

EZ-Probe CHO Residual DNA Quantitation Kit (No ROX)

说明书

Cat. No.: EZ3601-R0

一、产品简介

EZ-Probe CHO Residual DNA Quantitation Kit (No ROX) 是用于进行定量检测各种生物制品的中间品、半成品和成品中的残留 CHO 宿主细胞 DNA 的试剂盒。本试剂盒采用探针法 qPCR，可对样本中残留的 CHO 宿主细胞 DNA 进行专一快速的定量检测，其最低检测限可以达到 fg 级别。本试剂盒可与宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒配套使用。

二、产品组分

组分	货号 (规格)	EZ3601-R01 (50 Rxns)	EZ3601-R02 (100 Rxns)	EZ3601-R03 (5,00 Rxns)
CHO DNA control (30 ng/μl)		25 μl × 1 tube	50 μl × 1 tube	50 μl × 5 tubes
CHO qPCR Mix ^{*1}		1 ml × 1 tube	1 ml × 2 tubes	1 ml × 10 tubes
DNA Dilution Buffer		1.5 ml × 2 tubes	1.5 ml × 3 tubes	1.5 ml × 15 tubes

注: *1: 本试剂盒包含特异性的引物和探针、dNTPs、热启动 DNA 聚合酶和高度优化的缓冲液。

三、试剂保存条件

本试剂盒建议置于 -20°C 避光保存。

四、适用的仪器型号 (请根据仪器型号选择使用本产品)

Bio-Rad CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, MiniOpticon™, Opticon®, Opticon 2, Chromo4™; Roche LightCycler™ 96, Roche LightCycler™ 480; Eppendorf Mastercycler® ep realplex, realplex 2s; Illumina Eco qPCR; Qiagen/Corbett Rotor-Gene® Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000; Thermo Scientific PikoReal Cyclor; Analytikjena qTOWER 3G; Cepheid SmartCycler®; Bioer Linegene 9600; HONGSHI SLAN®-96P. (选择检测参比荧光为 None)
ABI 5700, 7000, 7300, 7500, 7500 Fast, 7700, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne™, StepOne Plus™, Quant-Studio 3, 5, 6, 7, 12K Flex, Dx, ViiA™7; Stratagene MX4000™, MX3000P™, MX3005P™. (如果使用这些仪器, 选择检测参比荧光为 None; 或者向我们的销售人员联系购买 ROX)

五、注意事项

- 使用前, 将各个组分从 -20°C 冰箱中取出, 室温放置 5 ~ 10 分钟或用手紧握试剂管使之充分融化, 上下颠倒 10 次使之充分混匀 (非常重要), 然后使用离心机短暂离心至管底, 放在冰上备用。
- 配液和加样步骤尽量都在冰上操作。

六、简要操作步骤

1. CHO DNA control 的稀释和标准曲线的制备

用试剂盒中提供的 DNA Dilution Buffer 将 CHO DNA control 进行梯度稀释, 稀释浓度依次为 3 ng/μl、300 pg/μl。

30 pg/μl、3 pg/μl、300 fg/μl、30 fg/μl、3 fg/μl。

具体操作如下：

1.1 将试剂盒中的 CHO DNA control 和 DNA Dilution Buffer 置于冰上融化，待完全融化后，上下颠倒 10 次使之充分混匀，低速离心 10 sec。

1.2 取 7 支洁净的 1.5 ml 离心管，分别标记为①，②，③，④，⑤，⑥，⑦。

1.3 在标记为①的 1.5 ml 离心管中加入 90 μl DNA Dilution Buffer 和 10 μl CHO DNA control，即稀释为 3 ng/μl，充分振荡混匀后低速离心 10 sec。

1.4 在②，③，④，⑤，⑥，⑦ 管中先分别加入 90 μl DNA Dilution Buffer，再按下表进行梯度稀释，稀释操作步骤同 1.3。

稀释管	稀释体积	终浓度
②	10 μl ① + 90 μl DNA Dilution Buffer	300 pg/μl
③	10 μl ② + 90 μl DNA Dilution Buffer	30 pg/μl
④	10 μl ③ + 90 μl DNA Dilution Buffer	3 pg/μl
⑤	10 μl ④ + 90 μl DNA Dilution Buffer	300 fg/μl
⑥	10 μl ⑤ + 90 μl DNA Dilution Buffer	30 fg/μl
⑦	10 μl ⑥ + 90 μl DNA Dilution Buffer	3 fg/μl

备注：

1. 每个浓度做 3 个复孔，该试剂可测试 3 fg/μl ~ 300 pg/μl 线性范围。如有需要，可适当扩大或缩小线性范围。
2. 为减少反复冻融次数和避免污染，建议初次使用时将 CHO DNA control 分装储存于-80℃。
3. 已融化未使用的 DNA Dilution Buffer 可于 2 ~ 8℃ 保存 7 天，若长时间不使用，请放置于-20℃。

2. 无模板对照 NTC 的制备

根据实验设置无模板对照 NTC，具体操作如下：

2.1 无模板对照 NTC 无需进行样本前处理，在 qPCR 法检测残留 DNA 含量阶段开始配制即可。

2.2 每管或孔中的 NTC 样本为 20 μl CHO qPCR Mix+10 μl DNA Dilution Buffer。

3. qPCR 反应体系的配制与加样

按照如下表格进行 qPCR 反应体系的配制：

组分	体积
CHO qPCR Mix	20 μl
DNA template	10 μl
总体积	30 μl

备注：

1. 根据所要检测的标准曲线及待测样本数量，计算所需反应孔数，一般做 3 个重复孔/样。
$$\text{反应孔数} = (\text{6 个浓度梯度的标准曲线} + 1 \text{ 个无模板对照 NTC} + \text{待测样本}) \times 3$$
2. 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR Mix 总量：CHO qPCR Mix = (反应孔数 + 2) × 20 μl (含有 2 孔的损失量)。
3. 加样完成后，盖上封板膜并封紧，用离心机 1000 rpm 离心 1 分钟，将液体离心至 qPCR 孔板底部，如有气泡，需将气泡排尽。
4. DNA Template 包括 6 个浓度梯度的 CHO DNA 标准曲线 (② ~ ⑦)、1 个无模板对照 NTC、待测样本。每个检测做 3 个重复孔。

4. qPCR 反应程序如下:

Step	1	2	
	热启动酶活化	PCR 反应	
		循环数 (40 cycles)	
		解链	退火&延伸 (采集荧光信号)
温度	95°C	95°C	60°C
时间	5 min	10 sec	30 sec

注意: 1. 95°C 反应 5 分钟的目的是活化热启动酶, 此步骤为必须步骤, 因此不能省略; 2. 在退火&延伸这一步骤需要进行荧光信号的采集; 3. 不需要跑熔解曲线; 4. 设置程序时选择探针报告荧光基团为 FAM, 淬灭荧光基团为 BHQ1。

七、qPCR 结果分析

- 待上机结束, 正确设置各项数据后即可读取标准曲线的 R^2 、扩增效率 (Eff%)、斜率 (Slope)、截距 (Intercept) 等。正常的标曲: $R^2 > 0.99$; 扩增效率在 $90\% \leq \text{Eff}\% \leq 110\%$ 范围内; Slope 在 3.4 左右。
- 无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值 ≥ 35 。