

MDCK 残留 DNA 片段分析检测试剂盒
(PCR-荧光探针法)
说明书

货号：1103175

版本：A/2

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 试剂盒简介

SHENTEK® MDCK 残留 DNA 片段分析检测试剂盒是用于定量分析检测各种生物制品的中间品、半成品和成品中 MDCK 宿主细胞 DNA 残留片段大小分布的专用试剂盒。

本试剂盒利用 PCR 荧光探针法原理, 设计了四种不同的扩增片段 (84 bp、142 bp、204 bp、504 bp) 来定量检测分析样品中 MDCK 残留 DNA 片段的大小分布情况。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 MDCK DNA 定量参考品。本试剂盒与宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒配套使用。

■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
MDCK DNA 定量参考品	NNA006	50 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下
qPCR Reaction Buffer	NNB001	850 μ L \times 8 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下, 避光
MDCK Primer&Probe MIX-84	NNC025	300 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下, 避光
MDCK Primer&Probe MIX-142	NNC026	300 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下, 避光
MDCK Primer&Probe MIX-204	NNC027	300 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下, 避光
MDCK Primer&Probe MIX-504	NNC028	300 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下, 避光
IPC MIX	NNC070	550 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下, 避光
DNA 稀释液	NND001	1.5 mL \times 3 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下

■ 规格

4 \times 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
- LightCycler480 II 定量 PCR 系统

■ 实验所需但试剂盒中未含材料


- 1.5 mL 无菌离心管
- PCR 八联管或 96 孔 qPCR 板
- 1000 μ L, 100 μ L, 10 μ L 无菌低吸附带滤芯枪头

■ 相关设备

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

■ 操作过程

❖ MDCK DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

 片段分析试剂盒中含有四种不同长度的扩增片段, 在建立标曲时, 需分别对不同的扩增片段设置标曲, 并根据对应扩增片段的标曲来计算其残留量和分布相对量。

MDCK 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 MDCK DNA 定量参考品进行梯度稀释, 稀释浓度依次为 3 ng/ μL 、300 pg/ μL 、30 pg/ μL 、3 pg/ μL 、300 fg/ μL 、30 fg/ μL 、3 fg/ μL 。具体操作如下:

1. 将试剂盒中的 MDCK DNA 定量参考品和 DNA 稀释液置于冰上或 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 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。
2. 取 7 支干净的 1.5 mL 离心管, 分别标记为 ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6。
3. 在 ST0 管中用 DNA 稀释液将 MDCK DNA 定量参考品稀释至 3 ng/ μL , 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 180 μL DNA 稀释液。
5. 按表 2 依次进行 6 次稀释操作。

表 2. MDCK DNA 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度
ST1	20 μL ST0+180 μL DNA 稀释液	300 pg/ μL
ST2	20 μL ST1+180 μL DNA 稀释液	30 pg/ μL
ST3	20 μL ST2+180 μL DNA 稀释液	3 pg/ μL
ST4	20 μL ST3+180 μL DNA 稀释液	300 fg/ μL
ST5	20 μL ST4+180 μL DNA 稀释液	30 fg/ μL
ST6	20 μL ST5+180 μL DNA 稀释液	3 fg/ μL

 已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 。

 若 DNA 稀释液中有析出, 建议于 37 $^{\circ}\text{C}$ 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 100 μL DNA 稀释液加入 1.5 mL 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 (qPCR MIX) 的准备

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 = (6 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) \times 3

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 $^{\circ}\text{C}$ 条件下融化, 并参考表 3、4、5、6 所示准备对应扩增片段的 qPCR MIX:

表 3. qPCR MIX-84 配制表

组份	单孔反应
qPCR Reaction Buffer	15.9 μL
Primer&Probe MIX-84	2.8 μL
IPC MIX	1.3 μL
总体积	20 μL

表 4. qPCR MIX-142 配制表


组份	单孔反应
qPCR Reaction Buffer	15.9 μL
Primer&Probe MIX-142	2.8 μL
IPC MIX	1.3 μL
总体积	20 μL

表 5. qPCR MIX-204 配制表

组份	单孔反应
qPCR Reaction Buffer	15.9 μL
Primer&Probe MIX-204	2.8 μL
IPC MIX	1.3 μL
总体积	20 μL

表 6. qPCR MIX-504 配制表

组份	单孔反应
qPCR Reaction Buffer	15.9 μL
Primer&Probe MIX-504	2.8 μL
IPC MIX	1.3 μL
总体积	20 μL

 为了满足同步进行四个不同扩增长度的片段分析检测需求，样品前处理中的 DNA 洗脱体积需要 $\geq 120\mu\text{L}$ 。

❖ 加样

1. 各试剂置于冰上融化，轻微振荡混匀，选择对应扩增片段参考表 7、8、9、10 所示加样：

表 7. MIX-84 各反应孔加样示例

ST-84	20 μL qPCR MIX-84+10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5/ST6
NTC	20 μL qPCR MIX-84+10 μL DNA 稀释液
NCS	20 μL qPCR MIX-84+10 μL 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 μL qPCR MIX-84+10 μL 待测样品纯化液

表 8. MIX-142 各反应孔加样示例

ST-142	20 μL qPCR MIX-142+10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5/ST6
NTC	20 μL qPCR MIX-142+10 μL DNA 稀释液
NCS	20 μL qPCR MIX-142+10 μL 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 μL qPCR MIX-142+10 μL 待测样品纯化液

表 9. MIX-204 各反应孔加样示例

ST-204	20 μL qPCR MIX-204+10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5/ST6
NTC	20 μL qPCR MIX-204+10 μL DNA 稀释液
NCS	20 μL qPCR MIX-204+10 μL 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 μL qPCR MIX-204+10 μL 待测样品纯化液

表 10. MIX-504 各反应孔加样示例

ST-504	20 μL qPCR MIX-504+10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5/ST6
NTC	20 μL qPCR MIX-504+10 μL DNA 稀释液
NCS	20 μL qPCR MIX-504+10 μL 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 μL qPCR MIX-504+10 μL 待测样品纯化液


 加样完成后每孔总体积为 30μL。

表 11. 96 孔板排版示例

板 1:

MIX-84						MIX-142						
NTC	NTC	NTC				NTC	NTC	NTC				A
NCS	NCS	NCS				NCS	NCS	NCS				B
			ST6	ST6	ST6				ST6	ST6	ST6	C
			ST5	ST5	ST5				ST5	ST5	ST5	D
S1	S1	S1	ST4	ST4	ST4	S1	S1	S1	ST4	ST4	ST4	E
S2	S2	S2	ST3	ST3	ST3	S2	S2	S2	ST3	ST3	ST3	F
S3	S3	S3	ST2	ST2	ST2	S3	S3	S3	ST2	ST2	ST2	G
S4	S4	S4	ST1	ST1	ST1	S4	S4	S4	ST1	ST1	ST1	H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

板 2:

MIX-204						MIX-504						
NTC	NTC	NTC				NTC	NTC	NTC				A
NCS	NCS	NCS				NCS	NCS	NCS				B
			ST6	ST6	ST6				ST6	ST6	ST6	C
			ST5	ST5	ST5				ST5	ST5	ST5	D
S1	S1	S1	ST4	ST4	ST4	S1	S1	S1	ST4	ST4	ST4	E
S2	S2	S2	ST3	ST3	ST3	S2	S2	S2	ST3	ST3	ST3	F
S3	S3	S3	ST2	ST2	ST2	S3	S3	S3	ST2	ST2	ST2	G
S4	S4	S4	ST1	ST1	ST1	S4	S4	S4	ST1	ST1	ST1	H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

该示例表示的是检测各浓度梯度的 DNA 标准曲线、1 个无模板对照 NTC、4 个待测样品、1 个阴性质控样品 NCS。每个检测做 3 个重复孔。

板 1 的 1-3 列为 qPCR MIX-84 的样品、1 个无模板对照 NTC 和 1 个阴性质控样品 NCS, 4-6 列为 qPCR MIX-84 各浓度梯度的 DNA 标准曲线, 7-9 列为 qPCR MIX-142 的样品、1 个无模板对照 NTC 和 1 个阴性质控样品 NCS, 10-12 列为 qPCR MIX-142 各浓度梯度的 DNA 标准曲线;

板 2 的 1-3 列为 qPCR MIX-204 的样品、1 个无模板对照 NTC 和 1 个阴性质控样品 NCS, 4-6 列为 qPCR MIX-204 各浓度梯度的 DNA 标准曲线, 7-9 列为 qPCR MIX-504 的样品、1 个无模板对照 NTC 和 1 个阴性质控样品 NCS, 10-12 列为 qPCR MIX-504 各浓度梯度的 DNA 标准曲线。

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。

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”页面中选择检测 MDCK-84 反应孔, 选择步骤 2 项目中的“**MDCK SIZE-84bp**”程序; 选择检测 MDCK-142 反应孔, 选择步骤 2 项目中的“**MDCK SIZE-142bp**”程序; 选择检测 MDCK-204 反应孔, 选择步骤 2 项目中的“**MDCK SIZE-204bp**”程序; 选择检测 MDCK-504 反应孔, 选择步骤 2 项目中的“**MDCK SIZE-504bp**”程序。

3. “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:


选择 FAM 通道代表 MDCK 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. 四组 qPCR MIX 创建新检测探针, 分别为命名为 MDCK-84、MDCK-142、MDCK-204、MDCK-504, 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 (可选)。
3. 设置三步法反应程序: **95 °C 预变性 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min 30 s (读取荧光), 40 个循环;** 反应体积 30 μ L。


 各实验室可根据所用机型设置合理的反应程序。

❖ 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, 并进行赋值。“MDCK SIZE-84bp、MDCK SIZE-142bp、MDCK SIZE-204bp 和 MDCK SIZE-504bp”设为 300、30、3、0.3、0.03、0.003, 并在相应的“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 pg/ μ L。

✧ 以 7500 Real-Time PCR System、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 300、30、3、0.3、0.03、0.003 (含义为每孔的模板浓度, 单位为 pg/ μ L), 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 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、S1、S2、S3、S4, 之后点击 。
4. 在 Results 的 Standard Curve 面板中, 可读取各标准曲线的斜率 (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、待测样品的检测值, 单位为 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 。

6. 以 MIX-84 的待测样品检测值为 100%, 计算 MIX-142、MIX-204、MIX-504 的待测样品百分比。

7. 待测样品的 Ct-IPC 均值与 NCS 的 Ct-IPC 均值在 ± 1 个 Ct 值范围内。若样品 Ct-IPC 均值与 NCS Ct-IPC 均值相比明显增大, 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。

8. 无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值 ≥ 35.00 , VIC 信号为有效的“S”型扩增曲线。阴性质控 NCS FAM 信号的 Ct 均值大于标曲最低浓度 FAM 信号 Ct 均值或扩增曲线无明显起峰, VIC 信号为有效的“S”型扩增曲线。

✚ 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: 2023 年 02 月 27 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

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