



GeticoSEQ CHO DNA 残留定量试剂盒使用说明书

一、产品概述

GeticoSEQ CHO DNA 残留定量试剂盒专为精确测定生物制品中中国仓鼠卵巢（CHO）宿主细胞 DNA 残留量而精心打造。其具备卓越的高灵敏度与特异性，在生物制品领域应用广泛，涵盖各类生物制品的中间样本、半成品及成品检测，像重组蛋白表达产物、疫苗生产流程中的样品等，为生物制品质量把控与安全性评估给予核心数据支撑。

在生物制品生产进程中，CHO 细胞常被选作宿主细胞来表达目标蛋白或生成其他生物活性物质。然而，在产品纯化环节，可能会有少量 CHO 细胞 DNA 残留。这些残留 DNA 或引发免疫反应，或携带未知基因片段，潜藏风险，故而精准检测其含量极为关键。本试剂盒历经严谨研发与验证，能够契合生物制品生产企业、质量控制实验室以及监管机构对 CHO DNA 残留检测的严苛标准。

二、检测原理

本试剂盒运用 TaqMan 荧光探针搭配聚合酶链式反应（PCR）技术。PCR 扩增期间，TaqMan 荧光探针特异性结合 CHO 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）。完整探针结构下，因荧光报告基团与淬灭基团距离近，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，Taq 酶的 5' - 3' 外切酶活性将探针酶切降解，致使探针 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，且随着 PCR 循环数增加，扩增的 DNA 量呈指数增长，对应荧光信号强度也成正比增强。借助实时荧光定量 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对比，即可精准定量 CHO 细胞 DNA 残留量。此技术能有效规避非特异性扩增干扰，保障检测结果可靠，最低检测限可达 fg 级别，满足痕量 CHO DNA 残留检测需求。

三、产品组成

产品名称	规格	详细说明
2X qPCR Mix	12.5 μ l / 反应	含优化的 PCR 缓冲液，精准调控反应体系离子强度、pH 值等，为 PCR 反应营造稳定环境；dNTPs（dATP、dCTP、dGTP、dTTP）作为合成 DNA 原料，足量供应保障扩增顺利；MgCl ₂ 为 Taq 酶活性提供必需辅助因子，浓度经优化，平衡扩增效率与特异性；热启动 Taq 酶常温无活性，需高温激活，有效避免低温非特异性扩增，提升扩增特异性与准确性。
CHO Primer & Probe Mix	2 μ l / 反应	针对 CHO 细胞 DNA 特异性设计引物，序列经生物信息学分析与实验验证，能精准结合 CHO 细胞 DNA 特定靶区域，启动高效扩增；配套 TaqMan 荧光探针同样特异性识别靶序列，确保对 CHO DNA 高特异性扩增与检测，减少与其他物种 DNA 交叉反应。
DNA Dilution Buffer	/	用于稀释 DNA 标准品和样品，成分经优化，可维持 DNA 稳定性，减少稀释时 DNA 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，提升实验重复性与再现性，确保结果可靠。
CHO DNA Control (10 ng/μl)	/	作为标准品用于制作标准曲线。制备遵循严格标准操作流程，经国家标样校准，纯度高，多重检测确保无蛋白和离子干扰。高纯度标准品为定量检测准确性提供可靠参照，助力准确测定样品中 CHO DNA 残留量。
RNase - free H ₂ O	/	用于配制反应体系，经特殊处理无 RNase 污染。涉及 RNA 提取相关操作（若有）时，可避免对 RNA 样本潜在影响，维持反应体系纯净，保障实验结果不受 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光学差异，ROX 染料产生稳定荧光信号校正这些差异，消除孔间荧光背景差异，提高检测结果准确性。可依荧光定量 PCR 仪需求选择添加，若仪器自身有其他校准方式或无需额外校正，可不使用。

四、适用范围

- 1. 生物制品生产过程监测：**在重组蛋白表达上游细胞培养阶段，能检测细胞培养上清中是否有 CHO DNA 泄漏，及时察觉潜在细胞污染问题；纯化过程中，对各纯化步骤后样品检测，评估纯化工艺对 CHO DNA 去除效果，优化纯化流程；单克隆抗体生产中，从抗体表达、收获到纯化各环节，监测 CHO DNA 残留量，确保抗体产品质量；疫苗制备时，对疫苗原液、半成品及成品检测，保障疫苗安全性，使其契合生产质量控制标准。
- 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 CHO DNA 残留量检测。依据预设质量标准，判断产品是否达标，决定能否放行上市。严格质量控制助力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。企业借此试剂盒检测，能精准掌握产品中 CHO DNA 残留状况，助力确保产品合规，顺利通过监管机构检查与审批。

五、操作步骤

（一）准备工作

- 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。
- 备好干净的 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。操作中用新开封枪头，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，营造洁净实验环境，避免环境中核酸酶干扰实验。
- 按需准备待检测样品。样品应为经适当处理（如核酸提取、纯化等）的溶液，保证其中 DNA 可扩增。若样品是生物制品原液，依实际情况适当稀释，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稀释倍数。对于成分复杂样品，如含高浓度蛋白质、多糖等物质，可能需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 CHO 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 3 个月）保存，避免反复冻融，因反复冻融易致 DNA 降解，影响标准曲线准确性。
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倍比稀释，得到不同浓度梯度 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。每个浓度标准品设 3 个重复孔，重复实验可提高数据可靠性与准确性，减少实验误差。

(三) 样品准备

1. **设置阳性对照 (ERC, External Reference Control)**：依实验需求设定 ERC 中 CHO DNA 浓度（以 30 pg CHO DNA 为例）。在干净 1.5 ml 离心管中，加 100 μ l 待检测样品，再加 10 μ l 浓度为 3 pg/ μ l 的 CHO 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有效性，确保实验条件能准确检测已知量的 CHO DNA。
2. **设置阴性对照 (NCS, Negative Control Sample)**：在干净 1.5 ml 离心管中加 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 CHO qPCR Mix + 4 μ l CHO 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 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，按以下顺序依次加各成分：

1. DNA 模板：标准品加入不同浓度梯度标准品溶液 5 μ l，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 μ l，保证均匀吸取；ERC、NCS 和 NTC 分别加入相应样品溶液 5 μ l。
2. 2X qPCR Mix：加 12.5 μ l，提供 PCR 反应所需各种成分，缓慢沿管壁滴加，避免产生气泡。
3. CHO Primer & Probe Mix：加 2 μ l，启动对 CHO DNA 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. 若用 50X ROX Reference Dye，依仪器要求按适当比例加入（如仪器要求 ROX 终浓度为 1X，则加 0.4 μl 50X ROX Reference Dye），若仪器无需 ROX 校正，则用 RNase - free H_2O 补足体积。加入 ROX 染料时注意与其他试剂充分混合。
 5. RNase - free H_2O ：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，按以下推荐程序进行 PCR 扩增（不同型号 PCR 仪可能需依特性适当调整）：
 - 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 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，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 Ct 值与对应 DNA 浓度关系，通过仪器软件或手动计算，得出样品中 CHO DNA 浓度。标准曲线线性相关系数（ R^2 ）应大于 0.99，确保标准曲线可靠。若 R^2 值不符合要求，需重新制备标准曲线并实验。可能导致 R^2 值不佳原因有标准品稀释不准确、反应体系污染、仪器故障等，需逐一排查。

（六）结果分析

1. **计算样品中 CHO DNA 残留量**：依据标准曲线方程，将样品 Ct 值代入计算，得出样品中 CHO DNA 浓度（单位：fg/ μl 或 pg/ μl 等）。再结合样品稀释倍数、取样体积等信息，算出原始样品中 CHO DNA 残留量（如每毫克蛋白中 CHO DNA 含量、每毫升生物制品中 CHO DNA 含量等）。计算过程仔细核对数据，避免错误。
2. **结果判断**：将计算出的样品中 CHO DNA 残留量与相关质量标准或法规要求比较。若样品中 CHO DNA 残留量低于规定限值，则样品符合质量要求；若高于限值，需进一步分析原因，如生产工艺有无问题、样品处理过程是否引入污染等，并采取相应改进措施。例如，怀疑生产工艺问题，可排查生产过程各环节，优化纯化工艺；怀疑样品处理污染，需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，确保试剂集中管底。试剂盒自生产日起，在规定保存条件下有效期为 [X] 个月（具体有效期见产品标签）。超有效期试剂盒性能难保证，请勿使用。使用前检查试剂外观，若有沉淀、变色等异常，也应停用。
2. **避免污染**：整个操作在洁净环境进行，严格用 RNase - free 耗材，操作戴手套、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生物危害物处理规定妥善处理，防止污染环境。如废弃 PCR 反应管、枪头放入专门生物危害废弃物收集容器，统一高压灭菌等处理。
3. **引物与探针**：CHO Primer & Probe Mix 对温度敏感，使用时尽量减少室温暴露时间。从冰箱取出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，请勿使用，会影响实验结果准确性。沉淀可能是引物或探针聚集，变色可能意味着结构变化，均影响其与靶 DNA 结合能力。



4. **样品处理**：确保样品处理中 DNA 未降解或丢失。含复杂成分样品（如高浓度蛋白质、多糖、核酸酶抑制剂等），可能需额外纯化步骤，去除干扰物质，保证 PCR 反应顺利。若不确定样品处理方法，建议先预实验，优化样品处理条件。如尝试不同核酸提取方法或纯化柱，比较对样品中 CHO DNA 提取效果及后续 PCR 反应影响。
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。定期检查仪器荧光检测系统、热循环系统等关键部件，保证实验数据准确。