



GeticoSEQ 293 DNA 残留定量试剂盒使用说明书

一、产品概述

GeticoSEQ 293 DNA 残留定量试剂盒专为精确测定生物制品中人类胚胎肾 293 (HEK293) 系列细胞 (如 HEK293、293T 等) 的宿主细胞 DNA 残留量而精心研发。其具有极高的灵敏度与特异性, 广泛应用于生物制品领域, 涵盖各类生物制品的中间样本、半成品及成品检测, 包括基因细胞治疗的腺相关病毒 / 慢病毒相关制品、干细胞和蛋白制品等, 为生物制品质量控制与安全性评估提供关键数据支持。

在生物制品生产过程中, 尤其是基因细胞治疗领域, 多种病毒载体常使用 293 系列细胞进行生产。然而, 在产品纯化阶段, 可能会有少量 HEK293 细胞 DNA 残留。这些残留 DNA 可能引发免疫反应, 或携带未知基因片段, 存在潜在风险, 因此精确检测其含量至关重要。本试剂盒经过严格的研发与验证, 能够满足生物制品生产企业、质量控制实验室以及监管机构对 HEK293 DNA 残留检测的严格标准。

二、检测原理

本试剂盒采用 TaqMan 荧光探针结合聚合酶链式反应 (PCR) 技术。在 PCR 扩增过程中, TaqMan 荧光探针特异性结合 HEK293 细胞 DNA 的靶序列。该探针 5' 端连接荧光报告基团 (如 FAM 等), 3' 端连接淬灭基团 (如 TAMRA 等)。在完整探针结构下, 由于荧光报告基团与淬灭基团距离较近, 荧光信号被淬灭, 难以检测到明显荧光。

当引物延伸至探针结合位点时, Taq 酶的 5' - 3' 外切酶活性将探针酶切降解, 使得探针 5' 端荧光报告基团与 3' 端淬灭基团分离。此时, 荧光报告基团发射荧光, 并且随着 PCR 循环数的增加, 扩增的 DNA 量呈指数增长, 对应的荧光信号强度也成正比增强。通过实时荧光定量 PCR 仪实时监测荧光信号变化, 将样品荧光信号与已知浓度标准品荧光信号进行对比, 即可精确定量 HEK293 细胞 DNA 残留量。此技术能够有效避免非特异性扩增的干扰, 确保检测结果可靠, 最低检测限可达 fg 级别, 满足痕量 HEK293 DNA 残留检测需求。同时, 本试剂盒独特的引物设计保证了对碎片化 DNA 的检测能力, 进一步提高了检测的全面性和准确性。

三、产品组成

产品名称	规格	详细说明
2X qPCR Mix	12.5 μ l / 反应	包含优化的 PCR 缓冲液, 精确调节反应体系的离子强度、pH 值等, 为 PCR 反应创造稳定的环境; dNTPs (dATP、dCTP、dGTP、dTTP) 作为合成 DNA 的原料, 足量供应以保证扩增顺利进行; $MgCl_2$ 为 Taq 酶活性提供必需的辅助因子, 其浓度经过优化, 平衡扩增效率与特异性; 热启动 Taq 酶在常温下无活性, 需高温激活, 有效避免低温非特异性扩增, 提高扩增的特异性与准确性。
293 Primer & Probe Mix	2 μ l / 反应	针对 HEK293 细胞 DNA 特异性设计的引物, 其序列经过生物信息学分析与实验验证, 能够精准结合 HEK293 细胞 DNA 特定靶区域, 启动高效扩增; 配套的 TaqMan 荧光探针同样特异性识别靶序列, 确保对 HEK293 DNA 的高特异性扩增与检测, 减少与其他物种 DNA 的交叉反应。

DNA Dilution Buffer	/	用于稀释 DNA 标准品和样品，其成分经过优化，可维持 DNA 的稳定性，减少稀释时 DNA 的降解或聚集。同时，保证不同样品和标准品稀释后反应体系一致，提高实验的重复性与再现性，确保结果可靠。
293 DNA Control (10 ng/μl)	/	作为标准品用于制作标准曲线。其制备遵循严格的标准操作流程，经过国家标样校准，纯度高，且经过多重检测确保无蛋白和离子干扰。高纯度的标准品为定量检测的准确性提供可靠的参照，有助于准确测定样品中 HEK293 DNA 残留量。
RNase - free H ₂ O	/	用于配制反应体系，经过特殊处理无 RNase 污染。在涉及 RNA 提取相关操作（若有）时，可避免对 RNA 样本的潜在影响，维持反应体系的纯净，确保实验结果不受 RNase 干扰。
50X ROX Reference Dye（可选）	/	用于校正荧光信号，不同 PCR 反应孔可能存在微小的光学差异，ROX 染料产生稳定的荧光信号来校正这些差异，消除孔间荧光背景差异，提高检测结果的准确性。可根据荧光定量 PCR 仪的需求选择添加，若仪器自身有其他校准方式或无需额外校正，则可不使用。

四、适用范围

- 1. 生物制品生产过程监测：**在基因细胞治疗的慢病毒和腺相关病毒生产中，从病毒转染 293 系列细胞后的培养上清检测，可及时发现细胞 DNA 泄漏情况；在纯化过程的各个步骤后对样品进行检测，能够评估纯化工艺对 HEK293 DNA 的去除效果，从而优化纯化流程；在干细胞和蛋白制品生产中，从细胞培养到产品纯化的各个环节，对 HEK293 DNA 残留量进行监测，确保产品质量符合要求。
- 2. 质量控制与放行检测：**供生物制品质量控制实验室对批次产品进行 HEK293 DNA 残留量检测。依据预先设定的质量标准，判断产品是否合格，决定能否放行上市。严格的质量控制有助于企业确保产品质量稳定一致，提升企业信誉，降低因产品质量问题引发召回等风险。
- 3. 法规遵从性检测：**符合各国药品监管机构（如 FDA、EMA、NMPA 等）对生物制品中宿主细胞 DNA 残留量的严格监管要求。例如，世界卫生组织（WHO）和国际人用药品注册技术协调会（ICH）指南建议生物制品中残留的宿主细胞 DNA 每剂不应超过 10 ng。企业通过本试剂盒检测，能够准确掌握产品中 HEK293 DNA 残留情况，助力确保产品合规，顺利通过监管机构的检查与审批。

五、操作步骤

（一）准备工作

- 1. 从冰箱取出试剂盒所有试剂，DNA Control 和 DNA Dilution Buffer 先在冰上解冻，防止温度变化过快影响试剂稳定性。其余试剂置于室温缓慢平衡，约 30 分钟，使试剂温度均匀接近室温，减少温度差异导致的实验误差。试剂完全解冻后，轻轻颠倒混匀，避免剧烈振荡产生气泡，剧烈振荡可能破坏酶结构或导致引物、探针等分子聚集。然后短暂低速离心（约 1000 - 2000 rpm，10 秒），让试剂集中于管底，便于准确吸取。**



2. 准备干净的 RNase - free 的 PCR 反应管或 96 孔板、移液器及配套枪头。使用前校准移液器，确保移液体积准确。操作过程中使用新开封的枪头，防止交叉污染。实验台面先用 75% 酒精擦拭消毒，再用核酸酶清除剂清洁，营造洁净的实验环境，避免环境中核酸酶干扰实验。
3. 按需准备待检测样品。样品应为经过适当处理（如核酸提取、纯化等）的溶液，确保其中 DNA 可扩增。若样品是生物制品原液，根据实际情况适当稀释，使最终反应体系中 DNA 浓度在试剂盒检测范围内。可通过预实验或参考类似样品检测经验确定合适的稀释倍数。对于成分复杂的样品，如含有高浓度蛋白质、多糖等物质，可能需要优化提取和纯化步骤，去除干扰物质，提高检测准确性。

（二）标准曲线制备

1. 取 7 个干净的 1.5 ml 离心管，分别清晰标记为 STD 0、STD 1、STD 2、STD 3、STD 4、STD 5、STD 6，防止混淆。
2. 在 STD 0 离心管中，加入 90 μ l DNA Dilution Buffer 和 10 μ l 293 DNA Control，用移液器轻轻吹打混匀，吹打 15 - 20 次，避免产生气泡，确保混合均匀。短暂离心（1000 - 2000 rpm，10 秒）后，此时 DNA 浓度为 3 ng/ μ l。将稀释好的 DNA 标准品分装保存，可在 -25 $^{\circ}$ C 至 -15 $^{\circ}$ C 短期（不超过 3 个月）保存，避免反复冻融，因为反复冻融易导致 DNA 降解，影响标准曲线的准确性。
3. 在其余 6 个标记好的离心管中各加 90 μ l DNA Dilution Buffer。从 STD 0 管吸取 10 μ l 溶液加入 STD 1 管，充分混匀，可轻轻颠倒离心管 10 - 15 次，或用移液器缓慢吹打 15 秒 - 1 分钟，保证浓度均匀。短暂离心后，STD 1 管 DNA 浓度为 300 pg/ μ l。依此方法依次对后续离心管进行倍比稀释，得到不同浓度梯度的 DNA 标准品，浓度依次为 300 pg/ μ l、30 pg/ μ l、3 pg/ μ l、300 fg/ μ l、30 fg/ μ l、3 fg/ μ l。每个浓度的标准品设置 3 个重复孔，重复实验可提高数据的可靠性与准确性，减少实验误差。

（三）样品准备

1. 设置阳性对照（ERC，External Reference Control）：根据实验需求设定 ERC 中 HEK293 DNA 浓度（以 30 pg HEK293 DNA 为例）。在干净的 1.5 ml 离心管中，加入 100 μ l 待检测样品，再加入 10 μ l 浓度为 3 pg/ μ l 的 293 DNA 标准品（STD 3），充分混匀，可用漩涡振荡器振荡 10 - 15 秒，或用移液器反复吹打混匀，标记为 ERC。然后与待检测样品一同进行 DNA 提取（若样品已完成提取步骤则直接进行后续操作），制备纯化的 ERC 样品。阳性对照用于验证整个检测流程的有效性，确保实验条件能够准确检测已知量的 HEK293 DNA。
2. 设置阴性对照（NCS，Negative Control Sample）：在干净的 1.5 ml 离心管中加入 100 μ l 样品基质（若无特殊说明，一般为 DNA Dilution Buffer），标记为 NCS。将 NCS 样品与待检测样品一同进行 DNA 提取（若样品已完成提取步骤则直接进行后续操作），制备纯化的 NCS 样品。阴性对照用于检测实验过程是否有外来污染，若阴性对照出现阳性结果，说明实验过程存在污染，需要排查原因重新实验。
3. 设置无模板对照（NTC，No Template Control）：对于每管或每孔的 NTC 反应，配制 20 μ l 反应混合液，即 15 μ l 293 qPCR Mix + 4 μ l 293 Primer & Probe Mix + 1 μ l（若有内参相关试剂则加入内参试剂，若无则加入 RNase - free H₂O）+ 10 μ l DNA Dilution Buffer。建议设置 3 个重复孔。无模板对照用于检测 PCR 反应体系是否有非特异性扩增，若 NTC 出现扩增曲线，说明反应体系存在污染或引物、探针有非特异性结合，需要优化反应体系或重新配制试剂。

（四）配制反应体系（以 20 μ l 体系为例）

在冰上的 RNase - free PCR 反应管或 96 孔板中，按以下顺序依次加入各成分：



1. DNA 模板：标准品加入不同浓度梯度的标准品溶液 5 μl ，准确吸取，移液器吸头避免接触反应管壁，防止交叉污染；样品加入处理和稀释后的待检测样品溶液 5 μl ，确保均匀吸取；ERC、NCS 和 NTC 分别加入相应的样品溶液 5 μl 。
2. 2X qPCR Mix：加入 12.5 μl ，提供 PCR 反应所需的各种成分，缓慢沿管壁滴加，避免产生气泡。
3. 293 Primer & Probe Mix：加入 2 μl ，启动对 HEK293 DNA 的特异性扩增与检测，移液器吸头深入试剂管底部吸取，确保吸取量准确。
4. 若使用 50X ROX Reference Dye，根据仪器要求按适当比例加入（如仪器要求 ROX 终浓度为 1X，则加入 0.4 μl 50X ROX Reference Dye），若仪器无需 ROX 校正，则用 RNase - free H₂O 补足体积。加入 ROX 染料时注意与其他试剂充分混合。
5. RNase - free H₂O：补足至 20 μl 反应体积，逐滴加入，避免体积误差。

加入各成分后，用移液器轻轻吹打混匀，避免产生气泡，吹打 3 - 5 次。然后将反应管或 96 孔板短暂低速离心（1000 - 2000 rpm，10 秒），使反应液集中于管底或孔底，保证反应体系均匀一致。

（五）PCR 扩增与检测

1. 将配制好的反应管或 96 孔板放入荧光定量 PCR 仪，按照以下推荐程序进行 PCR 扩增（不同型号的 PCR 仪可能需要根据其特性适当调整）：
 - 预变性：95 $^{\circ}\text{C}$ ，3 - 5 分钟，激活热启动 Taq 酶，使 DNA 模板充分变性，打开双链结构，为后续引物结合与扩增做准备。
 - 循环反应（40 - 45 个循环）：95 $^{\circ}\text{C}$ ，15 - 30 秒，使 DNA 双链解链，破坏氢键，形成单链模板；60 $^{\circ}\text{C}$ ，30 - 60 秒，引物退火及延伸，此温度下引物与单链模板特异性结合，Taq 酶以引物为起点，利用 dNTPs 合成新的 DNA 链，同时收集荧光信号，该温度下荧光信号稳定且特异性强。
1. 扩增结束后，仪器自动生成荧光信号随循环数变化的曲线（Ct 值）。根据标准曲线的 Ct 值与对应 DNA 浓度的关系，通过仪器软件或手动计算，得出样品中 HEK293 DNA 的浓度。标准曲线的线性相关系数（R²）应大于 0.99，确保标准曲线可靠。若 R² 值不符合要求，需要重新制备标准曲线并进行实验。可能导致 R² 值不佳的原因有标准品稀释不准确、反应体系污染、仪器故障等，需要逐一排查。

（六）结果分析

1. **计算样品中 HEK293 DNA 残留量**：根据标准曲线方程，将样品的 Ct 值代入计算，得出样品中 HEK293 DNA 的浓度（单位：fg/ μl 或 pg/ μl 等）。再结合样品的稀释倍数、取样体积等信息，计算出原始样品中 HEK293 DNA 的残留量（如每毫克蛋白中 HEK293 DNA 的含量、每毫升生物制品中 HEK293 DNA 的含量等）。计算过程中仔细核对数据，避免错误。
2. **结果判断**：将计算出的样品中 HEK293 DNA 残留量与相关质量标准或法规要求进行比较。若样品中 HEK293 DNA 残留量低于规定限值，则样品符合质量要求；若高于限值，需要进一步分析原因，如生产工艺是否存在问题、样品处理过程是否引入污染等，并采取相应的改进措施。例如，怀疑生产工艺问题，可排查生产过程的各个环节，优化纯化工艺；怀疑样品处理污染，需要重新评估样品处理流程，强化实验操作规范。

六、注意事项

1. **试剂保存与稳定性**：试剂盒保存于 -20 $^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ，避免反复冻融。反复冻融可能导致酶活性降低、引物和探针降解等，影响实验结果。使用前短暂离心试剂管，确保试剂集中在管底。试剂盒自生产日起，在规定的保存条



件下有效期为 [X] 个月（具体有效期见产品标签）。超过有效期的试剂盒性能难以保证，请勿使用。使用前检查试剂外观，若有沉淀、变色等异常情况，也应停止使用。

2. **避免污染：**整个操作过程应在洁净环境中进行，严格使用 RNase - free 耗材，操作时佩戴手套、口罩，防止交叉污染。实验台面定期用核酸酶清除剂清洁。使用后的废弃试剂和耗材按照生物危害物处理规定妥善处理，防止污染环境。例如，废弃的 PCR 反应管、枪头放入专门的生物危害废弃物收集容器，统一进行高压灭菌等处理。
3. **引物与探针：**293 Primer & Probe Mix 对温度敏感，使用时尽量减少在室温下的暴露时间。从冰箱取出后应立即使用并尽快放回。若发现引物或探针有沉淀或变色等异常情况，请勿使用，这可能会影响实验结果的准确性。沉淀可能是引物或探针聚集，变色可能意味着结构变化，均会影响其与靶 DNA 的结合能力。
4. **样品处理：**确保样品处理过程中 DNA 未降解或丢失。对于含有复杂成分样品（如高浓度蛋白质、多糖、核酸酶抑制剂等），可能需要额外的纯化步骤，去除干扰物质，保证 PCR 反应顺利进行。若不确定样品的处理方法，建议先进行预实验，优化样品处理条件。例如，尝试不同的核酸提取方法或纯化柱，比较对样品中 HEK293 DNA 提取效果及后续 PCR 反应的影响。
5. **仪器校准：**使用荧光定量 PCR 仪前，确保仪器已校准且性能正常。定期检查仪器的荧光检测系统、热循环系统等关键部件，保证实验数据准确。