



CHO残留DNA检测试剂盒 (qPCR 荧光探针法)

CHO Residual DNA qPCR Detection Kit

✉ info@ezassay.com

🌐 www.ezassay.com

深圳易致生物科技有限公司

目录编码: CHO-DNA-PCR-100

目录 CONTENTS

内容	页码
产品简介	1
试剂盒组成	1
储存	1
需要但未提供的试剂	1
相关设备	2
检测步骤	2

产品简介

Product Introduction

基于实时荧光定量PCR技术，本试剂盒快速可靠地定量检测各种生物制品及药品的中间品、半成品和成品中残留的 CHO 宿主细胞 DNA。最低检测限可以达到fg级别，线性范围3 fg/ml~300 pg/ml。试剂盒含有 CHO细胞 DNA 定量参考品，已溯源至国家标准品。为了获得更好的 DNA 回收率，建议搭配使用易致生物宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒（货号：MB-WG-GN-100），可准确定量样品中残留的微量 CHO 细胞 DNA。

试剂盒组成

Materials supplied

组分	货号：CHO-DNA-PCR-100 体积(规格：100T)
CHO qPCR Mix	750 μ L *2
CHO Primer & Probe Mix	250 μ L*2
CHO DNA Standard (30ng/ μ L)	25 μ L*2
DNA Dilution Buffer	1500 μ L *4

储存

Storage

-20°C避光保存，有效期2年。

需要但未提供的试剂

Other materials required

- 1、1.5 mL 或 2.0 mL 无菌低吸附离心管
- 2、八联管或 96 孔 qPCR 板
- 3、1000 μ L，100 μ L，10 μ L 无菌低吸附带滤芯枪头
- 4、PCR 水

相关设备

Related Equipment

- 1、荧光定量 PCR 仪
- 2、超净台或生物安全柜
- 3、迷你离心机
- 4、微孔板离心机
- 5、漩涡振荡器
- 6、移液枪

适用机型（包括但不限于）

Bio-Rad: CFX96 Optic Module;

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

杭州博日科技: LineGene 9600 定量 PCR 系统

检测步骤

Assay procedure

一、CHO DNA 定量参考品（CHO DNA Standard）的稀释和标准曲线的制备

用试剂盒中提供的DNA Dilution Buffer将CHO DNA 定量参考品（CHO DNA Standard）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定量参考品（CHO DNA Standard）和DNA Dilution Buffer置于冰上或2-8°C条件下融化，待完全融化后，轻弹数下混匀，短时间快速离心3~5 s，如此重复3次。
- 2、取7支干净的1.5 mL离心管，分别标记为ST0，ST1，ST2，ST3，ST4，ST5，ST6。
- 3、在ST0管中用DNA Dilution Buffer将CHO DNA定量参考品（CHO DNA Standard）稀释至3 ng/ μ L，振荡混匀后短时间快速离心3~5s，重复3次以确保定量参考品（CHO DNA Standard）与DNA Dilution Buffer充分混匀。
- 4、在ST1，ST2，ST3，ST4，ST5，ST6管中分别加入90 μ L DNA Dilution Buffer。
- 5、按下表依次进行6次稀释操作。

稀释管	稀释体积	浓度
ST1	10 μ L ST0+90 μ L DNA Dilution Buffer	300 pg/ μ L
ST2	10 μ L ST1+90 μ L DNA Dilution Buffer	30 pg/ μ L

ST3	10 μ L ST2+90 μ L DNA Dilution Buffer	3 pg/ μ L
ST4	10 μ L ST3+90 μ L DNA Dilution Buffer	300 fg/ μ L
ST5	10 μ L ST4+90 μ L DNA Dilution Buffer	30 fg/ μ L
ST6	10 μ L ST5+90 μ L DNA Dilution Buffer	3 fg/ μ L

注：

*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（CHO DNA Standard）分装储存于-20°C。

*已融化未使用的DNA Dilution Buffer可保存于 2-8°C *稀释后的ST1可于-20°C保存6个月，ST2 - ST6可于-20°C保存1周；

*为确保模板完全混匀，每个梯度稀释时需轻微震荡混匀充分。*标准曲线浓度点可根据实际验证结果选择，应至少有 5 个浓度点。若有需要，每个浓度点可做 3 个复孔，该试剂可测试 3 fg/ μ L-300 pg/ μ L 线性范围。若需要，可适当扩大或缩小线性范围。*已稀释的DNA容易降解，需现配现用。

二、提取效率控制(Extraction Recovery Control, 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 量的样品ERC 为例），具体操作如下：

- 1、取100 μ L待测样品加入1.5 mL干净离心管；
- 2、加入10 μ L ST3，混匀，标记为样品ERC。
- 3、样本ERC和同批待测样本一起进行样本前处理，制备成样本ERC纯化液。

三、空白提取对照(Negative Extraction Control, NEC)的制备

根据实验设置空白提取对照NEC，具体操作如下：

- 1.取 100 μ L 样本基质溶液（或 DNA Dilution Buffer）加入 1.5 mL 洁净的离心管中，标记为空白提取对照NEC。
- 2.空白提取对照NEC和同批待测样本一起进行样本前处理，制备成空白提取对照NEC 纯化液。

四、根据实验设置无模板对照 NTC:

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，使用PCR水或DNA Dilution Buffer作为无模板对照 NTC即可。

五、qPCR 反应液的准备

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= (6 个浓度梯度的标准曲线+ 1 个无模板对照 NTC+ 1 个空白提取对照 NEC + 待测样品×2) ×3;

(待测样品×2 是因为我们推荐每个待测样品检测时都应同时做样品 ERC) ;

2、各试剂放在冰上或 2~8 °C 条件下融化，并根据下表所示准备 qPCR 反应液

组分	单孔反应
CHO qPCR mix	15 μL
CHO Primer & probe mix	5 μL
总体积	20 μL

3、根据反应孔数计算本次所需的 qPCR 反应液总量 (含有 2 孔的损失量)

qPCR 反应液总量= (反应孔数+2) × 20 μL

4、各试剂置于冰上，轻微振荡混匀，按下表所示加样

标准曲线	20 μL CHO qPCR 反应液 + 10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5/ST6
NTC	20 μL CHO qPCR 反应液 + 10 μL DNA Dilution Buffer
NEC	20 μL CHO qPCR 反应液 + 10 μL NEC 纯化液
待测样品	20 μL CHO qPCR 反应液 + 10 μL 待测样品纯化液
样品 ERC	20 μL CHO qPCR 反应液+ 10 μL 样品 ERC 纯化液

加样完成后每孔总体积为 30 μL，完全混匀，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。

5、孔板排版示例

S=Sample; NTC=No Template Control; ERC=Extraction/Recovery Control;

NEC= Negative Extraction Control ST1~ST6= standard

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 个空白提取对照 NEC、5 个待测样品 (S1~S5) 和每个样品的 ERC (S1 ERC~S5 ERC)。每个检测做 3 个重复孔。实际检测时可根据样品多少，参照此示例进行 96 孔板排版加样。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC		S1	S1	S1	S1	S1	S1		ST6	ST6	ST6
						ERC	ERC	ERC				
B	NTC		S2	S2	S2	S2	S2	S2		ST5	ST5	ST5
						ERC	ERC	ERC				
C	NTC		S3	S3	S3	S3	S3	S3		ST4	ST4	ST4
						ERC	ERC	ERC				
D			S4	S4	S4	S4	S4	S4		ST3	ST3	ST3
						ERC	ERC	ERC				
E	NEC		S5	S5	S5	S5	S5	S5		ST2	ST2	ST2
						ERC	ERC	ERC				
F	NEC									ST1	ST1	ST1
G	NEC											
H												

6、将96孔板用光学膜封闭，轻微震荡混匀，短时间快速离心10 s后放入qPCR仪。

7、qPCR扩增程序参数设置（两步法）（具体设置方法请参考使用的qPCR仪器说明）

①创建空白新程序，选择绝对定量检测模板。

②创建新检测探针，命名为“CHO-DNA”，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（可选）。

③扩增程序设置反应体积为30 μ L，并设置循环条件如下：

步骤	温度	时间	循环数	备注
1	95°C	5 分钟	1×	/
2	95°C	15 秒	40×	/ 收集荧光
	57°C	1 分钟		

④设置完成后，保存文件，运行程序。

六、qPCR结果与分析

以 7500 Real-Time PCR System、软件版本 1.4 为例。

1. 在 Results 的 Amplification Plot 面板中，将 Threshold 设置为 0.02或0.2，点击 Analyze，或手动调节到正好位于阴性对照扩增曲线的最高点上方。此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常。若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”。

- 在 Results 的 Plate 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 3000、300、30、3、0.3、0.03（含义为每孔的 DNA 总量，单位为 pg），并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。
- 在 Results 的 Plate 面板中，将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC，将空白提取对照 NEC 孔、待测样品孔、样品 ERC 孔的 Task 一栏设置为 Unknown，并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 NTC、NEC、S、ERC，之后点击。
- 在 Results 的 Standard Curve 面板中，可读取标准曲线的斜率（Slope）、截距（Intercept）、R2。
- 在 Results 的 Report 面板中，Mean Quantity 一栏可读取无模板对照 NTC、空白提取对照 NEC、待测样品、样品 ERC 的检测值，单位为 pg/10 μ L。后续可在检测报告中将单位换算为 pg/ μ L 或 pg/mL。

注：

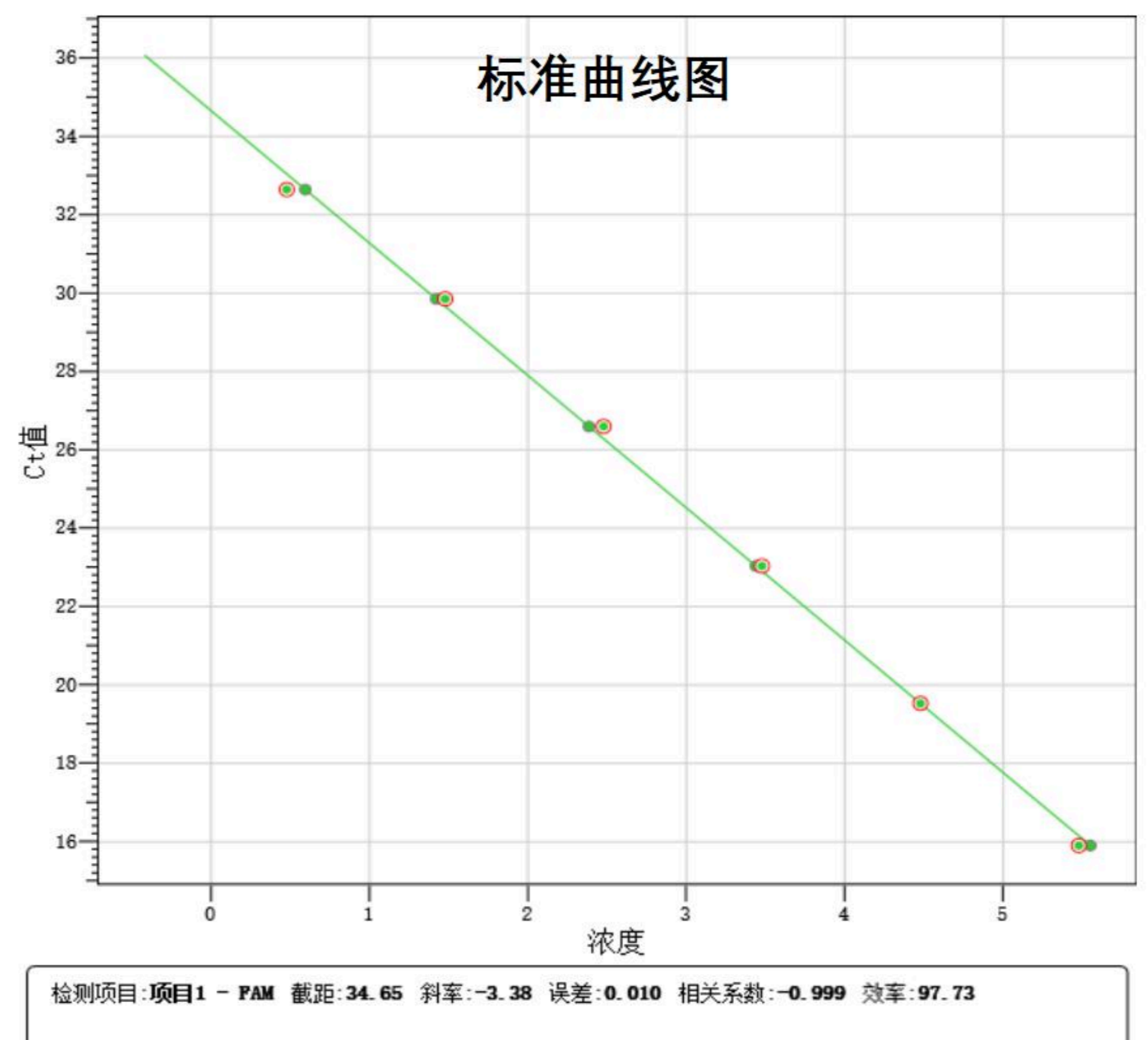
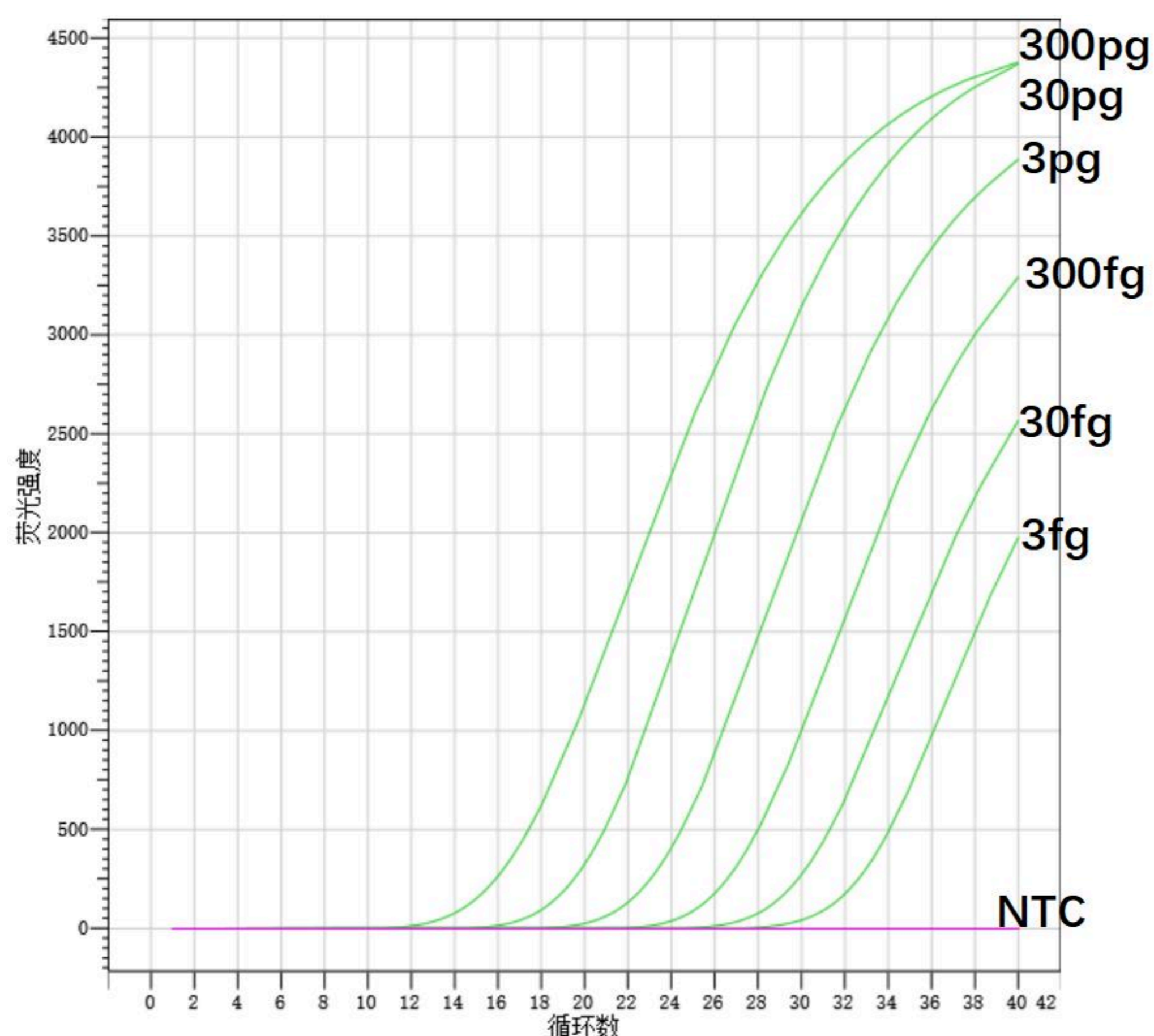
*根据待测样品和样品ERC的检测结果计算加样回收率，加样回收率要求在50%~150%之间。

*空白提取对照 NEC 的 Ct 均值应大于标曲最低浓度 Ct 均值，若经验证的定量限浓度低于标曲最低浓度，则 NEC 的检测值应小于定量限浓度。

***无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值 ≥ 35 ，或根据实验室自身验证结果设定具体标准。**

*上述示例结果分析的参数设置仅供参考，具体需依据实验室机型及使用的软件版本进行设定，一般也可由仪器自动判读。

七、qPCR结果与标准曲线图示例



核酸与蛋白产品专业提供商
Professional supplier of point-of-care test products

 深圳易致生物科技有限公司

 www.ezassay.com
 info@ezassay.com