

SHENTEK[®]

质粒 DNA 残留检测试剂盒
(PCR-荧光探针法)
说明书

货号：SK030217PL100

版本：A/4

仅供研究用

湖州申科生物技术有限公司

■ 试剂盒简介

SHENTEK®质粒 DNA 残留检测试剂盒用于定量检测基因治疗产品中质粒 DNA 残留的专用检测试剂盒, 如 CAR-T 细胞治疗中慢病毒载体制备相关的质粒 DNA。

本试剂盒利用 Taqman 探针原理, 通过各质粒共有 DNA 序列, 如 ColE1/pMB1/pBR322/pUC 来源的复制子, 定量检测样本中质粒 DNA 的残留。客户可以事先将质粒 DNA 序列给本公司技术人员进行确认。本试剂盒检测快速, 专一性强, 性能可靠, 最低检测限可以达到 10^2 copies/ μ l。试剂盒配套有质粒 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, 可准确定量样本中残留的微量质粒 DNA。

■ 试剂盒成份

表 1. 试剂盒组份

组份	装量	储存条件
Plasmid DNA 定量参考品	50 μ l $\times$ 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下
Plasmid 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
IPC MIX	150 μ l $\times$ 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下, 避光

■ **规格:** 100 Reactions。

■ **有效期:** 规定储存条件下 24 个月。

■ 适用机型（包括但不限于）

- ABI PRISM® 7500 Real-Time PCR System
- CFX96 (Bio-Rad)
- Linegene 9600plus（博日）

■ 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 无菌有滤芯枪头

■ 相关设备

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

■ 操作过程

❖ Plasmid DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

Plasmid DNA 定量参考品浓度为 1.2 ng/μl，通过如下公式换算成拷贝数： 2.98×10^8 copies /μl。

公式：

质粒拷贝数 (copies/μl) = $6.02 \times 10^{14} \times$ 质粒浓度 (ng/μl) / (质粒碱基数 $\times$ 660)

用试剂盒中提供的 DNA 稀释液将定量参考品进行 10 倍梯度稀释，具体操作如下：

1. 将试剂盒中的定量参考品和 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 Plasmid DNA 定量参考品稀释 10 倍, 得到 ST0, 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 90 μ l DNA 稀释液。

5. 按表 2 依次进行 5 次稀释操作。

表 2. 质粒 DNA 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度 (copies / μ l)
ST1	10 μ l ST0+90 μ l DNA 稀释液	2.98×10^6
ST2	10 μ l ST1+90 μ l DNA 稀释液	2.98×10^5
ST3	10 μ l ST2+90 μ l DNA 稀释液	2.98×10^4
ST4	10 μ l ST3+90 μ l DNA 稀释液	2.98×10^3
ST5	10 μ l ST4+90 μ l DNA 稀释液	2.98×10^2

 已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于 2-8°C。

❖ 阴性质控 NCS 的制备

根据实验设置阴性质控, 具体操作如下:

取 100 μ l 样本基质溶液(或 DNA 稀释液)加入 1.5ml 干净的离心管中标记为阴性质控 NCS。

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

❖ qPCR 反应液的制备和加样

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) × 3

2. 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR MIX 总量:

 qPCR MIX = (反应孔数 + 2) × 20μl (含有 2 孔的损失量)

3. 各试剂置于冰上融化, 轻微振荡混匀, 按表 3 所示配制:

表 3. qPCR MIX 配制表

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

4. 上述试剂混匀, 按表 4 所示加样:

表 4. 各反应孔加样示例

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

 加样完成后每孔总体积为 30μl。

❖ IPC 组反应液的制备和加样

无模板对照 NTC 和待测样本均需做 IPC 检测, 根据表 5 和表 6 配制。

表 5. IPC qPCR MIX 配制表

组份	单孔反应
qPCR Reaction Buffer	15.9μl
IPC MIX	1.3μl
DNA 稀释液	2.8μl
总体积	20μl

表 6. IPC 各反应孔加样示例

无模板对照 NTC	20μl IPC qPCR MIX + 10μl DNA 稀释液
待测样本	20μl IPC qPCR MIX + 10μl 待测样本纯化液

加样完成后每孔总体积为 30μl。

表 7. 96 孔板排版示例

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

该示例表示的是检测 5 个浓度梯度的质粒 DNA 标准曲线 (ST1~ST5)、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、2 个待测样本 (S1, S2)、无模板对照 NTC 的 IPC (IPC-NTC) 和待测样本的 IPC (IPC-S1, IPC-S2)。建议做 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。

❖ 上机

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。

 选择 FAM 通道代表 Plasmid 质粒检测信号, 选择 VIC 通道代表 IPC 检测信号。

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 plasmid-DNA, 选择报告荧光基团为 FAM, 猝灭荧光基团为 none。创建新检测探针, 命名为 IPC, 选择报告荧光基团为 VIC, 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

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 2.98e+006、2.98e+005、2.98e+004、2.98e+003、2.98e+002 (单位为 copies /μl), 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, 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, 单位为 copies / μ l。

6. 分析 IPC 的 Ct 值, 样本的 Ct-IPC 值与 NTC 的 Ct-IPC 值在 ± 1 个 Ct 值范围内。

 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。

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: 0572-2115083