CHO DNA 残留片段分析试剂盒
（PCR-荧光探针法）说明书

产品简介

CHO DNA残留片段分析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CHO宿主细胞DNA残留片段大小分布的专用试剂盒。

本试剂盒采用qPCR荧光探针法原理，设计了三种不同的扩增片段（88 bp、209 bp、368 bp），用试剂盒配套的CHO DNA定量标准品分别对不同的扩增片段制作标准曲线，以此来定量检测分析样品中CHO细胞宿主残留DNA片段分布情况。本试剂盒检测快速，专一性强，性能可靠，最低检测限可以达到fg水平。

试剂盒组分

表 1 试剂盒组分

组分	3*30 反应装量	3*100 反应装量
CHO DNA 定量标准品	10 μL×1 管	50 μL×1 管
qPCR Reaction Buffer	1125 μL×1 管	1250 μL×3 管
CHO Primer&Probe MIX-88	30 μL×1 管	100 μL×1 管
CHO Primer&Probe MIX-209	30 μL×1 管	100 μL×1 管
CHO Primer&Probe MIX-368	30 μL×1 管	100 μL×1 管
IPC MIX	90 μL×1 管	300 μL×1 管
50×ROX Low	45 μL×1 管	150 μL×1 管
50×ROX High	45 μL×1 管	150 μL×1 管
标准品稀释液	1500 μL×1 管	1500 μL×3 管

包装与规格

货号/规格：10903011　3*100 反应/盒

货号/规格：10903012　3*30 反应/盒

储存条件及有效期

储存条件：-20℃±5℃避光保存。

有效期：12 个月。

试剂盒反复冻融5次内有效。

适配机型：（包括但不限于）

- Thermo Scientific：ABI 7500 Real-Time PCR System
- ABI Quant Studio 6
- 杭州博日科技：FQD-96A

需要额外准备的耗材与设备

实验前请准备好下列耗材与设备：

- 1.5ml 或 2mL 无菌低吸附离心管
- 与 PCR 仪适配的 96 孔 qPCR 板或八联排管
- 1000μl，200μl，10μl 无菌低吸附带滤芯枪头
- 荧光定量 PCR 仪
- 离心机
- 震荡器
- 各规格移液器（如 1000μL，200μL，10μL，2.5μL 等）

实验操作流程：

1. CHO DNA 定量标准品的稀释和标准曲线的制备

CHO 片段分析试剂盒中含有三种不同长度的扩增片段，分别为：88 bp、209 bp、368 bp。在建立标准曲线时，需分别对不同的扩增片段设置标准曲线，并根据对应扩增片段的标准曲线来计算其残留量和分布相对量。

用试剂盒中提供的标准品稀释液将 CHO DNA 定量标准品进行梯度稀释，稀释浓度依次为 3000 pg/μL、300 pg/μL、30 pg/μL、3 pg/μL、0.3 pg/μL、0.03 pg/μL。具体实验操作如下：

1）将试剂盒中的 CHO DNA 定量标准品和标准品稀释液置于冰上或 2-8℃条件下融化，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 ST0、ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。

3）在标记为 ST0 的 1.5 mL 离心管中加 9 μL CHO DNA 定量标准品和 21 μL 标准品稀释液，即稀释为 3000 pg/μL，振荡混匀后低速离心 10 sec，该浓度可分装置于-20℃±5℃短期保存（不超过 3 个月），使用时避免反复冻融。

4）在 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5 离心管中先分别入 180 μL 标准品稀释液，再进行梯度稀释，具体稀释方法如下：

表 2 标准品梯度稀释

稀释管	稀释体积	终浓度（pg/μL）
ST1	20 μL ST0 + 180 μL DNA 稀释液	300
ST2	20 μL ST1 + 180 μL DNA 稀释液	30
ST3	20 μL ST2 + 180 μL DNA 稀释液	3
ST4	20 μL ST3 + 180 μL DNA 稀释液	0.3
ST5	20 μL ST4 + 180 μL DNA 稀释液	0.03

- 每个浓度做 3 个复孔，该试剂是可以测试 300 pg/μL-30 fg/μL 线性范围的。若需要，可适当扩大或缩小线性范围，但应至少有 5 个连续的浓度梯度。
- 为减少反复冻融次数和避免污染，建议初次使用时将 CHO DNA 定量标准品分装储存于-20℃±5℃。
- 已融化未使用的标准品稀释液可保存于 2-8℃ 7 天，若长时间不用，请放置于-20℃±5℃。
- 标准品的稀释应在每次实验前重新制备，不可使用前一次或前一日制备的标准品。

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) 建议设置加标样品（ERC），与待测样品进行同步处理，作为回收率考察。

一般建议样品加标量设置为样品 CHO DNA 实际残留量的 2-10 倍。若样品 CHO DNA 实际残留量低于本试剂盒的定量限，加标量应设置在定量限范围之内，保证检测结果的准确性。

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（或标准品稀释液）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) 为了满足同步进行三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≥100 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. 反应体系混合液（qPCR MIX）的准备

1) 根据所要检测的标准曲线及待测样品数量，计算所需反应孔数，一般做 3 个重复孔/样。

   反应孔数=（5 个浓度梯度的标准曲线+ 1 个无模板对照 NTC+ 1 个阴性质控 NCS + 待测样品）× 3

2) 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR 反应体系混合液总量（含有 2 孔的损失量）：

   qPCR MIX =（反应孔数+2）× 15 μL

3) 各试剂放在冰上或 2-8℃条件下融化，轻微震荡混匀，并参考表 3、表 4、表 5 所示配置对应扩增片段的 qPCR MIX：

表 3 88 bp 扩增片段的反应体系混合液（qPCR MIX-88）配制表

88 bp 反应体系组分	体积(μL)
qPCR Reaction Buffer	12.5
ROX	0.5
CHO Primer&Probe Mix-88	1
IPC	1
总体积	15

表 4 209 bp 扩增片段的反应体系混合液（qPCR MIX-209）配制表

209 bp 反应体系组分	体积(μL)

qPCR Reaction Buffer	12.5
ROX	0.5
CHO Primer&Probe Mix-209	1
IPC	1
总体积	15

表 5 368 bp 扩增片段的反应体系混合液（qPCR MIX-368）配制表

368 bp 反应体系组分	体积(μL)
qPCR Reaction Buffer	12.5
ROX	0.5
CHO Primer&Probe Mix-368	1
IPC	1
总体积	15

为了满足同步进行三个不同扩增长度的片段分析检测需求，样品前处理中的 DNA 洗脱体积需要≥100 μL。

5. 加样

1) 各试剂置于冰上，轻微振荡混匀，选择对应扩增片段参考表 6、表 7、表 8 所示加样：

表 6 MIX-88 各反应孔加样示例

ST-88	15 μL qPCR MIX-88+10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	15 μL qPCR MIX-88+10 μL 标准品稀释液
NCS	15 μL qPCR MIX-88+10 μL 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	15 μL qPCR MIX-88+10 μL 待测样品纯化液

表 7 MIX-209 各反应孔加样示例

ST-209	15 μL qPCR MIX-209+10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	15 μL qPCR MIX-209+10 μL 标准品稀释液
NCS	15 μL qPCR MIX-209+10 μL 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	15 μL qPCR MIX-209+10 μL 待测样品纯化液

表 8 MIX-368 各反应孔加样示例

ST-368	15 μL qPCR MIX-368+10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	15 μL qPCR MIX-368+10 μL 标准品稀释液
NCS	15 μL qPCR MIX-368+10 μL 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	15 μL qPCR MIX-368+10 μL 待测样品纯化液

表 9　96 孔板排版示例

	88 bp			209 bp			368 bp		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1
B	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2
C	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3
D	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4
E	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5
F	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS
G	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
H	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC

- 该示例表示的是检测 5 个浓度梯度的 DNA 标准曲线（ST1~5）、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、1 个待测样品。每个检测做 3 个重复孔。其中 1~3 列为 qPCR MIX-88，4~6 列为 qPCR MIX-209，7~9 列为 qPCR MIX-368。
- 实际检测时可根据样品多少，参照此示例进行 96 孔板排版加样。

2) 加样完成后，将 96 孔板用光学膜封闭，轻微震荡混匀，短时间快速离心 10 sec 后放入 qPCR 仪，如有气泡，需将气泡排尽。

6. 扩增程序参数设置

ABI 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 2.3 为例

1) 创建空白新程序，选择绝对定量检测模板。

2) 针对三种不同长度的扩增片段创建新检测探针，分别命名为“CHO-88”、“CHO-209”、“CHO-368”，选择报告荧光基团为“FAM”，猝灭荧光基团为“NFQ-MGB”；再创建 1 个检测探针，命名为“IPC”，选择报告荧光基团为“VIC”，猝灭荧光基团为“NFQ-MGB”；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 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5；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”。

4) 扩增程序设置：设置两步法扩增程序，反应体积 25 μL，之后点击“Start Run”，开始仪器运行。

表 10 qPCR 扩增程序

循环步骤	温度（℃）	时间	循环数
预变性	95	3 min	1
变性	95	15 sec	45
退火/延伸（收集荧光）	60	30 sec	

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%≤Eff%≤110%范围内，Slope 在-3.8~-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 的检测值，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≥Ct_{st5}+5。

注意事项

1. 本产品仅作科研用途，不用于临床诊断。
2. 本试剂盒需在有效期内使用。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
4. 注意在不同加样步骤间及时更换吸头、避免交叉污染，避免长时开盖。
5. 注意为避免污染，应当使用带滤芯的无菌吸头。
6. 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。
7. 试剂盒内所有组分建议在低温环境融化后使用，且使用前每个组分请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。
8. 避免反复冻融本品，反复冻融可能使产品性能下降。
9. 本产品长期保存可置于-20±5℃避光保存。如果在短期内需要频繁使用，可在 2-8℃保存。

【基本信息】

生产企业名称：北京阅微基因技术股份有限公司

住所：北京市海淀区三里河路 17 号 10 层 1005 至 1010

售后服务单位名称：北京阅微基因技术股份有限公司

生产地址：北京市昌平区中关村科技园区白浮泉北街 1 号院 1 号楼-1 至 6 层 101 三层及六层 601