- 4) 扩增程序设置：设置三步法扩增程序，反应体积 30 μL。

循环步骤	温度 (°C)	时间	循环数
污染消化	37°C	5 min	1
预变性	95°C	5 min	1
变性	95°C	15 sec	45
退火	60°C	30 sec	
延伸（收集荧光）	72°C	30 sec	

表 7 扩增程序

7. qPCR 结果分析

- 1) 在“Analysis”的“Amplification Plot”面板中，系统会自动给出“Threshold”，有时系统给出的“Threshold”离基线太近，导致复孔之间 Ct 相差甚远，可手动调节“Threshold”至合适位置，点击“Analyze”。此时可在“Multicomponent Plot”初步查看扩增曲线的形态是否正常。
- 2) 在“Analysis”的“Standard Curve”面板中，可读取标准曲线的 R^2 、扩增效率 (Eff%)、斜率 (Slope)、截距 (Intercept) 等。正常的标曲： $R^2 > 0.99$ ，扩增效率在 $90\% \leq \text{Eff}\% \leq 110\%$ 范围内，Slope 在 -3.6~-3.1。
- 3) 在“Analysis”的“View well table”面板中，“Quantity”一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样本 TS，单位为 fg/μL，后续可在检测报告中进行单位换算。

- 4) 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。
- 5) 阴性质控 NCS 的 Ct 值应大于标曲最低浓度 Ct 的均值。
- 6) 无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值 \geq 32。