

ExCell Bio

ResiQuant[®] 即用型 HEK293 残留 DNA 片段分析检测试剂盒（荧光探针 qPCR 法） 说明书

本品仅用于科学研究及生产，不适用于临床诊断和治疗

User Manual

Catalog Number CRH00-1111
 CRH00-1112



I 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人胚胎肾细胞293（HEK293）宿主细胞DNA及其片段分布。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，降低由于扩增产物污染而导致的假阳性。试剂组分中含有参比染料ROX，适用于ABI荧光定量PCR仪或其他同类设备，起到荧光参比光程校正作用。

为降低宿主细胞DNA可能的致癌性与感染性风险，国家药品监督管理局药品评审中心（CDE）发布的《体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则（试行）》中明确指出，需对DNA残留片段大小进行控制，建议尽量将DNA残留片段的大小控制在200 bp以下。本产品针对灵长类特有高丰度保守基因组序列，结合宿主核酸残留控制要求，设计了四种不同长度检测系统，分别用于检测77、198、355和520 bp及以上长度的宿主核酸残留，可定量检测样本中的DNA残留和残留片段的分布比例，用于评价200 bp以上核酸残留的占比。

HEK293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。

I 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293 DNA残留与大小DNA片段分布，定量检测范围为300 pg/μL至30 fg/μL。

I 产品组分及储存条件

组分	CRH00-1111(50T)	CRH00-1112(100T)
293-Std1	350 μL	700 μL
293-Std2	350 μL	700 μL
293-Std3	350 μL	700 μL
293-Std4	350 μL	700 μL
293-Std5	350 μL	700 μL
293 Dilution Buffer	4 mL	4 mLx2
2x 293 RTU qPCR Mix	750 μLx4	1.5 mLx4
6x 293 Detection Mix-77	250 μL	500 μL
6x 293 Detection Mix-198	250 μL	500 μL
6x 293 Detection Mix-355	250 μL	500 μL
6x 293 Detection Mix-520	250 μL	500 μL

储存条件： - 40 ~ - 18℃ 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： 已验证机型为 ABI 7500 系列、安捷伦 MX 3000P、Bio Rad CFX-96。

| 实验准备

仪器及自备试剂

- 荧光定量PCR仪（须含有FAM，如有“reference”选项，请选择“ROX”）；
- 专用的移液枪和对应低吸附带滤芯的枪头；
- 低吸附的1.5 mL离心管和八连管（适配定量PCR仪）；
- 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，避免造成待测样本污染：

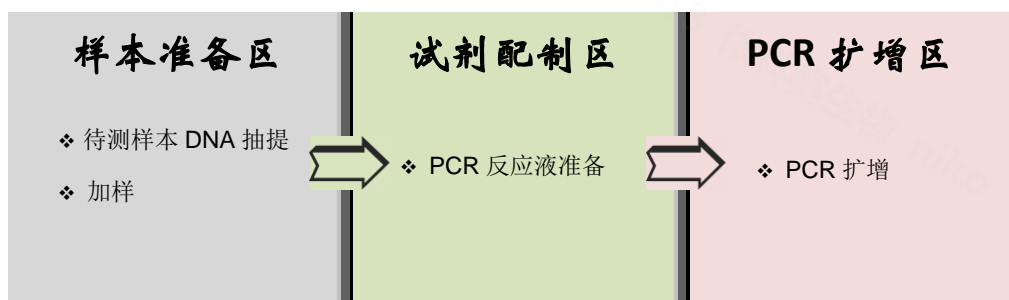
- 试剂配制区：除了模板之外的所有其他试剂的独立配制区，可为独立的物理隔离区（如超净工作台）；
- 样本准备区：准备模板的区域，包括提取和稀释样本；
- PCR扩增区：与前两区域相对独立的进行PCR扩增的区域。

| 实验流程

样本说明

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

实验操作流程



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）。

293 DNA Control 校准品准备：

将 293 DNA Control 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。

PCR 反应液的准备（试剂配制区）

使用前，请将各组份解冻后瞬时离心，确保试剂收集于管底。

- 在反应前先确定要检测的样本数量和对照数量（建议复孔数为3个）：

待检数量=（5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）× 3

注意：若复孔数设置为3个，为满足同时进行四种扩增片段检测，DNA模板体积需≥120 μL。

建议每个样本准备2管同时进行前处理，处理完成后混匀使用。

- 将6× 293 Detection Mix-77、6× 293 Detection Mix-198、6× 293 Detection Mix-355、6× 293

Detection Mix-520、2× 293 RTU qPCR Mix在室温完全解冻后，涡旋混匀并快速离心；

- 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 。

试剂	1 个 30 μL 反应中所需体积
2x 293 RTU qPCR Mix	15 μL
6x 293 Detection Mix-77	5 μL
Total	20 μL

表 1. 77 bp 扩增片段反应体系

试剂	1 个 30 μL 反应中所需体积
2x 293 RTU qPCR Mix	15 μL
6x 293 Detection Mix-198	5 μL
Total	20 μL

表 2. 198 bp 扩增片段反应体系

试剂	1 个 30 μL 反应中所需体积
2x 293 RTU qPCR Mix	15 μL
6x 293 Detection Mix-355	5 μL
Total	20 μL

表 3. 355 bp 扩增片段反应体系

试剂	1 个 30 μL 反应中所需体积
2x 293 RTU qPCR Mix	15 μL
6x 293 Detection Mix-520	5 μL
Total	20 μL

表 4. 520 bp 扩增片段反应体系

注：根据待检样本数量，适当包含合理的损耗，计算在试剂配制总量内。

加样（样本准备区）

布板示例：

	77 bp			198 bp			355 bp			520 bp		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC
B	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
C	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS
D	Std5	Std5	Std5	Std5	Std5	Std5	Std5	Std5	Std5	Std5	Std5	Std5
E	Std4	Std4	Std4	Std4	Std4	Std4	Std4	Std4	Std4	Std4	Std4	Std4
F	Std3	Std3	Std3	Std3	Std3	Std3	Std3	Std3	Std3	Std3	Std3	Std3
G	Std2	Std2	Std2	Std2	Std2	Std2	Std2	Std2	Std2	Std2	Std2	Std2
H	Std1	Std1	Std1	Std1	Std1	Std1	Std1	Std1	Std1	Std1	Std1	Std1

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，选择 Set up 栏下面的 Design Wizard；
2. 然后依次输入本次实验名称，选择机型“7500（96 wells）”、实验类型“Quantitation”、试剂“TaqMan Reagents”、实验时长“Standard”；
3. 依次点击“Next”进入“Target”设定界面，选择报告基团为FAM，淬灭基团为None；
4. 依次点击“Next”进入“Plate Setup”设定界面，按需求设定标准品，样品及阴性对照的名字及在96孔板上的位置；

在“Assign Targets and Samples”选项中，左下角的“Select the dye to use as the passive reference”下拉框选择“ROX”；

如需设定标准品的绝对量，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标准品的赋值及稀释倍数等参数，即完成标准品的绝对量赋值。

5. 进入“Run Method”设定界面，依次将反应体系设置为30 μ L，反应程序设置为两步法反应程序；

步骤		温度（℃）	时间（s）	循环数（次）
1	消 化	37	300	1
2	预变性	95	180	1
3	变 性	95	15	40
	收集荧光	55	40	
检测通道：FAM				

- 全部设定好后，选择界面右上角的绿色按钮“Start Run”开始检测；
- 检测完毕后做数据分析，选择最左侧的选择条“Analysis”；
- 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 R^2 。

质量控制

- 校准品按十倍梯度稀释，判定校准曲线的 $R^2 \geq 0.98$ ，斜率 (Slope) 为 - 3.60 ~ - 3.10，扩增效率 (Efficiency) 为 90% ~ 110%；
- 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 $Ct \geq 32$ 或 No Ct。

检验结果说明

结果判读参考

下表中， $C_{\text{样本}}$ 代表检测样本的浓度：

FAM	结果判定	结果报告
$Ct < Ct_{ST1}$	$C_{\text{样本}} > 300 \text{ pg}/\mu\text{L}$ ，超出定量上限，需稀释到合适浓度后重新测定。	/
$Ct_{ST1} \leq Ct \leq Ct_{ST5}$	样本浓度在定量范围内，根据校准曲线回算浓度。	/
$Ct > Ct_{ST5}$ 或 No Ct	超出定量下限或未检出。	$C_{\text{样本}} < 30 \text{ fg}/\mu\text{L}$

分别得到四种检测体系中待测样本检测浓度，以 77 bp 检测体系的待测样本检测值为 100%，计算大于 198 bp、大于 355 bp 与大于 520 bp DNA 残留百分比。

操作注意细节

- 建议使用一次性手套、口罩，洁净的实验服；
- 使用经校准的移液器；
- 建议使用带滤芯的低吸附枪头；
- 在不同的实验区域使用专用的移液枪和枪头及相关设备；
- 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；
- 为避免交叉污染，请小心开合所有试剂管或反应管；
- 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；
- 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）；
- 尽量避免将PCR产物带到试剂配制区及样本准备区；
- 实验台和仪器表面使用后建议用75%酒精清洁；
- 实验过程中的废弃枪头需及时浸泡在0.1%的次氯酸钠溶液中，实验结束后进行清场。

免责声明

在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。