

ExCell Bio

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

本品仅用于科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗

货 号

CRH00-1081S

CRH00-1081

CRH00-1082



| 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。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，大大降低了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。

本产品适用于以人胚胎肾细胞293细胞株（293-T, 293-F, 293-H, 293-E等）为宿主生产的生物药原液、成品、半成品、中间品或工艺过程监控样本。为获得定量样本DNA的校准曲线，试剂盒中包含5个浓度梯度（300 pg/μL至30 fg/μL）的DNA校准品用于制备校准曲线。

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。

| 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，定量检测范围为300 pg/μL至30 fg/μL。

| 产品组分及储存条件

组分	CRH00-1081 (50T)	CRH00-1082 (100T)	CRH00-1081S (50T)
293-Std1	150 μL	250 μL	150 μL
293-Std2	150 μL	250 μL	150 μL
293-Std3	150 μL	250 μL	150 μL
293-Std4	150 μL	250 μL	150 μL
293-Std5	150 μL	250 μL	150 μL
293 Dilution Buffer	4 mL	4 mL × 2	4 mL
2× 293 RTU qPCR Mix	750 μL	750 μL × 2	750 μL
6× 293 RTU Detection	250 μL	500 μL	250 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：适用但不限于 ABI 7500、伯乐 CFX96、安捷伦 Mx3000P。

| 实验准备

仪器及耗材

1. 荧光定量PCR仪（须含有FAM，如有“reference”选项，可选ROX通道）；
2. 移液器和对应无菌低吸附带滤芯枪头；
3. 无菌低吸附1.5 mL离心管和八连管（适配荧光定量PCR仪）；
4. 洁净实验服，一次性手套、口罩等。

实验区域的划分

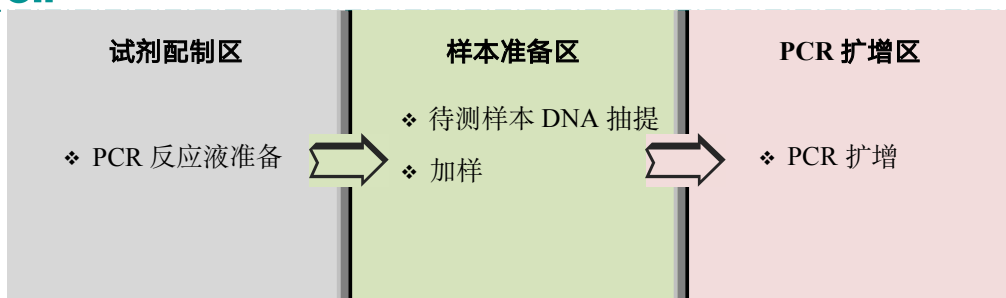
建议采用以下分区制度，避免造成交叉污染：

1. 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）；
2. 样本准备区：准备模板的区域，包括提取和稀释样本；
3. 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

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



PCR 反应液准备（试剂配制区）

【注意事项】首次使用前，请将各组份恢复至室温后瞬时离心，确保试剂收集于管底。

1. 在反应前先确定要检测的样本数量和对照数量：

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个数 + 待测样本对应加标回收ERC个数) × 3；

2. 将6× 293 RTU Detection Mix，2× 293 RTU qPCR Mix在恢复至室温后，涡旋混匀并快速离心；

3. 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 (反应之前放2 ~ 8℃)。

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

【注意事项】：根据待检样本数量，适当包含10%的损耗，计算在试剂配制总量内。

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）。

校准品制备：

将 293-Std1、293-Std2、293-Std3、293-Std4、293-Std5 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。

加样（样本准备区）

布板示例：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	NTC	NTC		TS1	TS1	TS1		TS1 ERC	TS1 ERC	TS1 ERC	
B					TS2	TS2	TS2		TS2 ERC	TS2 ERC	TS2 ERC	
C					TS3	TS3	TS3		TS3 ERC	TS3 ERC	TS3 ERC	
D	ST5	ST5	ST5									
E	ST4	ST4	ST4									
F	ST3	ST3	ST3						NEG	NEG	NEG	
G	ST2	ST2	ST2									
H	ST1	ST1	ST1									

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，点击屏幕左上角“New Experiment”新建实验；
2. 依次输入本次实验名称，选择机型“7500（96 wells）”、实验类型“Quantitation-Standard Curve”、试剂“TaqMan® Reagents”、实验时长“Standard”；
3. 选择“Plate Setup”栏下的“Define Targets and Samples”设定界面，选择报告基团为“FAM”，淬灭基团为“None”，输入样本名称；
4. 进入“Assign Targets and Samples”设定界面，选择样本Targets及在96孔板上的位置；在左下角的“Select the dye to use as the passive reference”下拉框选择“ROX”；如果设定校准品的绝对量，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校准品的赋值及稀释倍数等参数，即完成校准品的绝对量赋值；
5. 进入“Run Method”设定界面，将反应体系设为30 μ L，按下表设置反应程序：

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
	退火/延伸（收集荧光）	55	40	
检测通道：FAM				

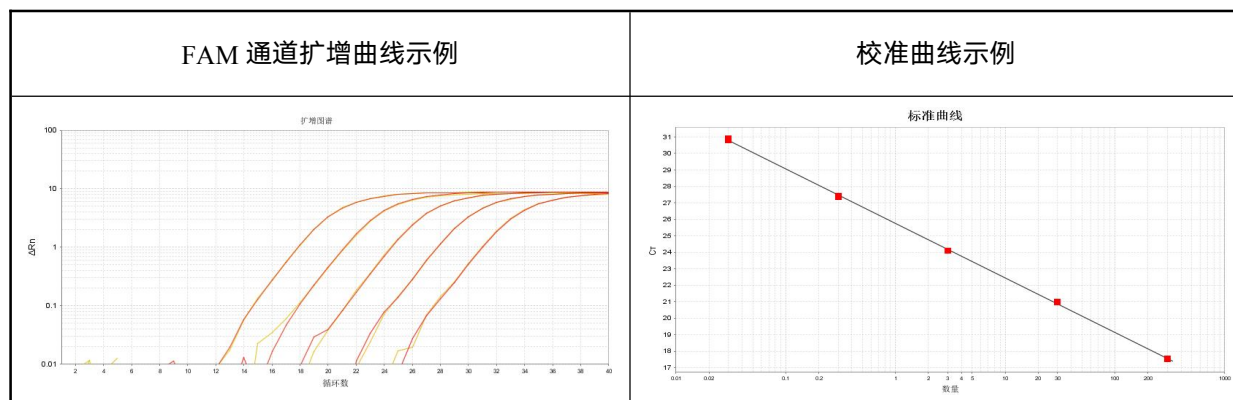
- 全部设定好后，选择界面右上角的绿色按钮“Start Run”开始检测；
- 检测完毕后选择最左侧的选择条“Analysis”，做数据分析；
- 在Amplification Plot界面选择FAM的Threshold为Auto，此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常；
- 在Standard Curve界面，可读取校准曲线的斜率，截距和 R^2 。

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

参考示例



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
$C_t < C_{t\text{Std}1}$	$C_{\text{样本}} > 300 \text{ pg}/\mu\text{L}$ ，超出定量上限，需稀释到合适浓度后重新测定	/
$C_{t\text{Std}1} \leq C_t \leq C_{t\text{Std}5}$	样本浓度在定量范围内，根据校准曲线计算浓度	计算浓度
$C_t > C_{t\text{Std}5}$ 或 No Ct	超出定量下限或未检出	$C_{\text{样本}} < 30 \text{ fg}/\mu\text{L}$

操作注意细节

1. 建议使用一次性手套、口罩，洁净的实验服；
2. 使用经校准的移液器；
3. 建议使用带滤芯的低吸附枪头；
4. 在不同的实验区域使用专用的移液枪和枪头及相关设备；
5. 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；
6. 为避免交叉污染，请小心开合所有试剂管或反应管；
7. 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；
8. 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）；
9. 尽量避免将PCR产物带到试剂配制区及样本准备区；
10. 实验台和仪器表面使用后建议用75%酒精清洁。

| 免责声明

1. 产品应按照说明书指导使用，实验者未按说明书指导操作，本公司不对由此导致的产品性能偏离承担责任；
2. 产品仅用于科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。