

CHO Host Cell DNA Residue Detection Kit (3G)

CHO 宿主细胞 DNA 残留检测试剂盒(3G)

产品简介

CHO 宿主细胞 DNA 残留检测试剂盒(3G)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 CHO 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 CHO 细胞的残留 DNA，其定量限可以达到 0.3 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 | 41332ES50 / 41332ES60 |
| 规格 | 50 T / 100 T |

组分信息

| 组分编号 | 组分名称 | 41332ES50 | 41332ES60 |
|---------|----------------------------------|---------------------|---------------------|
| 41332-A | CHO qPCR Mix | 0.75 mL | 1.5 mL |
| 41332-B | CHO Primer&Probe Mix | 250 μ L | 500 μ L |
| 41332-C | DNA Dilution Buffer | 1.8 mL \times 2 管 | 1.8 mL \times 4 管 |
| 41332-D | CHO 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，41332-A 和 41332-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;

Roche: LightCycler480;

上海宏石医疗科技: SLAN-96S。

使用说明

1. CHO 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 CHO DNA Control 定量参考品进行梯度稀释^{*}, 稀释浓度依次为 3 ng/ μ L、300 pg/ μ L、30 pg/ μ L、3 pg/ μ L、300 fg/ μ L、30 fg/ μ L、3 fg/ μ L。

具体操作如下:

- 1) 将试剂盒中的 CHO DNA Control 定量参考品和 DNA Dilution Buffer 置于室温融化, 待完全融化后, 轻微振荡混匀, 低速离心 10 sec。
- 2) 取 7 支洁净的 1.5 mL 离心管, 分别标记为 Std0、Std1、Std2、Std3、Std4、Std5、Std6。
- 3) 在标记为 Std0 的 1.5 mL 离心管中加 90 μ L DNA Dilution Buffer 和 10 μ L CHO DNA Control 定量参考品, Std0 即稀释为 3 ng/ μ L 的浓度, 振荡混匀后低速离心 10 sec, 该浓度可分装置于 -25~-15 $^{\circ}$ C 短期保存 (不超过 6 个月)^{**}, 使用时避免反复冻融。
- 4) 在 Std1、Std2、Std3、Std4、Std5、Std6 离心管中先分别加入 90 μ L 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 μ L Std0 + 90 μ L DNA Dilution Buffer | 300 pg/ μ L |
| Std2 | 10 μ L Std1 + 90 μ L DNA Dilution Buffer | 30 pg/ μ L |
| Std3 | 10 μ L Std2 + 90 μ L DNA Dilution Buffer | 3 pg/ μ L |
| Std4 | 10 μ L Std3 + 90 μ L DNA Dilution Buffer | 300 fg/ μ L |
| Std5 | 10 μ L Std4 + 90 μ L DNA Dilution Buffer | 30 fg/ μ L |
| Std6 | 10 μ L Std5 + 90 μ L DNA Dilution Buffer | 3 fg/ μ L |

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/ μ L~3 fg/ μ L 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 $^{\circ}$ C。

^{***}已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于 2~8 $^{\circ}$ C 7 天, 若长时间不用, 请放置于 -25~-15 $^{\circ}$ 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 CHO DNA 标准品浓度 (以制备加 30 pg CHO DNA 量的 ERC 为例), 具体操作如下:

- 1) 取 100 μ L 待测样本加入 1.5 mL 洁净的离心管中, 再加入 10 μ L 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 μ L 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 μ L Mix 混合液 (即 15 μ L CHO qPCR Mix + 5 μ L CHO Primer&Probe Mix) + 10 μ L DNA Dilution Buffer, 建议配置 3 个重复孔的量。

5. 反应体系

| 组分 | 体积(μL) |
|----------------------------|--------|
| CHO qPCR Mix [*] | 15 |
| CHO 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= (6 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 | | 标准曲线 Std6 | 标准曲线 Std6 | 标准曲线 Std6 | | | |
| 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 CHO 残留 DNA qPCR 法检测操作的展示, 检测样本包括: 6 个浓度梯度的 CHO 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“CHO-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”、“3” (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”、“3 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 |
|--------------|------|--------|-----|
| 预变性 | 95°C | 5 min | 1 |
| 变性 | 95°C | 15 sec | 40 |
| 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 fg/ μL ，后续可在检测报告中将单位换算成 pg/ μL 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 ≥ 35 。
- 8) 待测样本的 Ct-IC 值应该与 NTC 的 Ct-IC 值一致或 ± 1 ，如果待测样本的 Ct-IC 值与 NTC 的 Ct-IC 值相比明显增大，则表明样本可能存在明显抑制。如果同时测试加标样本，则优先考虑样本加标回收率结果，IC 结果作为参考。