

Human Host Cell DNA Residue Detection Kit

Human 宿主细胞 DNA 残留检测试剂盒

产品简介

Human 宿主细胞 DNA 残留检测试剂盒是用于定量分析检测各种生物制品的中间品、半成品和成品中的 Human 残留 DNA 含量的试剂盒。

本试剂盒采用探针法荧光定量 PCR 原理，可专一快速的检测 Human 细胞的残留 DNA，其定量限可以达到 10 fg/ μ L 水平。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	41325ES50 / 41325ES60
规格	50 T / 100 T

组分信息

组分编号	组分名称	41325ES50	41325ES60
41325-A	Human qPCR Mix	0.75 mL	1.5 mL
41325-B	Human Primer&Probe Mix	250 μ L	500 μ L
41325-C	DNA Dilution Buffer	1.8 mL \times 2 管	1.8 mL \times 4 管
41325-D	Human DNA Control (30 ng/ μ L)	25 μ L	50 μ L

运输和储存条件

1. 所有组分均干冰运输，-25~-15 $^{\circ}$ C保存，有效期 2 年。其中，41325-A 和 41325-B 均需避光保存。
2. 收到货后，请检查共 4 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;

Bio-Rad: CFX96 Optic Module;

上海宏石医疗科技: SLAN-96S。

使用说明

1. Human DNA Control 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 Dilution Buffer (DNA 稀释液) 将 Human 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) 将试剂盒中的 Human DNA Control 定量参考品和 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 的离心管中加 90 μL DNA Dilution Buffer 和 10 μL Human DNA Control 定量参考品, Std0 浓度 3 ng/μL, 振荡混匀后低速离心 10 sec, 该浓度可分装于-25~-15°C短期保存 (不超过 3 个月)^{**}, 使用时避免反复冻融。
- 4) 在 Std1、Std2、Std3、Std4、Std5 离心管中先加入 90 μL DNA Dilution Buffer^{***}, 再进行梯度稀释^{****}, 具体稀释如下:

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-25~-15°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-25~-15°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. 样本加标回收质控 ERC 的制备

根据需要设置 ERC 中的 Human DNA 标准品浓度 (以制备加 30 pg Human DNA 量的 ERC 为例), 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, 再加入 10 μL Std3, 混匀, 标记为 ERC。
- 2) 加标回收 ERC 和同批待测样本一起进行样本前处理, 制备加标回收 ERC 纯化液。

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。

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 Human qPCR Mix + 5 μL Human Primer&Probe Mix) + 10 μL DNA Dilution Buffer, 建议配置 3 个重复孔的量。

5. 反应体系

组分	体积(μL)
Human qPCR Mix [*]	15
Human Primer&Probe Mix	5
DNA Template ^{**}	10
总体积 ^{***}	30

表 2 标准品反应体系

*根据反应孔数计算本次所需 Mix 混合液总量: Mix 混合液= (反应孔数+2) × (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+待测样 TS 个数+待测样本对应加标回收 ERC 个数) × 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

ERC (Extraction Recovery Control): 待测样本中加入如 10 μL 的 3 pg/μL 标准品 DNA 后进行样本前处理, 所得纯化液为加标回收 ERC

***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:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC		待测样本 TS1	待测样本 TS1	待测样本 TS1		标准曲线 Std1	标准曲线 Std1	标准曲线 Std1			
B	NTC		待测样本 TS2	待测样本 TS2	待测样本 TS2		标准曲线 Std2	标准曲线 Std2	标准曲线 Std2			
C	NTC		待测样本 TS3	待测样本 TS3	待测样本 TS3		标准曲线 Std3	标准曲线 Std3	标准曲线 Std3			
D							标准曲线 Std4	标准曲线 Std4	标准曲线 Std4			
E	NCS		样本加标 ERC1	样本加标 ERC1	样本加标 ERC1		标准曲线 Std5	标准曲线 Std5	标准曲线 Std5			
F	NCS		样本加标 ERC2	样本加标 ERC2	样本加标 ERC2							
G	NCS		样本加标 ERC3	样本加标 ERC3	样本加标 ERC3							
H												

表 3 上机参考板位

该示例是对 Human 残留 DNA qPCR 法检测操作的展示, 检测样本包括: 5 个浓度梯度的 Human DNA 标准曲线、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、3 个待测样本 TS、3 个加样回收 ERC。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) 创建 1 个检测探针, Target 1 命名为“Human-DNA”, 选择报告荧光基团为“FAM”, 猝灭荧光基团为“None”。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 DNA 浓度, 单位为 fg/μL), 并且在相应的“Sample Name”一栏命名为“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、样本加标回收 ERC 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”、“ERC”, 参比荧光勾选“ROX”, 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	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/延伸 (收集荧光)	60°C	30 sec	

表 4 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、样本加标回收 ERC 的检测值，单位为 $\text{fg}/\mu\text{L}$ ，后续可在检测报告中将单位换算成 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 或 pg/mL 。
- 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) 根据待测样本 TS 和样本加标回收 ERC 的检测结果计算加标回收率，加标回收率要求在 50%~150% 之间。加标回收率计算公式： $\text{回收率}(\%) = \{\text{样本加标测定值}(\text{eg. pg}/\mu\text{L}) - \text{样本测定值}(\text{eg. pg}/\mu\text{L})\} \times \text{洗脱体积}(\text{eg. } \mu\text{L}) / \text{DNA 加入量理论值}(\text{eg. pg}) \times 100\%$ 。
- 6) 阴性质控 NCS 的 Ct 值应大于标曲最低浓度 Ct 的均值。
- 7) 无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值 ≥ 32 。