

CHO 残留 DNA 片段分析检测试剂盒(2G)

(PCR-荧光探针法)

说明书

货号：1103170-2

版本：A/4

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 试剂盒简介

SHENTEK® CHO 残留 DNA 片段分析检测试剂盒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。

本试剂盒利用 PCR 荧光探针法原理，设计了四个不同的扩增片段（95 bp、110 bp、215 bp、523 bp）来定量检测分析样品中 CHO 残留 DNA 片段的大小分布情况。检测快速，专一性强，性能可靠，最低检测限可以达到 fg 水平。试剂盒配套有 CHO DNA 定量参考品。本试剂盒与宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒配套使用。

■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

序号	组分	产品号	装量	储存条件
I	qPCR Reaction Buffer	NNB002	850 µL ×8 管	-18 °C及以下，避光
	CHO Primer & Probe MIX-95	NNC087	300 µL ×1 管	-18 °C及以下，避光
	CHO Primer & Probe MIX-110	NNC088	300 µL ×1 管	-18 °C及以下，避光
	CHO Primer & Probe MIX-215	NNC089	300 µL ×1 管	-18 °C及以下，避光
	CHO Primer & Probe MIX-523	NNC090	300 µL ×1 管	-18 °C及以下，避光
	IPC MIX	NNC069	550 µL ×1 管	-18 °C及以下，避光
II	CHO DNA 定量参考品	NNA001	50 µL ×1 管	-18 °C及以下
	DNA 稀释液	NND001	1.5 mL ×3 管	-18 °C及以下

■ 规格

4 ×100 Reactions。

■ 有效期

规定储存条件下 24 个月，具体详见试剂盒标签。

■ 适用机型（包括但不限于以下机型，使用前需验证检测灵敏度）

- SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统
- 7500 Real-Time PCR System
- CFX96 定量 PCR 系统
- Linegene 9600 plus 定量 PCR 系统

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

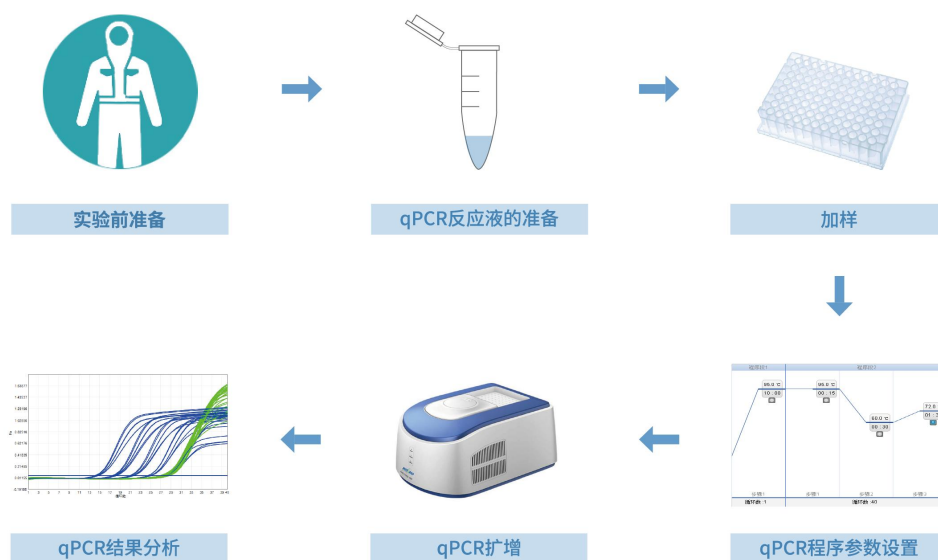
- 1.5 mL 或 2.0 mL 无菌低吸附离心管

- 八联管或 96 孔 qPCR 板
- 1000 μL , 100 μL , 10 μL 无菌低吸附带滤芯枪头

■ 相关设备

- 超净台或生物安全柜
- 迷你离心机
- 微孔板离心机
- 漩涡振荡器
- 荧光定量 PCR 仪
- 1000 μL , 100 μL , 10 μL 移液枪

■ 操作过程



一、实验前准备

1. 穿戴无 DNA 污染的工作服、一次性乳胶手套、一次性无纺布帽子。
2. 工作台面、移液枪及离心管架紫外照射 30 分钟，喷洒 75% 酒精并擦干。
3. 将试剂盒从冰箱 -18 $^{\circ}\text{C}$ 以下区域转移至 **2-8 $^{\circ}\text{C}$ 区域或冰上融化**，涡旋振荡混匀并瞬时离心。

二、qPCR 反应液的准备 (qPCR MIX)

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 个阳性质控 PCS + 待测样品 + 1 个阴性质控 NCS + 待测样品 (加标)) $\times$ 3

2. 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR MIX 总量（含有 2 孔的损失量）：

$$\text{qPCR MIX} = (\text{反应孔数} + 2) \times 20 \mu\text{L}$$

3. 参考表 2、3、4、5 所示准备对应扩增片段的 qPCR MIX：

表 2. qPCR MIX-95 配制表

组分	单孔用量
qPCR Reaction Buffer	15.9 μL
CHO Primer & Probe MIX-95	2.8 μL
IPC MIX	1.3 μL
总体积	20 μL

表 3. qPCR MIX-110 配制表

组分	单孔用量
qPCR Reaction Buffer	15.9 μL
CHO Primer & Probe MIX-110	2.8 μL
IPC MIX	1.3 μL
总体积	20 μL

表 4. qPCR MIX-215 配制表

组分	单孔用量
qPCR Reaction Buffer	15.9 μL
CHO Primer & Probe MIX-215	2.8 μL
IPC MIX	1.3 μL
总体积	20 μL

表 5. qPCR MIX-523 配制表

组分	单孔用量
qPCR Reaction Buffer	15.9 μL
CHO Primer & Probe MIX-523	2.8 μL
IPC MIX	1.3 μL
总体积	20 μL

三、配制 CHO DNA 标准曲线

用试剂盒中提供的 DNA 稀释液将 CHO DNA 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 CHO DNA 定量参考品和 DNA 稀释液置于冰上或 2-8 °C 条件下融化。待完全融化后，涡旋振荡混匀，短时间快速离心 3-5 s，如此重复 3 次。
 2. 取 6 支干净的 1.5 mL 离心管，分别标记为 ST0，ST1，ST2，ST3，ST4，ST5。
 3. 在 ST0 管中用 DNA 稀释液将 CHO DNA 定量参考品稀释至 3 ng/μL，振荡混匀后短时间快速离心 3-5 s，重复 3 次以确保定量参考品与 DNA 稀释液充分混匀。
 4. 在 ST1，ST2，ST3，ST4，ST5 管中分别加入 180 μL DNA 稀释液。
 5. 按表 6 依次进行 5 次稀释操作。

表 6. CHO DNA 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度
ST1	20 μL ST0 + 180 μL DNA 稀释液	300 pg/μL
ST2	20 μL ST1 + 180 μL DNA 稀释液	30 pg/μL
ST3	20 μL ST2 + 180 μL DNA 稀释液	3 pg/μL
ST4	20 μL ST3 + 180 μL DNA 稀释液	300 fg/μL
ST5	20 μL ST4 + 180 μL DNA 稀释液	30 fg/μL

- 🧬 片段分析试剂盒中含有四种不同长度的扩增片段，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。
- 🧬 CHO DNA 定量参考品浓度标注于管壁标签上，请确认浓度后再进行稀释。
- 🧬 已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于 2-8 °C。
- 🧬 若 DNA 稀释液中有析出，建议于 37 °C 条件下进行温育。
- 🧬 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。

四、加样

1. 各试剂轻微振荡混匀，选择对应扩增片段并参考表 7、8、9、10 进行加样。加样完成后每孔总体积为 30 μL。孔板排版方式可参考表 11。

表 7. MIX-95 各反应孔加样示例

反应孔	加样示例
ST-95	20 μL qPCR MIX-95 + 10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	20 μL qPCR MIX-95 + 10 μL DNA 稀释液
NCS	20 μL qPCR MIX-95 + 10 μL 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 μL qPCR MIX-95 + 10 μL 待测样品纯化液

表 8. MIX-110 各反应孔加样示例

反应孔	加样示例
ST-110	20 μL qPCR MIX-110 + 10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	20 μL qPCR MIX-110 + 10 μL DNA 稀释液
NCS	20 μL qPCR MIX-110 + 10 μL 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 μL qPCR MIX-110 + 10 μL 待测样品纯化液

表 9. MIX-215 各反应孔加样示例

反应孔	加样示例
ST-215	20 μL qPCR MIX-215 + 10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	20 μL qPCR MIX-215 + 10 μL DNA 稀释液
NCS	20 μL qPCR MIX-215 + 10 μL 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 μL qPCR MIX-215 + 10 μL 待测样品纯化液

表 10. MIX-523 各反应孔加样示例

反应孔	加样示例
ST-523	20 μL qPCR MIX-523 + 10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	20 μL qPCR MIX-523 + 10 μL DNA 稀释液
NCS	20 μL qPCR MIX-523 + 10 μL 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 μL qPCR MIX-523 + 10 μL 待测样品纯化液

表 11. 96 孔板排版示例

板 1:

	MIX-95						MIX-110					
A	ST1	ST1	ST1	S1	S2	NTC	ST1	ST1	ST1	S1	S2	NTC
B	ST2	ST2	ST2	S1	S2	NTC	ST2	ST2	ST2	S1	S2	NTC
C	ST3	ST3	ST3	S1	S2	NTC	ST3	ST3	ST3	S1	S2	NTC
D	ST4	ST4	ST4				ST4	ST4	ST4			
E	ST5	ST5	ST5	S1+	S2+	NCS	ST5	ST5	ST5	S1+	S2+	NCS
F				S1+	S2+	NCS				S1+	S2+	NCS
G				S1+	S2+	NCS				S1+	S2+	NCS
H	PCS	PCS	PCS				PCS	PCS	PCS			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

板 2:

	MIX-215						MIX-523					
A	ST1	ST1	ST1	S1	S2	NTC	ST1	ST1	ST1	S1	S2	NTC
B	ST2	ST2	ST2	S1	S2	NTC	ST2	ST2	ST2	S1	S2	NTC
C	ST3	ST3	ST3	S1	S2	NTC	ST3	ST3	ST3	S1	S2	NTC
D	ST4	ST4	ST4				ST4	ST4	ST4			
E	ST5	ST5	ST5	S1+	S2+	NCS	ST5	ST5	ST5	S1+	S2+	NCS
F				S1+	S2+	NCS				S1+	S2+	NCS
G				S1+	S2+	NCS				S1+	S2+	NCS
H	PCS	PCS	PCS				PCS	PCS	PCS			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

* 本示例表示的是检测 5 个浓度梯度的 DNA 标准曲线、1 个无模板对照 NTC、1 个阳性质控 PCS、1 个阴性质控 NCS、2 个待测样品、2 个待测样品（加标）。每个检测做 3 个重复孔。

* 板 1 的 1-3 列为 qPCR MIX-95 各浓度梯度的 DNA 标准曲线和 1 个阳性质控 PCS, 4-5 列为样品和加标样品, 6 列为 1 个无模板对照 NTC 和 1 个阴性质控 NCS; 7-9 列为 qPCR MIX-110 各浓度梯度的 DNA 标准曲线和 1 个阳性质控 PCS, 10-11 列为 4-5 列为样品和加标样品, 12 列为 1 个无模板对照 NTC 和 1 个阴性质控 NCS。

* 板 2 的 1-3 列为 qPCR MIX-215 各浓度梯度的 DNA 标准曲线和 1 个阳性质控 PCS, 4-5 列为 4-5 列为样品和加标样品, 6 列为 1 个无模板对照 NTC 和 1 个阴性质控 NCS; 7-9 列为 qPCR MIX-523 各浓度梯度的 DNA 标准曲线和 1 个阳性质控 PCS, 10-11 列为 4-5 列为样品和加标样品, 12 列为 1 个无模板对照 NTC 和 1 个阴性质控 NCS。

* 为满足同步进行四种扩增片段检测, DNA 模板需 $\geq 120 \mu\text{L}$, 建议每个样品同时准备 2 管进行前处理, 提取完成后混匀。

2. 八联管盖上管盖或将 96 孔板用光学膜封闭, 轻微震荡混匀, 短时间快速离心 10 秒后放入 qPCR 仪。

五、qPCR 程序参数设置

1、以 **SHENTEK-96S** 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例。

1) 点击“实验向导”。

2) “孔板编辑”页面中选择检测 CHO-95 反应孔，选择步骤 2 项目中的“**CHO SIZE-95 bp**”程序；选择检测 CHO-110 反应孔，选择步骤 2 项目中的“**CHO SIZE-110 bp**”程序；选择检测 CHO-215 反应孔，选择步骤 2 项目中的“**CHO SIZE-215 bp**”程序；选择检测 CHO-523 反应孔，选择步骤 2 项目中的“**CHO SIZE-523 bp**”程序。

3) “实验运行”页面中点击“开始”运行程序。

2、其他定量 PCR 系统程序设置如下：

选择 FAM 通道代表 CHO 检测信号，选择 VIC 通道代表 IPC 检测信号。

1) 创建空白新程序，选择绝对定量检测模板。

2) 四组 qPCR MIX 创建新检测探针，分别为命名为 **qPCR MIX-95**、**qPCR MIX-110**、**qPCR MIX-215**、**qPCR MIX-523**，选择报告荧光基团为 FAM，猝灭荧光基团为 none；创建新检测探针，命名为 IPC，选择报告荧光基团为 VIC，猝灭荧光基团为 none。检测参比荧光为 ROX（可选）。

3) 设置三步法反应程序：

95 °C 预变性 10 分钟；

95 °C 15 秒，60 °C 30 秒，72 °C 1 分 30 秒（读取荧光），40 个循环；

反应体积 30 μ L。

六、结果分析

1、以 **SHENTEK-96S** 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例。

1) “孔板编辑”页面中步骤 3：定义反应孔，将标准曲线孔的选择样品类型设置为标准品，并进行赋值。“CHO SIZE-95 bp、CHO SIZE-110 bp、CHO SIZE-215 bp、CHO SIZE-523 bp”分别设为 300、30、3、0.3，0.03，并在相应的“样本名称”中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。

2) 待测样品将样品类型设置为待测样品，NTC 将样品类型设置为无模板对照。

3) 在“实验分析”页面点击 ，可读取标准曲线的斜率、截距、相关系数、扩增效率。

4) 在“反应孔信息表中”可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品的检

测值, 单位为 pg/μL。

5) 以 qPCR MIX-95 的待测样品检测值为 100%, 计算 qPCR MIX-110、qPCR MIX-215、qPCR MIX-523 的待测样品百分比。

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

1) 在 Results 的 Amplification Plot 面板中, Analysis Settings 选择 Manual Ct, Threshold 设置为 0.02, 选择 Auto Baseline, 点击 Analyze, 此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常。

2) 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 (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 (qPCR MIX-95、qPCR MIX-110、qPCR MIX-215、qPCR MIX-523)。

3) 在 Results 的 Plate 面板中, 将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC, 将阴性质控 NCS 孔、待测样品孔的 Task 一栏设置为 Unknown, 并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 NTC、NCS、S, 之后点击 .

4) 在 Results 的 Standard Curve 面板中, 可读取标准曲线的斜率 (Slope)、截距 (Intercept)、 R^2 。

5) 在 Results 的 Report 面板中, Mean Quantity 一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品的检测值, 单位为 pg/10 μL。后续可在检测报告中将单位换算为 pg/μL 或 pg/mL。

6) 以 qPCR MIX-95 的待测样品检测值为 100%, 计算 qPCR MIX-110、qPCR MIX-215、qPCR MIX-523 的待测样品百分比。

 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、质控标准

1. 标准曲线

相关系数平方 (R^2) > 0.990, 扩增效率 (En) 为 83.3%~110.0%。

2. 质控样品

NTC、NCS、PCS 的结果分析参考表 12。

表 12.质控样品结果分析

质控样品	FAM 信号	VIC 信号
NTC	Ct 均值大于标曲最低浓度 FAM 信号 Ct 均值或扩增曲线无明显起峰	Ct<32 且为有效的“S”型扩增
NCS	Ct 均值大于标曲最低浓度 FAM 信号 Ct 均值或扩增曲线无明显起峰	Ct<32 且有效的“S”型扩增
PCS	Ct 均值处于标曲范围内且为有效的“S”型扩增	Ct<32 且有效的“S”型扩增

3. 待测样品

待测样品的结果分析参考表 13。

表 13.待测样品的检测结果分析

指标	要求
Ct-IPC 值	建议样品 Ct-IPC 值应在 NCS Ct-IPC 值±1.0 范围内。
回收率（如有）	50% ~ 150%。

-  若待测样品 Ct-IPC 值与 NCS 样品 Ct-IPC 值相比明显增大，则表明样品可能有抑制。如同时测试加标样品，则优先考虑样品回收率结果，IPC 结果作为参考。
-  质控标准应基于实验室验证数据，可从满足检测限要求考虑。
-  如遇特殊样品或其他异常现象，结果难以判定，可联系湖州申科，咨询具体解决方案。

修订日期：2023 年 05 月 11 日

生效日期：2023 年 05 月 15 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址：浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话：0572-2165910