

CHO HCD 检测试剂盒
(PCR-荧光探针法)
说明书

货号：1101100

版本：A/0

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 HCD 检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 是用于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。本试剂盒利用荧光探针原理, 定量检测样品中 CHO 残留 DNA。检测快速, 专一性强, 性能可靠, 最低检测限可以达到 fg 级别。

试剂盒配套有 CHO DNA 定量参考品, 已溯源至国家标准品。本试剂盒与 SHENTEK® 宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒配套使用, 可准确定量样品中残留的微量 CHO 细胞 DNA。

该试剂盒仅供研究使用, 不可用于诊断。

■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
CHO DNA 定量参考品	NNA001	50 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C及以下
CHO Primer&Probe MIX	NNC099	500 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C及以下, 避光
qPCR Reaction Buffer	NNB001	850 μ L \times 2 管	-18 $^{\circ}$ C及以下, 避光
DNA 稀释液	NND001	1.5 mL \times 3 管	-18 $^{\circ}$ C及以下

■ 规格

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)

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

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 1.5 mL 无菌低吸附离心管
- 96 孔 qPCR 板

➤ 1000 μL , 100 μL , 10 μL 无菌低吸附带滤芯枪头

■ 相关设备

➤ 荧光定量 PCR 仪

➤ 1000 μL , 100 μL , 10 μL 移液枪

■ 实验操作流程

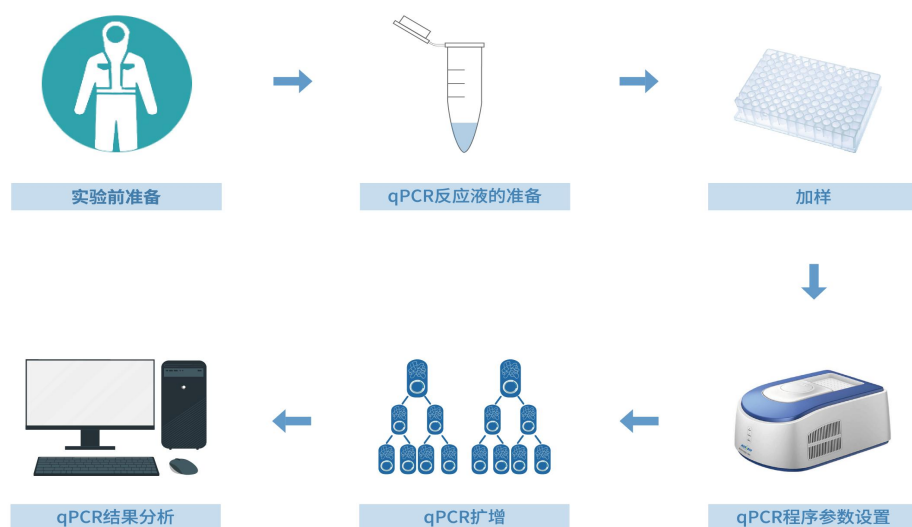


图 1 操作流程示意图

一、试剂、仪器准备

(一) 实验前准备:

1. 穿戴适当的工作及防护服, 至少穿戴无 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 反应液准备:

1. 反应孔数计算: 根据检测样品的数量, 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
阴性质控 NCS +待测样品) ×3

2. MIX 总量计算: 根据反应孔数计算所需 MIX 总量。

MIX 总量 = (反应孔数+2) × 20 μL (含有 2 孔的损失量)

3. qPCR MIX 配制: 根据表 2 配制表准备各试剂 qPCR MIX 用量。

表 2. qPCR MIX 配制表

组分	单孔用量
qPCR Reaction Buffer	15 μL
CHO Primer&Probe MIX	5 μL
总体积	20 μL

二、样品准备

● CHO DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

CHO DNA 定量参考品浓度标注于管壁标签, 请确认后再进行稀释。

用试剂盒中提供的 DNA 稀释液将 CHO DNA 定量参考品定量参考品进行稀释, 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, 轻弹数下混匀, 短时间快速离心 3-5 秒, 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 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 秒, 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, ST6 管中分别加入 90 μLDNA 稀释液。
5. 按表 3 依次进行 6 次稀释操作。

表 3. CHO DNA 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度
ST1	10 μ L ST0 + 90 μ L DNA 稀释液	300 pg/ μ L
ST2	10 μ L ST1 + 90 μ L DNA 稀释液	30 pg/ μ L
ST3	10 μ L ST2 + 90 μ L DNA 稀释液	3 pg/ μ L
ST4	10 μ L ST3 + 90 μ L DNA 稀释液	300 fg/ μ L
ST5	10 μ L ST4 + 90 μ L DNA 稀释液	30 fg/ μ L
ST6	10 μ L ST5 + 90 μ L DNA 稀释液	3 fg/ μ L

已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于 2-8 $^{\circ}$ C。

若 DNA 稀释液中有析出, 建议于 37 $^{\circ}$ C 条件下进行孵育。

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。

● 加标回收 (ERC)

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 干净的离心管中。
2. 再加入 10 μ L ST3, 混匀, 标记为样品 ERC。

备注: 样品 ERC 和同批待测样品一起进行样品前处理, 制备成样品 ERC 纯化液。

● 阴性对照 (NCS)

1. 取 100 μ L DNA 稀释液加入 1.5 mL 干净的离心管中, 标记为阴性质控 NCS。

备注: 阴性质控 NCS 和同批待测样品一起进行样品前处理, 制备成阴性质控 NCS 纯化液。

三、操作步骤

(一) 加样

1. 各试剂置于冰上, 轻微振荡混匀, 按表 4 和表 5 所示加样:

表 4.各反应孔加样示例

各样品	加样量
标准曲线	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L ST1/ST2/ST3/ST4/ ST5/ST6
NTC	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L DNA 稀释液
NCS	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L 待测样品纯化液
样品 ERC	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L 样品 ERC 纯化液

表 5. 96 孔板排版示例

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

✧ 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 个阴性质控 NCS、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。

2. 将 96 孔板用光学膜封闭, 轻微振荡混匀, 短时间快速离心 10 秒后放入 qPCR 仪。

(二) qPCR 程序设置


- 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”页面中选择步骤 1: 选择反应孔。
 3. 选择步骤 2: 选择项目中的“CHO 残留 DNA”程序。
 4. “实验运行”页面中点击“开始”运行程序。
- 其他定量 PCR 系统程序设置如下:
 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. 设置两步法反应程序:


95 °C 预变性 10 分钟;
95 °C 15 秒, 60 °C 1 分钟 (读取荧光), 40 个循环; 反应体积 30 μL。

四、结果计算与判断

(一) 结果计算


- 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, 并在标品赋值中分别根据表 3 赋值, 例如“CHO 残留 DNA”设为 300、30、3、0.3、0.03、0.003, 并且在相应的“样本名称”中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。
 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、样品 ERC、待测样品的检测值, 单位为 pg/μL。
- 以 7500 Real-Time PCR System、软件版本 2.4 为例:
 1. 在 Results 的 Amplification Plot 面板中, 将 Threshold 设置为 0.02, 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、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。

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、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、NCS、S、ERC, 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、样品 ERC 的检测值, 单位为 $\text{pg}/10 \mu\text{L}$ 。后续可在检测报告中将单位换算为 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 或 pg/mL 。

(二) 结果判断

1. 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。
2. NTC 的检测结果应未检出或 Ct 值 ≥ 35 , 或根据实验室自身验证结果设定具体标准。
3. NCS 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 NCS 的检测值应小于定量限浓度。

 上述示例结果分析的参数设置仅供参考, 具体需依据实验室的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。

生效日期: 2023 年 09 月 06 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