

SHENTEK[®]

Human 残留 DNA 检测试剂盒

（PCR-荧光探针法）说明书

货号：SK030207H100

版本：A/5

仅供研究用

湖州申科生物技术有限公司

■ 试剂盒简介

SHENTEK® Human 残留 DNA 检测试剂盒用于定量检测各种生物制品的中间品、半成品和成品中 Human 宿主细胞 DNA 的专用试剂盒。

本试剂盒利用荧光探针原理, 定量检测样本中 Human 残留 DNA。检测快速, 专一性强, 性能可靠, 最低检测限可以达到 fg 水平。试剂盒配套有 Human DNA 定量参考品。本试剂盒与 SHENTEK® 宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒配套使用, 可准确定量样本中 Human 残留 DNA。

■ 试剂盒成份

表 1. 试剂盒组份

组份	装量	储存条件
Human DNA 定量参考品	50 μ l $\times$ 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下
Human Primer&Probe MIX	300 μ l $\times$ 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下, 避光
qPCR Reaction Buffer	850 μ l $\times$ 2 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下, 避光
DNA 稀释液	1.5ml $\times$ 3 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下

■ **规格:** 100 Reactions。

■ **有效期:** 规定储存条件下 24 个月。

■ 适用机型

- ABI PRISM® 7500 Real-Time PCR System
- ABI StepOne Plus Real-Time PCR System
- CFX96(Bio-Rad)
- LineGene 9600
- Mx3000PTM (Stratagene)

- qTOWER3G (德国耶拿)

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 1.5ml 无菌离心管
- 96 孔 qPCR 板
- 1000μl, 100μl, 10μl 无菌低吸附带滤芯枪头

■ 相关设备

- 荧光定量 PCR 仪
- 1000μl, 100μl, 10μl 移液枪

■ 操作过程

❖ Human DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

DNA 定量参考品浓度标注于管壁标签上, 请确认浓度后再进行稀释。

用试剂盒中提供的 DNA 稀释液将 DNA 定量参考品进行梯度稀释, 稀释浓度依次为 3ng/μl、300pg/μl、30pg/μl、3pg/μl、300fg/μl、30fg/μl。具体操作如下:

1. 将试剂盒中的 DNA 定量参考品和 DNA 稀释液置于冰上融化, 待完全融化后, 轻微振荡混匀, 短时间快速离心 10s。

2. 取 6 支干净的 1.5ml 离心管, 分别标记为 ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5。

3. 在 ST0 管中用 DNA 稀释液将 DNA 定量参考品稀释至 3 ng/μl, 振荡混匀后短时间快速离心 10s。

4. 在 ST1, ST2, ST3, ST4, ST5 管中分别加入 90μl DNA 稀释液。

5.按表 2 依次进行 5 次稀释操作。

表 2. Human DNA 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度
ST1	10μl ST0+90μl DNA 稀释液	300pg/μl
ST2	10μl ST1+90μl DNA 稀释液	30pg/μl
ST3	10μl ST2+90μl DNA 稀释液	3pg/μl
ST4	10μl ST3+90μl DNA 稀释液	300fg/μl
ST5	10μl ST4+90μl DNA 稀释液	30fg/μl

 已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于 2-8℃。

❖ 加样回收质控 ERC 的制备

根据需要设置 ERC 中的 Human 加样浓度（以制备加 30pg Human DNA 量的样本 ERC 为例），具体操作如下：

- 1.取 100μl 待测样本加入 1.5ml 干净的离心管中。
- 2.再加入 10μl ST3，混匀，标记为样本 ERC。

 样本 ERC 和同批待测样本一起进行样本前处理，制备成样本 ERC 纯化液。

❖ 阴性质控 NCS 的制备

根据实验设置阴性质控，具体操作如下：

- 1.取 100μl 样本基质溶液(或 DNA 稀释液)加入 1.5ml 干净的离心管中；
- 2.标记为阴性质控 NCS。

 阴性质控 NCS 和同批待测样本一起进行样本前处理，制备成阴性质控 NCS 纯化液。

❖ qPCR 反应液的准备

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。

反应孔数=(5 个浓度梯度的标准曲线+1 个无模板对照 NTC+1 个阴性质控 NCS+待测样本×2)×3

 待测样本×2 是因为我们推荐每个待测样本检测时都应同时做样本 ERC。

2. 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR MIX 总量:

 $\text{qPCR MIX} = (\text{反应孔数} + 2) \times 20\mu\text{l}$ (含有 2 孔的损失量)

3. 各试剂放在冰上融化, 并根据表 3 所示准备 qPCR MIX:

表 3. qPCR MIX 配制表

组份	单孔反应
qPCR Reaction Buffer	17 μl
Human Primer&Probe MIX	3 μl
总体积	20 μl

❖ 加样

1. 各试剂置于冰上, 轻微振荡混匀, 按表 4 所示加样:

表 4. 各反应孔加样示例

标准曲线	20 μl qPCR MIX+10 μl ST1/ST2/ST3/ST4/ ST5
NTC	20 μl qPCR MIX + 10 μl DNA 稀释液
NCS	20 μl qPCR MIX + 10 μl 阴性质控 NCS 纯化液
待测样本	20 μl qPCR MIX + 10 μl 待测样本纯化液
样本 ERC	20 μl qPCR MIX + 10 μl 样本 ERC 纯化液

 加样完成后每孔总体积为 30 μl 。

表 5.96 孔板排版示例

NTC		S1	S1	S1	S1 ERC	S1 ERC	S1 ERC					A
NTC		S2	S2	S2	S2 ERC	S2 ERC	S2 ERC		ST5	ST5	ST5	B
NTC		S3	S3	S3	S3 ERC	S3 ERC	S3 ERC		ST4	ST4	ST4	C
		S4	S4	S4	S4 ERC	S4 ERC	S4 ERC		ST3	ST3	ST3	D
NCS		S5	S5	S5	S5 ERC	S5 ERC	S5 ERC		ST2	ST2	ST2	E
NCS									ST1	ST1	ST1	F
NCS												G
												H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

 该示例表示的是检测 5 个浓度梯度的 DNA 标准曲线 (ST1~ST5)、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、5 个待测样本 (S1~S5) 和每个样本的 ERC (S1 ERC~S5 ERC)。每个检测做 3 个重复孔。

 实际检测时可根据样本多少, 参照此示例进行 96 孔板排版加样。

2. 将 96 孔板用光学膜封闭, 轻微震荡混匀, 短时间快速离心 10s 后放入 qPCR 仪。

❖ qPCR 程序参数设置

 以 AB 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 1.4 为例。

1. 创建空白新程序, 选择绝对定量检测模板。
2. 创建新检测探针, 命名为 Human-DNA, 选择报告荧光基团为 FAM, 猝灭荧光基团为 none, 检测参比荧光为 ROX。
3. 设置两步法反应程序: 95°C 预变性 10min; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 40 个循环; 反应体积 30μl。

❖ qPCR 结果分析

 以 AB 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 1.4 为例。

1. 在 Results 的 Amplification Plot 面板中, 将 Threshold 设置为 0.02, 点击 Analyze, 此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常。

2. 在 Results 的 Plate 面板中, 将标准曲线孔的 Task 一栏设置为 Standard, 并且在 Quantity 一栏分别赋值为 3000、300、30、3、0.3(含义为每孔的 DNA 总量, 单位为 pg), 并且在相应的 sample name 一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。

3. 在 Results 的 Plate 面板中, 将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC, 将阴性质控 NCS 孔、待测样本孔、样本 ERC 孔的 Task 一栏设置为 Unknown, 并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 NTC、NCS、S、ERC, 之后点击 .

4. 在 Results 的 Standard Curve 面板中, 可读取标准曲线的斜率 (Slope)、截距 (Intercept)、 R^2 。

5. 在 Results 的 Report 面板中, Mean Quantity 一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样本、样本 ERC 的检测值, 单位为 pg/10 μ l。后续可在检测报告中将单位换算为 pg/ μ l 或 pg/ml。

 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。

 根据待测样本和样本 ERC 的检测结果计算加样回收率, 加样回收率要求在 50%~150%之间。

服务支持



湖州申科生物技术有限公司

www.shenkebio.com

地址: 浙江省湖州市红丰路 1366 号
南太湖科创中心 5 号楼 5 楼

Email: Info@shenkebio.com

电话: 0572-2165911