CHO 宿主细胞 DNA 检测试剂盒

（PCR-荧光探针法）

说明书

目 录

内 容	页 码
■ 试剂盒简介	3
■ 试剂盒成份	3
■ 有效期	4
■ 适用机型	4
■ 实验所需但试剂盒中未含材料	4
■ 相关设备	5
■ 样本前处理（手动操作）	5
■ CHO DNA 检测操作	9
■ 技术参数	12
■ 常见问题	13

CHO 宿主细胞 DNA 检测试剂盒说明书（PCR-荧光探针法）

■ 试剂盒简介

CHO 宿主细胞 DNA 检测试剂盒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 CHO 宿主细胞 DNA 的专用试剂盒。该试剂盒主要由两部分组成：试剂盒 A--样本前处理试剂，试剂盒 B--CHO DNA 检测试剂。

样本前处理试剂主要用于初始样本的前期处理，目的是稳定高效的获得 CHO DNA。针对一些样本中蛋白质浓度高、DNA 残留量低等特点，该组份可以从复杂的基质溶液中将微量的 DNA 进行有效的提取纯化，稳定的回收率保证了检测的准确和稳定。

CHO 基因检测试剂是利用 Taqman 探针原理，定量检测样本中 CHO DNA。该组份的 DNA 最低检测限可以达到 fg 级别。同时试剂盒中配套有标准化的 CHO DNA 定量参考品，可以绘制精确的标准曲线以获得准确可信的检测结果。

本试剂盒可以根据以下内容进行手工操作和 qPCR 检测，也可以使用于 MagMAX Express 等磁性分离自动化操作平台及 qPCR 检测。具体操作及程序设置根据手工操作及仪器本身参数进行编程及设定。

■ 试剂盒成份

表 1. 试剂盒组份

试剂组份	装量	储存条件
试剂盒 A（样本前处理试剂 100 tests）		

蛋白酶 K 缓冲液	10mlx1 瓶	室温
结合液	20ml×1 瓶	室温
洗涤液 A	30ml×1 瓶	室温
洗脱液	10ml×1 瓶	室温
稀释液	10ml×1 瓶	室温
磁珠	500μl×2 管	2~8℃
蛋白酶 K	500μl×2 管	-18℃及以下
糖原	500μl×2 管	-18℃及以下
酵母 tRNA	50μl×1 管	-18℃及以下
试剂盒 B（CHO DNA 检测试剂 100 tests）		
CHO DNA 定量参考品（30ng/μl）	50μl×1 管	-18℃以下
CHO MIX	1ml×2 管	-18℃以下避光保存
DNA 稀释液	1 ml×3 管	-18℃以下

■ 有效期

规定储存条件下 24 个月。

■ 适用机型

本产品适用于 ABI PRISM® 7500 Real-Time PCR System，ABI StepOne Plus Real-Time PCR System；Mx3000PTM (Stratagene)；CFX96(Bio-Rad)；LineGene 9600(博日)等多种 Real Time PCR 仪。

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 无水乙醇（分析纯）
- 100%异丙醇（分析纯）
- 5M 的 NaCl
- 1M 的 HCl 和 NaOH

- 1.5ml 无菌离心管
- PCR 8 连管或 96 孔板，相应管盖或覆膜
- 一次性手套
- 1000μl，100μl，10μl 无菌带滤芯枪头

■ 相关设备

- 荧光定量 PCR 仪
- 迷你离心机
- 恒温水浴锅
- 磁性分离架
- 漩涡震荡器
- 1000μl，100μl，10μl 移液枪
- 超净台

样本前处理（手动操作）

实验前请完整阅读操作说明及注意要点

■ 试剂准备

开启新试剂盒时需完成以下工作：

- 在新开启的**洗涤液 A** 中加入 40ml 的无水乙醇；
- 在干净的离心管中用无水乙醇和灭菌超纯水配制 70%乙醇溶液，标记为**洗涤液 B**；
- 配制后的洗涤液应密封，室温保存，防止乙醇挥发。

每次实验前需预先完成以下工作：

- 准备好 100%的异丙醇；
- 准备好 3 个水浴温度：37℃、55℃、70℃；

- 使用前若发现**结合液**出现结晶或沉淀，应 37℃水浴至完全溶解后，震荡混匀；
- 使用前若发现**蛋白酶 K 缓冲液**出现结晶或沉淀，应 37℃水浴，待完全溶解后，震荡混匀。

■ 样本要求及处理

- 如果待检测样本是生物制品纯化过程中的粗制样本，可能含有较高的 DNA 含量，为了保证检测的准确性，可以用灭菌超纯水对样本进行适当比例的稀释后再进行样本纯化处理；也可以在样本纯化处理完成之后，用 DNA 稀释液对纯化处理后的样本 DNA 进行稀释，然后再进行 DNA 残留检测。
- 若样本为干粉状态，可以用 DNA 稀释液进行溶解，再进行下一步操作；或先用适当的试剂将样本溶解，配成高浓度溶液，再用 DNA 稀释液稀释后，进行下一步操作。
- pH 值要求：一般情况下生物制品纯化中间品均为中性环境，若样本的 PH<5 或者 PH>9，会影响样本纯化处理效果，可以用 1M 的盐酸或氢氧化钠调整样本的 PH 至中性后继续操作。
- 阴性质控（NCS）：每次实验中都需要设置一个 NCS 作为空白样本，NCS 与其他待测样本一起进行处理，以检验在样本处理过程中是否存在交叉污染或环境污染。可以以试剂盒中提供的稀释液作为阴性质控，每次取 100μl。
- 阳性质控（PCS）：每次实验中可设置一个 PCS 作为阳性对照样本，PCS 与其他待测样本一起进行处理，以检验样本前处理操作正常。阳性质控可以选择在 100μl 稀释液中加入已知量的 CHO DNA，建议加入的 DNA 来自于配制好的标曲，如加入 10μl ST2。
- 加样回收质控（ERC）：用 ERC 来评估 DNA 提取的效率、回收率和准确度，并可用 ERC 来评估验证分析方法和系统性能。对具体样品的 DNA 加标量设定在其无加标测试值的 2-10 倍

为宜，建议加入的 DNA 来自于配制好的标曲，如加入 10μl ST4。

■ 操作过程

样本消化

1. 每个待检测样本取 100μl 到 1.5ml 干净的离心管中。
2. 每 100μl 样品中加入 10μl 5M NaCl。
3. 加入蛋白酶 K 消化液震荡混匀后，55℃水浴 1 小时。
   - 单个样本所需的蛋白酶 K 消化液的准备：10μl 蛋白酶 K+100μl 蛋白酶 K 缓冲液

DNA 结合

1. 将磁珠置于室温下，震荡混匀。
   - 磁珠可以根据实验量提前进行分装，避免环境温度反复导致结合能力降低。
2. 从水浴中取出样本，高速离心 40s，加入工作结合液，震荡混匀。
   - 单个样本的工作结合液的准备：200μl 结合液+ 0.2μl 酵母 tRNA + 9μl 糖原
3. 快速离心 10s 后在样本混合物中分别加入 200μl 异丙醇，10μl 磁珠。
   - 如果样本较多，每次加入磁珠过程中应再次充分震荡混匀磁珠，以保证每次加入的磁珠量的一致性。
4. 将装有全部混合物的离心管快速震荡 5min，快速离心 5~10s 后静置于磁性分离架上。
   - 快速离心的目的在于将附着在离心管盖和壁上的混合物甩至管底。
5. 待溶液澄清，磁珠完全分离后，用枪头小心移去上清。
   - 去除上清时要避免搅动磁珠，避免磁珠同上清一起被去除。

DNA 洗涤

1. 从磁性分离架上将含有磁珠的离心管取下，加入 700μl 洗涤液 A，震荡混匀；快速离心 5~10s 后，将离心管重置于磁性分离架上，待溶液澄清，磁珠完全分离后，用枪头移去上清液，完成第 1 次磁珠洗涤。
2. 从磁性分离架上取下含有磁珠的离心管，加入 700μl 洗涤液 B，震荡混匀；快速离心 5~10s 后，将离心管重置于磁性分离架上，待溶液澄清，磁珠完全分离后，用枪头移去上清液，完成第 2 次磁珠洗涤。
3. 为保证液体充分移除，可将除去上清的离心管再次快速离心 5s，置于磁性分离架上，待磁珠分离后，用 10μl 枪头小心的将残余液体吸除干净。
4. 从磁性分离架上取下离心管，打开管盖将在室温下干燥 30s~3 min，除去乙醇残留。
   - 干燥时间依具体情况而定，室温较高或空气干燥的环境下可以选择较短干燥时间；而室温较低或空气湿润环境下，干燥时间可以稍长。

DNA 洗脱

1. 沿离心管壁加入 50~100μl 洗脱液，轻微震荡 5s 使磁珠和洗脱液混匀，70℃水浴 7min，水浴过程中可再次震荡混匀 2~3 次。
   - 震荡后需将残留于管壁上的磁珠和洗脱液轻甩至管底。
   - 震荡至管盖上的磁珠和洗脱液需快速离心后重新震荡混匀。
2. 孵育完成后，将离心管高速离心 1min，然后静置于磁性分离架上后，待磁珠分离后，用枪头小心转移溶液到干净的离心管中
3. 将上一步获得的样本洗脱液快速离心 10s，然后静置于磁性分离架上，待磁珠分离后，用枪头再次转移溶液到干净离心管，所得即为样本纯化液。
   - 每次收集洗脱液时，尽量将溶液转移干净。
   - 样本纯化液可在 2~8℃短时间保存，请在完成样本纯化处理当天进行 DNA 检测，请勿反复冻融样本纯化液。

■ 操作注意要点

1. DNA 洗涤和洗脱操作时，每次震荡混匀后，都应该短时间快速离心，以保证没有磁珠附着于离心管盖上，迷你离心机的最高转速不低于 6000rpm；
2. 在磁性分离架上分离磁珠时，中途可以适当旋转离心管，使磁珠吸附更加集中。
3. 在去除乙醇干燥时，观察磁珠状态，勿让磁珠太干，以免洗脱时不完全溶解。

CHO DNA 检测操作

完成样本前处理后，进行以下步骤

■ 试剂准备

➢ CHO DNA 定量参考品的稀释及标准曲线构建

用试剂盒中提供的 DNA 稀释液将 30ng/μl 的 CHO DNA 定量参考品进行梯度稀释，稀释浓度依次为 300pg/μl、30pg/μl、3pg/μl、300fg/μl，30fg/μl、3fg/μl。

1. 取 7 支干净的 1.5ml 离心管，分别标记为 ST0，ST1，ST2，ST3，ST4，ST5，ST6；
2. 在标记好的 7 支管中分别加入 90μl DNA 稀释液；
3. 将试剂盒中的 CHO DNA 定量参考品置于冰上融化，待完全融化后，轻微震荡，短时间快速离心；
4. 取 10μl 的 CHO DNA 定量参考品，加入 ST0 管，震荡混匀；
5. 按表 2 依次进行稀释操作：

表 2. CHO DNA 定量参考品配制

稀释管	稀释体积	浓度
ST0	10μl CHO DNA 定量参考品+90μl DNA 稀释液	3ng/μl
ST1	10μl ST0+90μl DNA 稀释液	300pg/μl
ST2	10μl ST1+90μl DNA 稀释液	30pg/μl
ST3	10μl ST2+90μl DNA 稀释液	3pg/μl
ST4	10μl ST3+90μl DNA 稀释液	300fg/μl
ST5	10μL ST4+90μl DNA 稀释液	30fg/μl
ST6	10μL ST5+90μl DNA 稀释液	3fg/μl

- 已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于 2-8℃。
- 试剂盒中的参考品 DNA 每次使用前轻弹混匀，离心 3s 甩至管底。标曲配制过程中，ST0~ST6 每管震荡 3s，离心 3s 甩下去即可，整个过程重复 1~2 遍。

■ 操作过程

在完成样本纯化处理及 CHO DNA 定量参考品系列配制后，进行 CHO DNA 检测。

1. 根据所要检测的样本数量及标准曲线，计算所需检测反应孔数，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 + 1 个阳性质控 PCS +待测样本×2）×3
2. 根据反应孔数计算完成本次检测所需的 CHO MIX 总量：
   - CHO MIX =（反应孔数+2 ）× 20μl（含有 2 孔的损失量。）
3. 各试剂置于冰上融化，轻微振荡混匀，按表 3 所示加样：

表 3. 各反应孔加样示例

标准曲线	20μl CHO MIX + 10μl ST1/ST2/ST3/ST4/ST5/ST6
无模板对照 NTC	20μl CHO MIX + 10μl DNA 稀释液
阴性质控 NCS	20μl CHO MIX + 10μl 阴性质控 NCS 纯化液
阳性质控品孔	20μl CHO MIX + 10μl 阳性质控 PCS 纯化液
待测样本	20μl CHO MIX + 10μl 待测样本纯化液
样本 ERC	20μl CHO MIX + 10μl 样本 ERC 纯化液

- 96 孔板加样完成后体积为 30μl /孔。

表 4. 96 孔板排版示例

S1	S1	S1		S1 ERC	S1 ERC	S1 ERC			NTC	NTC	NTC	A
S2	S2	S2		S2 ERC	S2 ERC	S2 ERC						B
S3	S3	S3		S3 ERC	S3 ERC	S3 ERC			ST1	ST1	ST1	C
S4	S4	S4		S4 ERC	S4 ERC	S4 ERC			ST2	ST2	ST2	D
S5	S5	S5		S5 ERC	S5 ERC	S5 ERC			ST3	ST3	ST3	E
									ST4	ST4	ST4	F
									ST5	ST5	ST5	G
NCS	NCS	NCS		PCS	PCS	PCS			ST6	ST6	ST6	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、1 个阳性质控 PCS、5 个待测样本（S1～S5）和每个样本的 ERC（S1 ERC～S5 ERC）。每个检测做 3 个重复孔。
- 实际检测时可根据样本多少，参照此示例进行 96 孔板排版加样。

4. 将 96 孔板用光学膜封闭，轻微震荡混匀，短时间快速离心 10s

后放入 qPCR 仪。

■ 技术参数

➢ 程序参数设置

- 以 AB 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 1.4 为例

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。

- 设置两步法反应程序：95℃预变性 10min；95℃ 15 s，60℃ 1 min，40 个循环；反应体积 30μl。

➢ qPCR 结果分析

- 以 AB 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 1.4 为例。

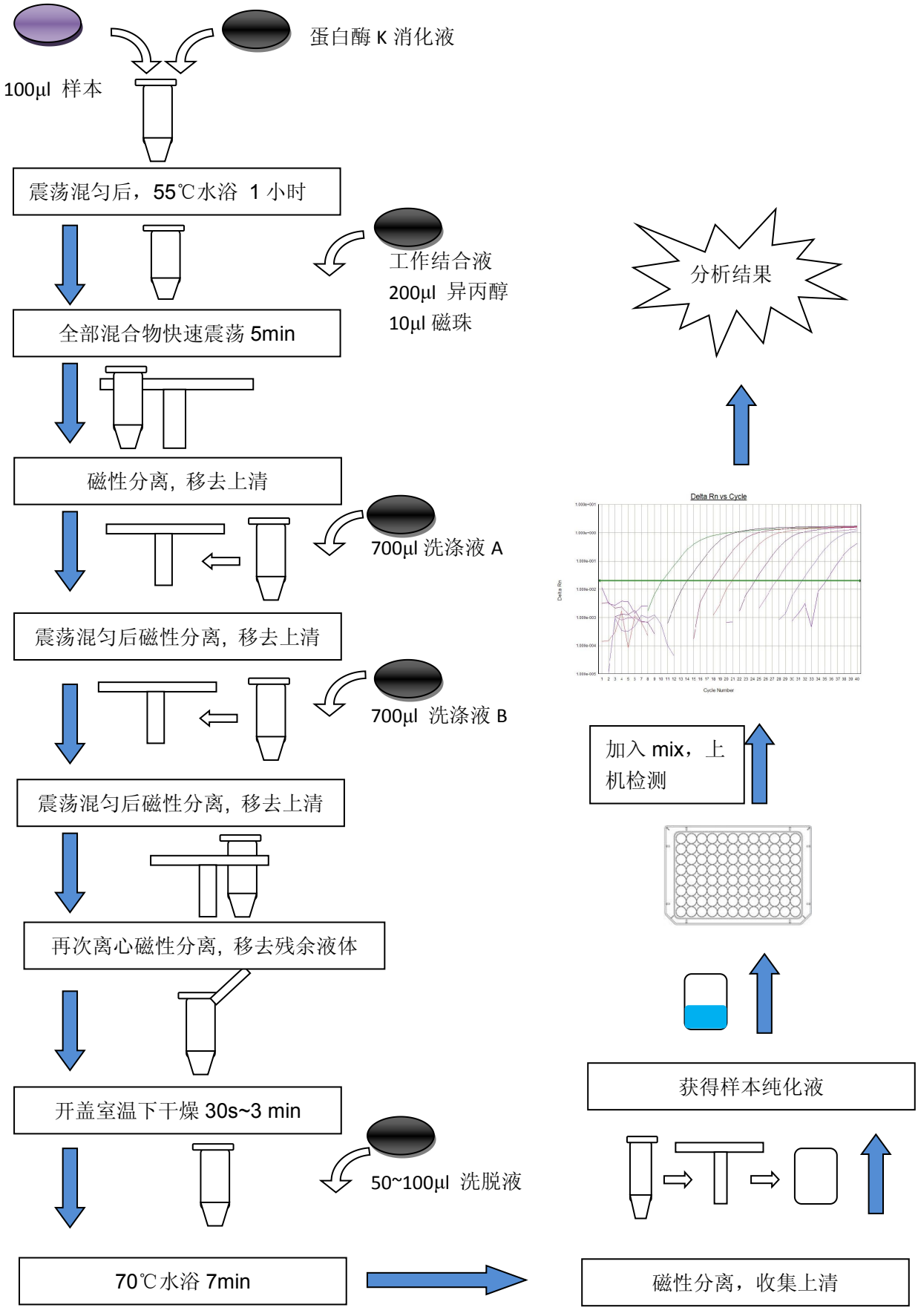
1. 在 Results 的 Amplification Plot 面板中，将 Threshold 设置为 0.02，点击 Analyze，此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常。
2. 在 Results 的 Plate 面板中，将标准曲线孔的 Task 一栏设置为 Standard，并且在 Quantity 一栏分别赋值为 3000、300、30、3、0.3、0.03（含义为每孔的 DNA 总量，单位为 pg），并且在相应的 sample name 一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。
3. 在 Results 的 Plate 面板中，将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC，将阴性质控 NCS 孔、阳性质控 PCS 孔、待测样本孔、样本 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、PCS、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、待测样本、样本 ERC 的检测值，单位为 pg/10μl。后续可在检测报告中将单位换算为 pg/μl 或 pg/ml。

- 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。
- 无模板对照 NTC、阴性质控 NCS 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值≥35。

■ 常见问题

常见问题	可能原因	解决方案
纯化回收量低	洗涤液 A 中未加入乙醇	按照说明书中加入无水乙醇
	洗涤后磁珠过干，影响 DNA 洗脱	磁珠干燥时间不要过长，室温较高或空气干燥的环境下30s~1min即可，室温较低或空气湿润环境下，干燥1~3min
	洗脱时磁珠附着于管壁，洗脱液与磁珠未能充分混匀	将已加入洗脱液的离心管置于漩涡震荡器上振荡，使磁珠从管壁上脱落且与洗脱液混匀；如操作后磁珠仍附着于管壁，可将离心管70℃水浴2min 后于漩涡震荡器上振荡，直至磁珠与洗脱液混匀
	磁珠吸附力下降	预先分装磁珠，37℃反复加热不要超过 5 次
	样品蛋白含量高	可相应增加蛋白酶 K 用量和消化时间，样本含量高于 100mg/ml 时，建议每个样本加入 20μl 蛋白酶 K

	样本盐离子浓度较低	用 NaCl 调节盐离子浓度
	样本 pH 值过低	调整样本 PH 到中性范围
	洗涤过程中磁珠有损失	洗涤过程中如发现磁珠吸附位置太过靠近管底，可轻柔吹打几次，使管底磁珠往上吸附
回收结果不稳定	磁珠保存于-18℃及以下导致磁珠性能下降	在 2~8℃保存磁珠，尽量避光
	加标不准确或洗脱液体积吸取不准确	定期校准移液枪，保证移液枪准确度
	洗脱后纯化液中残留磁珠	对仍有磁珠残留，可重复离心一次，吸取上清
无检测结果	报告荧光设置错误	设置正确的检测报告荧光
标准曲线异常	分析参数设置	说明书中参数设置为 7500 标准参数；若检测机型不同，可以由机子自动判读后，调整 threshold。
	用水稀释标准参考品，会造成低浓度不稳定	使用试剂盒提供的 DNA 稀释液

手动操作流程说明：(具体准备及操作细节请见第五页)