Ver202509

CHO 细胞残留 DNA 检测试剂盒（qPCR- 荧光探针法）

说明书

Cat.No.HG-CH001/HG-CH001-S

江苏省苏州市吴中经济开发区越溪街道吴中大道 1463 号越旺智慧谷 A4 号楼

Building 4 ， Yuewang Wisdom Valley ， 1463 Wuzhong Avenue， Wuzhong District， Suzhou，China

目录

1. 产品简介.....3

2. 试剂盒规格.....3

3. 试剂盒组分.....3

4. 储存条件及有效期.....3

5. 适用机型.....3

6. 需要准备的试剂、耗材与设备.....4

7. 注意事项.....4

8. 操作步骤.....4

9. qPCR 结果分析.....8

10. 示例图.....8

11. 联系方式.....10

12. 买方须知.....10

1. 产品简介

CHO 细胞残留 DNA 检测试剂盒（qPCR- 荧光探针法）是用于定量检测各种生物制品中间品、半成品及成品中 CHO 细胞 DNA 的专用试剂盒。本试剂盒采用 Taqman 探针原理，定量检测样本中 CHO 细胞残留 DNA。 检测快速，专一性强，性能可靠，最低检测限可达到 fg 水平。

本试剂盒配套的 CHO 定量参考品，已溯源至国家标准品。

配套我司样品前处理试剂盒（货号 HG-CL100/HG-CL500） 进行样品的前处理。

检测范围：3~3×10^5fg/μL。

2. 试剂盒规格

产品名称	产品货号	产品规格
CHO 细胞残留 DNA 检测试剂盒（qPCR-荧光探针法）	HG-CH001	100 Reactions/盒
	HG-CH001-S	50 Reactions/盒

3. 试剂盒组分

试剂组分	HG-CH001	HG-CH001-S	贮存条件
CHO Cell DNA Quantitative Reference(30 ng/μL)	40 μL×1 管	20 μL×1 管	-20℃
DNA Diluent	6 mL×1 瓶	1.5 mL×2 管	-20℃
2×qPCR Master Mix	0.75 mL×2 管	0.75 mL×1 管	-20℃
10×CHO Primer&Probe Mix	300 μL×1 管	150 μL×1 管	-20℃
RNase-Free H_2O	1.5 mL×1 管	0.75 mL×1 管	-20℃

4. 储存条件及有效期

存储条件见上表，有效期 12 个月。**开封后未使用完的试剂盒注意仍在-20℃条件下保存。**

5. 适用机型（包括但不限于）

- ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems)
- StepOne Plus Real-Time PCR System(Applied Biosystems)
- Roche Light Cycler 480(Roche)
- AriaMX(Agilent Technologies)
- CFX96(Bio-Rad)
- Archimed X4(ROCGENE)

6. 需要准备的试剂、耗材与设备

- 1.5 mL 无菌低吸附离心管
- 荧光定量 PCR 仪器（包括 FAM 和 VIC 荧光通道）
- 八联排管加盖或 96 孔半裙边板加封口膜
- 1000 μL,200 μL,10 μL 等无菌低吸附带滤芯枪头
- 各规格移液器（如 1000 μL,200 μL,10 μL 等）
- 离心机
- 涡旋振荡仪
- 微量移液器及吸头

7. 注意事项

- 本试剂盒已通过稳定性（冻融等因素）的验证，无需分装。
- 阴性样品和阳性样品（参考品和待测样品等）的配制环境需区分区域，不可在一个区域内操作，配制人员需穿戴整齐，戴好口罩、手套和穿好洁净服。
- 注意在不同加样步骤间及时更换吸头，避免交叉污染，避免长时间开盖。
- 试剂盒必须在有效期内使用。
- 只有严格遵守说明书的操作方法，全部使用本试剂盒配套的试剂才能保证最佳检测效果。
- 最终的试验结果与试剂的有效性、操作者的操作方法及试验环境密切相关。
- 公司只对试剂盒本身负责，不对因使用该试剂盒所造成的样本消耗负责，请使用者使用前充分考虑样本的可能使用量，预留充足的样本。
- 本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断。

8. 操作步骤

8.1. 配置 CHO Cell DNA 定量参考品

8.1.1. 将试剂盒中的 CHO Cell DNA Quantitative Reference(30 ng/μL)(CHO 细胞残留 DNA 定量参考品）和 DNA Diluent(DNA 稀释液）取出，室温融化，待完全融化后，轻微振荡混匀，简短快速离心。

8.1.2. 取 7 支 1.5 mL 干净的离心管，分别标记为 STD0,STD1,STD2,STD3,STD4,STD5,STD6。

8.1.3. 7 支离心管中，分别加入 90 μL DNA Diluent。

8.1.4. 取 10 μL CHO Cell DNA Quantitative Reference 加 入 STD0 管中，涡旋振荡 5～10s 后，短时快速离心 5s。重复涡旋振荡和快速离心各 3 次。按照表 1 稀释加样量，依次梯度稀释 STD1,STD2,STD3,STD4,STD5,STD6，并进行涡旋振荡和快速离心，确保稀释均匀（表格中的体积仅供参考，可根据实际实验需求等比例扩大）。

表 1 : CHO Cell DNA Quantitative Reference 稀释

稀释管	稀释体积	浓度
STD0	10 μL CHO Cell DNA Quantitative Reference+90 μL DNA Diluent	3×10^{6} fg/μL
STD1	10 μL STD0+90 μL DNA Diluent	3×10^{5}fg/μL

稀释管	稀释体积	浓度
STD2	10 μL STD1+90 μL DNA Diluent	3×10^{4}fg/μL
STD3	10 μL STD2+90 μL DNA Diluent	3×10^{3}fg/μL
STD4	10 μL STD3+90 μL DNA Diluent	3×10^{2} fg/μL
STD5	10 μL STD4+90 μL DNA Diluent	3×10^{1}fg/μL
STD6	10 μL STD5+90 μL DNA Diluent	3×10^{0}fg/μL

8.2. 样本准备

8.2.1. 待检测样本：取 100 μL 生物制品或者其他中间过程样本作为检测样本，**使用我司宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒 (HG-CL100/HG-CL500)** 进行样本的前处理。

8.2.2. 阴性质控 (NCS): 取 100 μL1xPBS （或者其他缓冲液，与样本基质保持一致）作为阴性质控 NCS, 与样本一起参与提取和扩增。

8.2.3. **加标样本（ERC）：取 50 μL 生物制品或者其他中间过程样本，加入 50 μLSTD2（示例）作为加标样本 ERC，使用我司宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒（HG-CL100/HG-CL500）进行样本的前处理。其回收率计算公式为：（ERC*100- 样品*50）/(STD2*50)×100%（备注：也可以根据实际情况，按照其他方式制备加标回收体系。加标体系中，建议标准品的总量应为样本总量的 1~10 倍最佳）**。

8.2.4. 无模板对照 (NTC): 取 100 μL DNA Diluent 作为无模板对照 NTC。

8.3. PCR 反应液制备和加样

8.3.1. 将试剂盒各组分取出，置于室温条件下融化，待完全融化后，上下颠倒混匀 2～3 次，快速离心 5 秒。

8.3.2. 根据检测样本数量及标准曲线，计算所需反应孔数，一般建议每个样品设置 3 复孔。反应孔数=(6 个浓度梯度的定量参考品+1 个 NTC+1 个 NCS+ 待测样本数+ERC 样本数）×3。

8.3.3. 根据反应孔数计算本次实验所需组分的总量制备 pre-mix 2×qPCR Master Mix=（反应孔数+2)×15 μL （包含 2 孔的冗余量）;CHO Primer&Probe Mix= （反应孔数+2)×3 μL （包含 2 孔的冗余量）;RNase-free H_2O= （反应孔数+2)×2 μL （包含 2 孔的冗余量）。

表 2：配 置 pre-mix

组分	单个反应量（μL）
2×qPCR Master Mix	15
10×CHO Primer&Probe Mix	3
RNase-free H_2O	2
总共	20

8.3.4. 配置完成后，涡旋，彻底混匀 pre-mix，离心，收集液体至管底。

8.3.5. 在八联管或者 96 孔板中各分装 20 μL pre-mix，然后按照下表，分别加入定量参考品 、NTC、NCS、 待测样本和 ERC 待测样本各 10 μL （总体积 30 μL）。

表 3：反应孔加样示例

定量参考品	20 μLpre-mix+10 μL STD1/STD2/STD3/STD4/ STD5/STD6
NTC	20 μL pre-mix+10 μLDNA Diluent
NCS	20 μL pre-mix+10 μL NCS
待测样本	20 μL pre-mix+10 μL 待测样本
ERC 待测样本	20 μL pre-mix+10 μL ERC 样本

8.3.6. 96 孔板排版示例

表 4:96 孔板排版示例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD1	STD1	STD1							S1	S1	S1
B	STD2	STD2	STD2							S2	S2	S2
C	STD3	STD3	STD3							S3	S3	S3
D	STD4	STD4	STD4									
E	STD5	STD5	STD5									
F	STD6	STD6	STD6							S1 ERC	S1 ERC	S1 ERC
G					NTC	NTC	NTC			S2 ERC	S2 ERC	S2 ERC
H					NCS	NCS	NCS			S3 ERC	S3 ERC	S3 ERC

注：该表示例设置 6 个浓度梯度定量参考品标准曲线（STD1~STD6）、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、3 个待测样本（S1-S3）及每个样本的加标对照 ERC(ERC-S1、ERC-S2、ERC-S3）。每个反应设置 3 复孔。

加样完成密封好管子后，请先低速离心 10sec，将管壁的液体收集至管底，再振荡混匀 5sec 以上，完全混匀反应液，再低速离心 10sec，将管壁的液体离心收集至管底。如有气泡，需将气泡排尽。

8.4. 设置 qPCR 程序参数（以 BIO-RAD 公司 CFX96 qPCR 仪为例）

8.4.1. 设置反应程序

表 5：qPCR 反应程序

温度	时间	循环	信号采集	反应体积
50℃	2 分钟	1	/	30μL
95℃	10 分钟	1	/	
95℃	10 秒	40	/	
60℃	30 秒		**采集荧光信号**	

8.4.2. **选择荧光通道：创建实验反应板，点击 Select Fluorophores，选择报告荧光基团为 FAM，创建新检测探针，命名为“CHO-DNA”。**

8.4.3. 标准曲线设定：在反应板图表中，选择标曲孔，在 Sample Type 中下拉选择 Standard。勾选荧光 FAM，选择 Target Name 为 “CHO-DNA”，输入每个稀释梯度的重复次数及 Sample Name。并且分别在 STD1,STD2,STD3,STD4,STD5,STD6 的 Concentration 一栏赋值为 3E+05、3E+04、3E+03、3E+02、3E+01、3E+00（单位为 fg/uL）。

8.4.4. 样本设定：在反应板图表中，选择样本孔，分别在 Sample Type 中下拉，选择对应的 “Unknown”“NTC” 等样本类型。勾选荧光 FAM，选择 Target Name 为 “CHO-DNA”，输入每个样本的 Sample Name。

8.4.5. 点击 Run 界面 “Start Run” 按钮进行 PCR 测定。

9. qPCR 结果分析（以 BIO-RAD 公司 CFX96 qPCR 仪为例）

9.1. 点击 “Data Analysis” 窗口，打开 “Quantitation” 选项卡，可读取标准曲线的斜率 (Slope)、截距 (Intercept)、扩增效率 (Efficiency)、R^2 值等信息，SQ Mean 一栏可读取 NTC、NCS、待测样本的检测值，单位为 fg/uL。

9.2. 点击菜单栏 “Export” 〉“Custom Export”，弹出 “Custom Export” 对话框，在 “Export Format” 下拉框选择输出文件格式，勾选需要输出的数据，点击最下方 “Export” 输出数据。

9.3. 点击菜单栏 “Tools” 〉 “Reports”， 出现 “Reports” 窗口。在选项列表勾选标题、运行设置、定量数据，勾选 “Notes” 后可以输入备注信息。在选项窗格输入标题，调整字体格式，或者调用之前保存的模板，点击 “Update Report” 更新预览，确认无误后，点击 “File>Save”， 将结果保存为 PDF 格式。

9.4. 数据可靠性评估

9.4.1. 三个平行孔间 Ct 值差变异系数 CV≤5%,Ct 值大于 35 的孔除外。

9.4.2. 无模板对照 NTC 和阴性对照 NCS 的 CT 值都应大于标曲最低浓度的 CT 值，或根据实验室自身验证结果设定标准。

9.4.3. 标准曲线线性相关系数 $R^2 \geqslant 0.98$，扩增效率 (Efficiency) 在 85%～110%之间。

10. 示例图

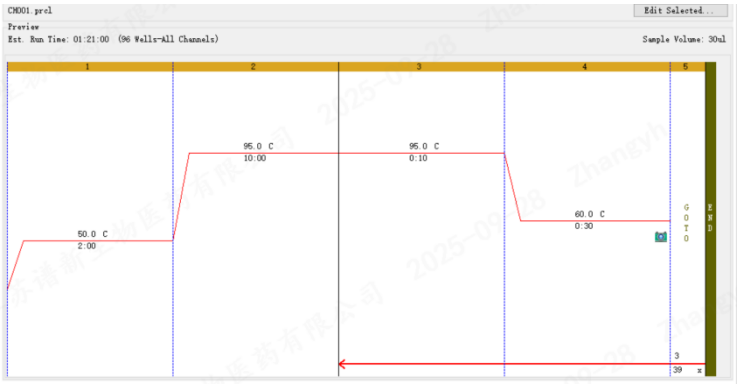


图 1：PCR 扩增程序示例图

图 2：PCR　扩增板间布局示例图

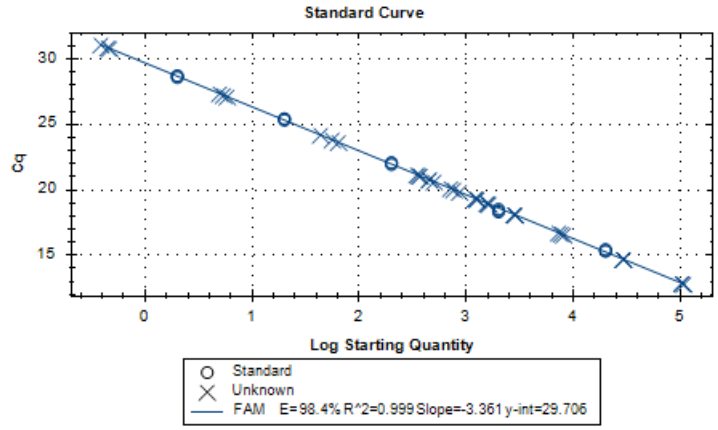


图 2：扩增标准曲线示意图

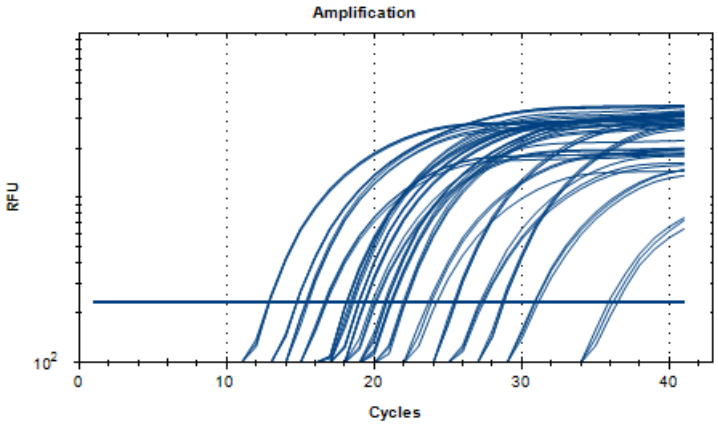


图 3：扩增曲线示意图

11. 联系方式

- 地址：江苏省苏州市吴中经济技术开发区越溪街道吴中大道 1463 号
- 邮编 Postal code：215104
- 联系电话 Tel：400-900-1882
- 邮箱 E-Mail：info@hillgene.com
- 售后邮箱：technical@hillgene.com
- 网址 Website：https://www.hillgene.com

12. 买方须知

我们的产品仅供研究使用。它们不得用于任何其他目的，包括但不限于用于人体、治疗或诊断或任何商业用途。未经我们同意，不得将我们的产品转让给第三方、转售、为转售而修改或用于制造商业产品或向第三方提供服务。

您在使用本产品时还必须遵守 https://www.hillgene.com 上产品网页中描述的任何适用许可要求。您有责任查看、理解并遵守此类声明中规定的任何限制。

更多产品、知识产权和限制使用信息，请访问 https://www.hillgene.com。

附件 1：相关产品（更多产品可咨询谱新生物 https://www.hillgene.com）

类别	产品名称	产品货号
大肠杆菌	E.coli 残留 DNA 检测试剂盒（qPCR-荧光探针法）	HG-ED001
	E.coli 残留 DNA 片段分析检测试剂盒（qPCR-荧光探针法）	HG-EF001
	E.coli 残留总 RNA 样本前处理试剂盒	HG-CL300
	E.coli 残留总 RNA 检测试剂盒 （RT-PCR 荧光探针法）	HG-ER001
	E.coli HCP ELISA 检测试剂盒（2G）	HG-HCP002-2G
	卡那霉素 ELISA 检测试剂盒（2G）	HG-KA002
293 细胞	293T HCP ELISA 检测试剂盒	HG-HCP001
	核酸酶 ELISA 检测试剂盒	HG-BE001
	慢病毒滴度 p24 ELISA 快速检测试剂盒	HG-P001L
	BSA ELISA 检测试剂盒	HG-BS001
	胰蛋白酶 ELISA 检测试剂盒	HG-TR001
	293T 细胞残留 DNA 检测试剂盒（qPCR-荧光探针法）	HG-HD004
	293T 细胞残留 DNA 片段分析检测试剂盒（qPCR-荧光探针法）	HG-HF003
毕赤酵母	毕赤酵母残留 DNA 检测试剂盒（PCR 荧光探针法）	HG-PD001
	毕赤酵母 HCP ELISA 检测试剂盒	HG-HCP005