

ExCell Bio

ResiQuant[®] 即用型 CHO DNA 残留检测试剂盒 (荧光探针 qPCR 法) 说明书

本品仅用于科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗

货 号

CRH00-1091S

CRH00-1091

CRH00-1092



| 产品概述

本试剂盒利用Taqman探针定量PCR方法，能快速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中国仓鼠卵巢 (CHO) 宿主细胞DNA。试剂盒中引入了尿嘧啶-N-糖基化酶 (uracil-N-glycosylase, UNG) 防污染系统, 可有效去除PCR产物的残留污染, 大大降低了由于扩增产物污染而导致的假阳性。试剂组分中含有内标控制 (IC) 及参比染料ROX, 通过IC的信号表现, 监控反应过程是否正常进行, 排除样本干扰; ROX适用于ABI荧光定量PCR仪或其他同类设备, 起到光程校正作用。

本产品适用于以中国仓鼠卵巢细胞 (CHO-K1, CHO-S, CHO-DG44, CHO-GS等细胞系) 为宿主生产的生物药原液、成品、半成品、中间品或工艺过程监控样本。为获得定量样本DNA的校准曲线, 试剂盒中包含6个浓度梯度 (300 pg/μL至3 fg/μL) DNA校准品用于制备校准曲线。

CHO宿主细胞的残留DNA抽提建议使用本公司配套的通用型宿主DNA残留样本前处理试剂盒。首次使用前建议先完成产品的适用性研究: 确认样本或样本基质是否存在干扰或者抑制物, 以及选择合适的样本检测稀释条件等。

| 产品应用

本试剂盒适用于生物制药的中间产物到最终成品的不同样本类型, 检测结果精确可靠, 可定量检测CHO DNA残留, 定量检测范围为300 pg/μL至3 fg/μL。

| 产品组分及储存条件

组分	CRH00-1091 (50T)	CRH00-1092 (100T)	CRH00-1091S (50T)
CHO-Std1	150 μL	250 μL	150 μL
CHO-Std2	150 μL	250 μL	150 μL
CHO-Std3	150 μL	250 μL	150 μL
CHO-Std4	150 μL	250 μL	150 μL
CHO-Std5	150 μL	250 μL	150 μL
CHO-Std6	150 μL	250 μL	150 μL
DNA Dilution Buffer	4 mL	4 mL × 2	4 mL
2× CHO qPCR Mix	750 μL	750 μL × 2	750 μL
6× CHO Detection Mix+	250 μL	500 μL	250 μL

储存条件：-40~-18°C保存。

有效期：规定储存条件下可保存 12 个月。

运输条件：干冰运输。

适用仪器：适用但不限于 ABI 7500、伯乐 CFX96、安捷伦 Mx3000P。

| 实验准备

仪器及耗材

1. 荧光定量PCR仪（须含有FAM，HEX/VIC通道，可选ROX通道）；
2. 移液器和对应无菌低吸附带滤芯枪头；
3. 无菌低吸附1.5 mL离心管和八连管（适配荧光定量PCR仪）；
4. 洁净实验服，一次性手套、口罩等。

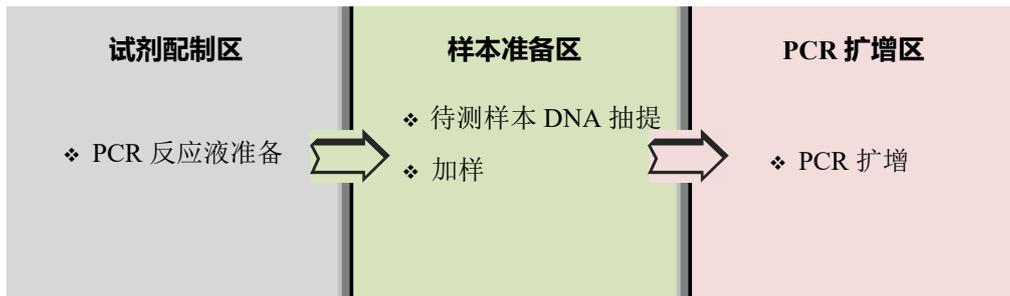
实验区域的划分

建议采用以下分区制度，避免造成交叉污染：

1. 试剂配制区：除了模板之外的所有其他试剂的独立配制区，可为独立的物理隔离区（如超净工作台）；
2. 样本准备区：准备模板的区域，包括提取和稀释样本；
3. PCR扩增区：与前两区域相对独立的进行PCR扩增的区域。

| 实验流程

英文简写	英文全称	名词解释
NTC	No Template Control	阴性对照
NEG	Negative Extraction Control	经前处理的阴性样本
TS	Test Sample	待测样本
ERC	Extraction Recovery Control	加标回收样本



PCR 反应液准备 (试剂配制区)

【注意事项】首次使用前，请将各组份恢复至室温后瞬时离心，确保试剂收集于管底。

1. 在反应前先确定要检测的样本数量和对照数量：

待检数量 = (6个浓度梯度的校准曲线 + 1个无模板对照NTC + 1个阴性质控NEG + 待测样TS个数 +

待测样本对应加标回收ERC个数) × 3；

2. 将6× CHO Detection Mix+，2× CHO qPCR Mix在恢复至室温后，涡旋混匀并快速离心；

3. 根据以下表格中的信息和所需反应数准备PCR反应混合液，每个反应孔中分装20 μL (反应之前放2 ~ 8℃)。

试剂	1 个 30 μL 反应中所需体积
2× CHO qPCR Mix	15 μL
6× CHO Detection Mix+	5 μL
Total	20 μL

【注意事项】：根据待检样本数量，适当包含10%的损耗，计算在试剂配制总量内。

样本处理 (样本准备区)

待测样本 DNA 抽提：

建议配套使用本公司的通用型宿主 DNA 残留样本前处理试剂盒，首次使用时，建议先进行产品适用性研究，确认产品适用性（如基质干扰，最小稀释浓度，分析特异性等）。

校准品制备：

将 CHO-Std1、CHO-Std2、CHO-Std3、CHO-Std4、CHO-Std5、CHO-Std6 从规定的储存条件中取出，室温解冻后，轻微涡旋混匀后快速离心，使管盖和管壁的液体聚集到离心管底部。

加样 (样本准备区)

布板示例:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	NTC	NTC		TS1	TS1	TS1		TS1 ERC	TS1 ERC	TS1 ERC	
B					TS2	TS2	TS2		TS2 ERC	TS2 ERC	TS2 ERC	
C	ST6	ST6	ST6		TS3	TS3	TS3		TS3 ERC	TS3 ERC	TS3 ERC	
D	ST5	ST5	ST5									
E	ST4	ST4	ST4									
F	ST3	ST3	ST3						NEG	NEG	NEG	
G	ST2	ST2	ST2									
H	ST1	ST1	ST1									

1. 向已加入 PCR 反应混合液的每个反应孔中分别加入 10 μ L 反应模板;
2. 妥善盖好管盖或封好 96 孔板的封口膜, 快速离心后上机检测。

PCR 扩增 (PCR 扩增区)

以下操作步骤以 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪为例:

1. 首先“log in”, 进入主界面, 点击屏幕左上角“New Experiment”新建实验;
2. 依次输入本次实验名称, 选择机型“7500 (96 wells) ”、实验类型“Quantitation-Standard Curve”、试剂“TaqMan[®] Reagents”、实验时长“Standard”;
3. 选择“Plate Setup”栏下的“Define Targets and Samples”设定界面, 选择报告基团为“FAM”, 淬灭基团为“None”, 新增报告基团为“VIC”, 淬灭基团为“None”; 输入样本名称;
4. 进入“Assign Targets and Samples”设定界面, 选择样本Targets及在96孔板上的位置; 在左下角的“Select the dye to use as the passive reference”下拉框选择“ROX”; 如果设定校准品的绝对量, 则 (1) 先点击“Assign Targets and Samples”, (2) 再点击左侧“Instruction”下面的“Define and Setup Standards”的桔红色按钮 (点击后会变为蓝色), (3) 在浓度稀释区域里填写对校准品的赋值及稀释倍数等参数, 即完成校准品的绝对量赋值;
5. 进入“Run Method”设定界面, 将反应体系设为30 μ L, 按下表设置反应程序:

步骤		温度 (°C)	时间 (S)	循环数 (次)
1	消化	37	300	1
2	预变性	95	300	1
3	变性	95	15	40
	退火/延伸 (收集荧光)	60	60	
CHO 检测通道: FAM; IC 检测通道: HEX/VIC				

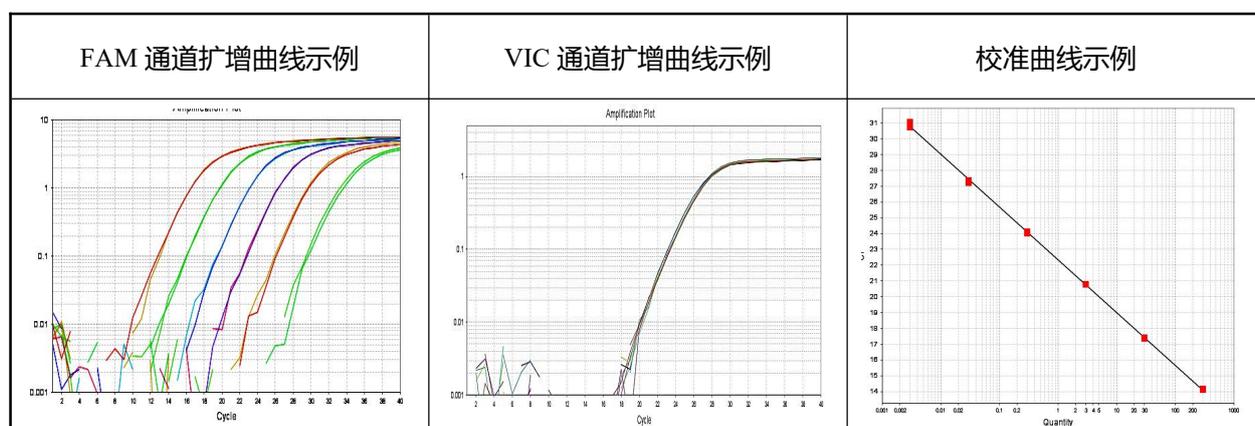
- 全部设定好后, 选择界面右上角的绿色按钮“Start Run”开始检测;
- 检测完毕后选择最左侧的选择条“Analysis”, 做数据分析;
- 在Amplification Plot界面选择FAM的Threshold为Auto, 此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常;
- 在Standard Curve界面, 可读取校准曲线的斜率, 截距和R²。

质量控制

- 校准品按十倍梯度稀释, 判定校准曲线的R²≥0.98, 斜率 (Slope) 为-3.60 ~ -3.10, 扩增效率 (Efficiency) 为90% ~ 110%;
- 校准曲线中IC的Ct值CV ≤ 5%;
- 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。NTC、NEG的检测结果应为Ct ≥ 36或No Ct。

检验结果说明

参考示例



结果判读参考

下表中HEX/VIC通道的 ΔCt 为待测样本Ct值与校准曲线Ct均值之差， $C_{\text{样本}}$ 代表检测样本的浓度：

FAM	HEX/VIC	结果判定	结果报告
$Ct_{\text{样本}} < Ct_{\text{Std1}}$	/	$C_{\text{样本}} > 300 \text{ pg}/\mu\text{L}$ ，超出定量上限，需稀释到合适浓度后重新测定	/
$Ct_{\text{Std1}} \leq Ct_{\text{样本}} \leq Ct_{\text{Std6}}$	$\Delta Ct < -1$	反应液分液不均一或存在干扰，建议重新测试	/
	$-1 \leq \Delta Ct \leq 1$	样本浓度在定量范围内，根据校准曲线计算浓度	计算浓度
	$\Delta Ct > 1$	反应液分液不均一或存在干扰，建议重新测试	/
$Ct_{\text{样本}} > Ct_{\text{Std6}}$ 或 No Ct	/	超出定量下限或未检出	$C_{\text{样本}} < 3 \text{ fg}/\mu\text{L}$

操作注意细节

1. 建议使用一次性手套、口罩，洁净的实验服；
2. 使用经校准的移液器；
3. 建议使用带滤芯的低吸附枪头；
4. 在不同的实验区域使用专用的移液枪和枪头及相关设备；
5. 反应制备需要充分涡旋混匀，并瞬时离心将所有液体收集到离心管底部；
6. 为避免交叉污染，请小心开合所有试剂管或反应管；
7. 阴性对照、检测样品、阳性对照使用专用移液器，不得混用，避免污染；
8. 建议加样顺序依次为阴性对照、校准品、待测样品、待测样品加标回收样（见布板示例）。
9. 尽量避免将PCR产物带到试剂配制区及样本准备区；
10. 实验台和仪器表面使用后建议用75%酒精清洁。

| 免责声明

1. 产品应按照说明书指导使用，实验者未按说明书指导操作，本公司不对由此导致的产品性能偏离承担责任；
2. 产品仅用于科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。