

上海通尉

TW—reagent.com 上海通尉

## CHO 细胞基因组 DNA 残留探针法 qPCR 试剂盒

仅

供

科

研

使

用

**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/μL。
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 μL 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×探针法 qPCR MasterMix  | 625μL | 1.5mL 本色管 |
| CHO 细胞基因组 DNA 标准品 (1E4 pg/μL)   | 250μL | 0.5mL 绿色盖 |
| CHO 细胞基因组正向引物干粉   | 50 次  | 0.5mL 白色盖 |
| CHO 细胞基因组反向引物干粉   | 50 次  | 0.5mL 蓝色盖 |
| CHO 细胞基因组探针干粉   | 50 次  | 0.5mL 棕色盖 |
| 使用手册  | 1 份   | 无         |
| 本产品采用五孔盒包装  |       |           |
| <p><b>注意：</b>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℃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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$   $1\text{E}4$   $\text{pg}/\mu\text{L}$  的 CHO 细胞基因组 DNA 标准品，
4. 充分震荡混匀 1 分钟，得到  $1\text{E}3$   $\text{pg}/\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1\text{E}3$   $\text{pg}/\mu\text{L}$  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  $1\text{E}2$   $\text{pg}/\mu\text{L}$  的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 换枪头，在 3 号管中加入 5  $\mu\text{L}$   $1\text{E}2$   $\text{pg}/\mu\text{L}$  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  $1\text{E}1$   $\text{pg}/\mu\text{L}$  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 $\mu\text{L}$ 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  $\mu\text{L}$ ，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 $\mu\text{L}$ | 12.5 $\times$ (3N+7) $\mu\text{L}$ |
| 正向引物 (10 mmol/L)              | 2.5 $\mu\text{L}$  | 2.5 $\times$ (3N+7) $\mu\text{L}$  |
| 反向引物 (10 mmol/L)              | 2.5 $\mu\text{L}$  | 2.5 $\times$ (3N+7) $\mu\text{L}$  |
| 探针 (10 mmol/L)                | 2.5 $\mu\text{L}$  | 2.5 $\times$ (3N+7) $\mu\text{L}$  |
| 合计                            | 20 $\mu\text{L}$   | 2.5 $\times$ (3N+7) $\mu\text{L}$  |

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  $\mu\text{L}$ ，再在阴性对照管中加入水 5  $\mu\text{L}$ 、在 3N 个样本管中加入 N 个 DNA 样本各 5  $\mu\text{L}$ （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  $\mu\text{L}$ 。在一个管中加水 25  $\mu\text{L}$  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°C, 15 秒, 60°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染。

**四、数据处理**

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。

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 $\geq$ 0.98, 斜率应在-3.1 至-3.8 范围内。

14. 标准品液浓度低点的 Ct 值, 不得高于 39。

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:

16. 每组加标样品的回收率应在 50%~150%之间, RSD $\leq$ 30%。

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。

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。

|               |                         |
|---------------|-------------------------|
| <b>PCR 编号</b> | TW-E11077               |
| <b>说明书</b>    | 1 份                     |
| <b>自备试剂</b>   | 荧光 PCR 专用模板稀释液          |
| <b>运输及保存</b>  | 低温运输, -20°C保存, 有效期 2 年。 |

**上海通蔚**

**生产企业: 上海通蔚实业有限公司**

**公司地址: 上海市松江区九亭镇研展路158弄15号1603**

**公司电话: 021-54845833**

**技术支持: 15800441009**