

E1A 残留 DNA 检测试剂盒

（PCR-荧光探针法）

说明书

货号：1101109

版本：A/1

仅供研究用

湖州申科生物技术有限公司

■ 试剂盒简介

SHENTEK® E1A 残留 DNA 检测试剂盒用于定量检测生物制品中宿主细胞，如 HEK293、293T 细胞，来源的 E1A 残留 DNA 的专用试剂盒。

本试剂盒利用荧光探针原理，采用 qPCR 方法定量检测样品中 E1A 残留 DNA。检测快速，专一性强，性能可靠。试剂盒配套有 E1A 线性化定量参考品与非线性化定量参考品，供客户针对自己的需求进行选择。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，可准确定量样品中残留的微量 E1A DNA。

■ 试剂盒组分

表 1.试剂盒组分

组分	装量	储存条件
E1A 线性化 DNA 定量参考品	冻干粉, 1 管	-18℃及以下
E1A 非线性化 DNA 定量参考品	50µl×1 管	-18℃及以下
E1A Primer&Probe MIX	300µl×1 管	-18℃及以下，避光
qPCR Reaction Buffer	850µl×2 管	-18℃及以下，避光
DNA 稀释液	1.5ml×3 管	-18℃及以下
IPC MIX	150µl×1 管	-18℃及以下，避光

■ 规格

100 Reactions。

■ 有效期

规定储存条件下 24 个月，具体详见试剂盒标签。

■ 适用机型（包括但不限于）

- SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统
- 7500 Real-Time PCR System
- CFX96 定量 PCR 系统

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 1.5ml 无菌低吸附离心管
- 96 孔 qPCR 板或八联管
- 1000µl, 100µl, 10µl 无菌低吸附带滤芯枪头

■ 相关设备

- 迷你离心机

➤ 漩涡振荡器

➤ 荧光定量 PCR 仪

➤ 1000μl, 100μl, 10μl 移液枪

■ 操作过程

❖ E1A 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

E1A 线性化 DNA 定量参考品: 将 E1A 线性化 DNA 定量参考品快速离心 15s, 准确移取 55μl 新鲜 ddH₂O 加至管底, 溶解冻干粉, 浓度为 20ng/μl。

✚ 为保证冻干粉充分溶解, 轻弹数下混匀, 短时间快速离心 10s, 如此重复 3 次, 再静置 10min 后使用。

✚ E1A 非线性化 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, 得到线性化 DNA 的浓度为 4.97×10^9 copies/μl, 非线性化 DNA 的浓度 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 E1A DNA 定量参考品和 DNA 稀释液置于冰上或 2-8°C 条件下融化。待完全融化后, 轻弹数下混匀, 短时间快速离心 3~5s, 如此重复 3 次。

✚ 可根据自身样品结构特性选择线性化或非线性化 E1A DNA 定量参考品配制标曲。

2. 如使用 E1A 非线性化 DNA 定量参考品, 则取 6 支干净的 1.5ml 离心管, 分别标记为 ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5。如使用 E1A 线性化 DNA 定量参考品, 则取 8 支干净的 1.5ml 离心管, 分别标记为 ST, ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6。

3. 如使用 E1A 非线性化 DNA 定量参考品, 则在 ST0 管中用 DNA 稀释液将 E1A 非线性化 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 3~5s, 重复 3 次。如使用 E1A 线性化 DNA 定量参考品, 则在 ST 管中用 DNA 稀释液将 E1A 线性化 DNA 定量参考品稀释 10 倍, 得到 ST, 振荡混匀短时间快速离心 3~5s, 重复 3 次。再在 ST0 管中用 DNA 稀释液将 ST 稀释 10 倍, 得到 ST0, 振荡混匀后短时间快速离心 3~5s, 重复 3 次以确保定量参考品与 DNA 稀释液充分混匀。

4. 在 ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6 管中分别加入 90μl DNA 稀释液。

5. 按表 2 依次进行稀释操作。

表 2. E1A DNA 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度 (copies/μl)	
		非线性 DNA	线性 DNA
ST1	10μl ST0+90μl DNA 稀释液	2.98×10^6	4.97×10^6
ST2	10μl ST1+90μl DNA 稀释液	2.98×10^5	4.97×10^5
ST3	10μl ST2+90μl DNA 稀释液	2.98×10^4	4.97×10^4
ST4	10μl ST3+90μl DNA 稀释液	2.98×10^3	4.97×10^3
ST5	10μl ST4+90μl DNA 稀释液	2.98×10^2	4.97×10^2
ST6	10μl ST5+90μl DNA 稀释液	/	4.97×10^1

已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于 2-8°C。

若 DNA 稀释液中有析出，建议于 37°C 条件下进行孵育。

标准曲线浓度点可根据实际验证结果选择，应至少有 5 个浓度点。

❖ 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 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 和同批待测样品一起进行样品前处理，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品数量，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 + 待测样品) × 3

如采用线性化参考品，标准曲线应有 6 个浓度梯度。

2. 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR MIX 总量（含有 2 孔的损失量）：

$$\text{qPCR MIX} = (\text{反应孔数} + 2) \times 20\mu\text{l}$$

3. 各试剂放在冰上或 2-8°C 条件下融化，轻微振荡混匀，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	15.9μl
EIA Primer&Probe MIX	2.8μl
IPC MIX	1.3μl
总体积	20μl

4. 上述各试剂置于冰上，轻微震荡混匀，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
待测样品	20μl qPCR MIX + 10μl 待测样品纯化液

- 加样完成后每孔总体积为 30μl。
- 如采用线性化参考品，标准曲线应有 6 个浓度梯度。

表 5.96 孔板排版示例

S1	S1	S1										A
S2	S2	S2										B
S3	S3	S3							ST1	ST1	ST1	C
S4	S4	S4							ST2	ST2	ST2	D
S5	S5	S5							ST3	ST3	ST3	E
									ST4	ST4	ST4	F
									ST5	ST5	ST5	G
NCS	NCS	NCS	NTC	NTC	NTC							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 E1A 标准曲线（ST1~ST5）、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、5 个待测样品（S1~S5）。每个检测做 3 个重复孔。
 - 实际检测时可根据样品多少，参照此示例进行 96 孔板排版加样。
5. 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 程序设置

✧ SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例。

1. 点击“实验向导”。
2. “孔板编辑”页面中选择步骤 1: 选择反应孔。
3. 选择步骤 2: 选择项目中的“E1A 非线性化残留 DNA”或“E1A 线性化残留 DNA”程序。
4. “实验运行”页面中点击“开始”运行程序。

✧ 其他定量 PCR 系统程序设置如下。

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 E1A-DNA, 选择报告荧光基团为 CY5, 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 (可选)。
3. 设置两步法反应程序: 95°C 预变性 10min; 95°C 15 s, 60°C 1 min (读取荧光), 40 个循环; 反应体积 30μl。

❖ qPCR 结果分析

✧ 以 SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例。

1. “孔板编辑”页面中步骤 3: 定义反应孔, 将标准曲线孔的选择样品类型设置为标准品, 并在标品赋值中分别根据表 2 赋值, 例如“E1A 非线性化残留 DNA”设为 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“样本名称”中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5; 若为“E1A 线性化残留 DNA”, 设为 4.97e+006、4.97e+005、4.97e+004、4.97e+003、4.97e+002、4.97e+001 (单位为 copies/μl), 并且在相应的“样本名称”中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。
2. 待测样品将样品类型设置为待测样品, NTC 将样品类型设置为无模板对照。
3. 在“实验分析”页面点击 , 可读取标准曲线的斜率、截距、相关系数、扩增效率。
4. 在“反应孔信息表中”可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品的检测值, 单位为 copies/μl。

✧ 以 7500 Real-Time PCR System、软件版本 1.4 为例。

1. 在 Results 的 Amplification Plot 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 中, 将标准曲线孔的 Task 一栏设置为 Standard, 并且在 Quantity 一栏分别根据表 2 赋值, 非线性 DNA 标准曲线设为 $2.98\text{e}+006$ 、 $2.98\text{e}+005$ 、 $2.98\text{e}+004$ 、 $2.98\text{e}+003$ 、 $2.98\text{e}+002$ (单位为 copies/ μl), 并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。线性 DNA 标准曲线则设为 $4.97\text{e}+006$ 、 $4.97\text{e}+005$ 、 $4.97\text{e}+004$ 、 $4.97\text{e}+003$ 、 $4.97\text{e}+002$ 、 $4.97\text{e}+001$ (单位为 copies/ μl), 并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。

3. 在 Results 的 Plate 中, 将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC, 将阴性质控 NCS 孔、待测样品孔的 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 中, 可读取标准曲线的斜率 (Slope)、截距 (Intercept)、 R^2 。

5. 在 Results 的 Report 中, Mean Quantity 一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品的检测值, 单位为 copies/ μl 。

6. 样品的 Ct-IPC 值与 NCS 的 Ct-IPC 值要求在 ± 1 个 Ct 值范围内。如样品的 Ct-IPC 值与 NCS 的 Ct-IPC 值相比明显增大, 则表明样品可能有抑制。如同时测试加标样品, 则优先考虑样品回收率结果, IPC 结果作为参考。

7. NTC 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值 ≥ 35 。NCS 的 Ct 均值应大于标曲最低浓度 Ct 均值, 若经验证的定量限浓度低于标曲最低浓度, 则 NCS 的检测值应小于定量限浓度。

 上述示例结果分析的参数设置仅供参考, 具体需依据实验室机型及使用的软件版本进行设定, 一般也可由仪器自动判读。

修订日期: 2022 年 11 月 10 日

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 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话: 0572-2165910