

CHO 细胞基因组 DNA 残留探针法 qPCR 试剂盒

目录号: [ml107950](#)

使 用 说 明 书

产品及特点

CHO 细胞, 即中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese Hamster Ovary), 其逆转录酶实验为阳性, 具有致瘤的风险。这表明 CHO 细胞可能携带有逆转录病毒前病毒, 其基因整合入受体基因组可能导致感染; 如果存在病毒或传代细胞基质中的致癌基因, 则可能具有引发肿瘤的潜在风险。因此, 中国药典 2020 年版三部规定, 以细胞基质生产的生物制剂 DNA 残留量不能超过 100 pg/剂, 以细菌或真菌基质生产的疫苗 DNA 残留量不能超过 10 ng/剂, 同时也规定, 重组乙型肝炎疫苗中 CHO 细胞残留 DNA 不得超过 10 pg/剂。由于宿主细胞 DNA 残留量的控制是生物制品质量控制中非常重要的环节, 因此本公司基于荧光定量 PCR 技术, 开发了专门用于检测样品中 CHO 细胞基因组 DNA 残留的本产品, **它具有下列特点:**

1. 即开即用, 用户只需要提供样品 DNA 模板。
2. 引物和探针经过优化, 分析灵敏性高, 可以达到 0.01 pg/ μ L。

3. 特异性高，引物和探针是根据 CHO 细胞 DNA 高度保守区设计，不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。
4. 既用于定性检测，又用于定量检测。定量检测时线性范围至少为 5 个数量级。
5. 本产品足够 50 次 20 μ L 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。
6. 本产品只能用于科研。

规格及成分	成分	规格	包装
	2 \times 探针法 qPCR MasterMix	625 μ L	1.5 mL 本色管
	CHO 细胞基因组 DNA 标准品 (1E4 pg/ μ L)	250 μ L	0.5 mL 绿色盖
	CHO 细胞基因组正向引物干粉	50 次	0.5 mL 白色盖
	CHO 细胞基因组反向引物干粉	50 次	0.5 mL 蓝色盖
	CHO 细胞基因组探针干粉	50 次	0.5 mL 棕色盖
	使用手册	1 份	无
	本产品采用五孔盒包装		
	<p>注意：引物和探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 138 μL 的超纯水充分混匀后得到的浓度分别为 10 μM 再使用，未用完的需要 -20$^{\circ}$C 保存。</p>		

使用方法	一、按自选方法进行核酸纯化（本试剂盒不相关试剂）
	二、制备标准曲线样本（本试剂盒不相关试剂）
	1. 标记 5 个离心管，分别为 5、4、3、2、1。
	2. 用带芯枪头分别加入 45 μ L 荧光 PCR 专用模板稀释液，用带芯枪头（下同）。
	3. 在 5 号管中加入 5 μ L 1E4 pg/ μ L 的 CHO 细胞基因组 DNA 标准品，
4. 充分震荡混匀 1 分钟，得到 1E3 pg/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。	

5. 换枪头，在 4 号管中加入 5 μL 1E3 pg/ μL 的 CHO 细胞基因组 DNA 标准品(上步稀释所得)，充分震荡混匀 1 分钟，得到 1E2 pg/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 换枪头，在 3 号管中加入 5 μL 1E2 pg/ μL 的 CHO 细胞基因组 DNA 标准品(上步所得)，充分震荡混匀 1 分钟，得到 1E1 pg/ μL 的标准曲线样品。放冰上待用。
7. 依次重复上面的操作得到 5 个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

三、Probe qPCR 反应 (25 μL 体系，在样品制备室进行)

8. 配制不含 DNA 模板的 PCR 反应混合液。如果有 N 个待测样本，做三次重复，做一个无模板阴性对照，做 5 个梯度的标准曲线样板，每个 PCR 反应体系为 25 μL ，则按下表配制 PCR mix:

成分	一个反应的加入量	(3N+6)个反应的加入量 多加 1 个防损耗
2 \times 探针法 qPCR MasterMix	12.5 μL	12.5 \times (3N+7) μL
正向引物 (10 mmol/L)	2.5 μL	2.5 \times (3N+7) μL
反向引物 (10 mmol/L)	2.5 μL	2.5 \times (3N+7) μL
探针 (10 mmol/L)	2.5 μL	2.5 \times (3N+7) μL
合计	20 μL	20 \times (3N+7) μL

9. 于 96 孔反应板每个反应管中分别加上步制备的 PCR 混合液 20 μL ，再在阴性对照管中加入水 5 μL 、在 3N 个样本管中加入 N 个 DNA 样本各 5 μL (每个三次重复)、在 5 个标准曲线管中加入 5 个稀释度的 DNA 标准品 (来于第二步) 各 5 μL 。在一个管中加水 25 μL 为背景对照。
10. 反应板覆盖光学盖膜后，离心去除气泡。
11. 将反应板放置在荧光定量 PCR 仪中运行反应，设定如下参数。阶段 1: 95 $^{\circ}\text{C}$ ，10 分钟。阶段 2: 95 $^{\circ}\text{C}$ ，15 秒，60 $^{\circ}\text{C}$ 1 分钟，重复 40 个循环。注：PCR 反应体系及反应条件可按照具体使用的仪器及试剂进行相应的调整，实验应在符合检测要求的洁净条件下进行，排除核酸和核酸酶的污

	<p>染。</p> <p>三、结果计算</p> <p>12. 取第 3 到 15 次循环的荧光强度均值加 10 倍标准差，或采用阴性对照荧光值的高点作为荧光阈值。</p> <p>13. 以至少 5 个连续标准品溶液浓度点生成标准曲线，R2 值应\geq0.98，斜率应在-3.1 至-3.8 范围内。</p> <p>14. 标准品液浓度低点的 Ct 值，不得高于 39。</p> <p>15. 阴性对照组若有 Ct 值时，不得低于标准品溶液浓度低点的 Ct 值:</p> <p>16. 每组加标样品的回收率应在 50%~150%之间，RSD\leq30%。</p> <p>17. 适当情况下，可剔除第一个或者第六个点，以连续 5 个标准品溶液浓度点生成标准曲线，系统适用性仍应满足以上条件。</p> <p>18. 以标准品溶液浓度的对数值对其相应的 Ct 值作直线回归，求得直线回归方程，供试品溶液的 Ct 值代入直线回归方程，求出供试品中 DNA 残留量。</p>
<p>自备试剂</p>	<p>荧光 PCR 专用模板稀释液</p>
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输，-20℃保存，保存期限为 2 年。</p>