

**SV40LTA & E1A 残留 DNA**  
**检测试剂盒 (2G)**  
**(多重 PCR-荧光探针法)**  
**说明书**

货号：1403443

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® SV40LTA & E1A 残留 DNA 检测试剂盒 (2G) 用于定量检测生物制品中宿主细胞, 如 HEK 293T 细胞, 来源的 SV40 LTA 和 E1A 残留 DNA 的专用试剂盒。

本试剂盒利用荧光探针原理, 采用多重 qPCR 的方法定量检测样品中 SV40LTA 和 E1A 残留 DNA。检测快速, 专一性强, 性能可靠, 最低检测限可以达到  $10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ 。试剂盒配套有 SV40 LTA & E1A 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, 可准确定量样品中残留的 SV40LTA 和 E1A 微量 DNA。

## ■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
SV40LTA & E1A 线性化 DNA 定量参考品	NNA019	冻干粉, 1 管	-18 °C 及以下
SV40LTA & E1A 非线性化 DNA 定量参考品	NNA020	50 $\mu\text{L}$ $\times$ 1 管	-18 °C 及以下
qPCR Reaction Buffer	NNB001	850 $\mu\text{L}$ $\times$ 2 管	-18 °C 及以下, 避光
SV40LTA & E1A Primer & Probe MIX	NNC030	300 $\mu\text{L}$ $\times$ 1 管	-18 °C 及以下, 避光
IPC MIX	NNC066	150 $\mu\text{L}$ $\times$ 1 管	-18 °C 及以下, 避光
DNA 稀释液	NND001	1.5 mL $\times$ 3 管	-18 °C 及以下

## ■ 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


- 1.5 mL 无菌低吸附离心管
- 96 孔 qPCR 板或八联管
- 1000  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  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
- 1000  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  移液枪

### ❖ SV40LTA & E1A 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

SV40LTA & E1A 线性化 DNA 定量参考品: 将线性化 DNA 定量参考品快速离心 15 s, 准确移取 55  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O 加至管底, 溶解冻干粉, 浓度为 20 ng/ $\mu\text{L}$ 。

 为保证冻干粉充分溶解, 轻弹数下混匀, 短时间快速离心 3-5 s, 如此重复 3 次, 再静置 10 min 后使用。

SV40LTA & E1A 非线性化 DNA 定量参考品浓度为 12 ng/ $\mu\text{L}$ 。


通过如下公式换算成拷贝数, 得到线性化 SV40LTA 的浓度为  $4.67 \times 10^9$  copies/ $\mu\text{L}$ , 线性化 E1A 的浓度为  $4.97 \times 10^9$  copies/ $\mu\text{L}$ ; 非线性化 SV40LTA 的浓度为  $2.80 \times 10^9$  copies/ $\mu\text{L}$ , 非线性化 E1A 的浓度为  $2.98 \times 10^9$  copies/ $\mu\text{L}$ 。

公式:

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

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 SV40LTA & E1A 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 3-5 s, 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 DNA 定量参考品配制标曲。

2. 如使用 SV40LTA & E1A 非线性化 DNA 定量参考品, 则取 7 支干净的 1.5 mL 离心管, 分别标记为 ST、ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5。如使用 SV40LTA & E1A 线性化 DNA 定量参考品, 则取 8 支干净的 1.5 mL 离心管, 分别标记为 ST, ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6。

3. 在 ST 管中用 DNA 稀释液将 SV40LTA & E1A 定量参考品稀释 10 倍, 得到 ST。振荡混匀短时间快速离心 10 s 后, 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 10 s。


4. 在 ST1, ST2, ST3, ST4, ST5 管中分别加入 90  $\mu\text{L}$  DNA 稀释液。


5. 按表 2 依次进行稀释操作。

表 2. SV40LTA &amp; E1A 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度 (copies/ $\mu$ L)			
		非线性化		线性化	
		SV40LTA	E1A	SV40LTA	E1A
ST1	10 $\mu$ L ST0+90 $\mu$ L DNA 稀释液	$2.80 \times 10^6$	$2.98 \times 10^6$	$4.67 \times 10^6$	$4.97 \times 10^6$
ST2	10 $\mu$ L ST1+90 $\mu$ L DNA 稀释液	$2.80 \times 10^5$	$2.98 \times 10^5$	$4.67 \times 10^5$	$4.97 \times 10^5$
ST3	10 $\mu$ L ST2+90 $\mu$ L DNA 稀释液	$2.80 \times 10^4$	$2.98 \times 10^4$	$4.67 \times 10^4$	$4.97 \times 10^4$
ST4	10 $\mu$ L ST3+90 $\mu$ L DNA 稀释液	$2.80 \times 10^3$	$2.98 \times 10^3$	$4.67 \times 10^3$	$4.97 \times 10^3$
ST5	10 $\mu$ L ST4+90 $\mu$ L DNA 稀释液	$2.80 \times 10^2$	$2.98 \times 10^2$	$4.67 \times 10^2$	$4.97 \times 10^2$
ST6	10 $\mu$ L ST5+90 $\mu$ L DNA 稀释液	/	/	$4.67 \times 10^1$	$4.97 \times 10^1$

 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 100  $\mu$ L 样品基质溶液(或 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= (各浓度梯度标准曲线+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:

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

3. 各试剂放在冰上或 2-8 °C 条件下融化, 并根据表 3 所示准备 qPCR MIX:

表 3. qPCR MIX 配制表

组分	单孔反应
qPCR Reaction Buffer	15.9 $\mu$ L
SV40LTA & E1A Primer & Probe MIX	2.8 $\mu$ L
IPC MIX	1.3 $\mu$ L
总体积	20 $\mu$ L

4. 上述各试剂置于冰上，混匀，按表 4 所示加样：

表 4.各反应孔加样示例

标准曲线	20 $\mu$ L qPCR MIX+10 $\mu$ L ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
无模板对照 NTC	20 $\mu$ L qPCR MIX+10 $\mu$ L DNA 稀释液
阴性质控 NCS	20 $\mu$ L qPCR MIX+10 $\mu$ L 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 $\mu$ L qPCR MIX+10 $\mu$ L 待测样品纯化液

✚ 加样完成后每孔总体积为 30  $\mu$ L。

表 5. 96 孔板排版示例

S1	S1	S1										A
S2	S2	S2										B
S3	S3	S3							ST5	ST5	ST5	C
S4	S4	S4							ST4	ST4	ST4	D
S5	S5	S5							ST3	ST3	ST3	E
									ST2	ST2	ST2	F
									ST1	ST1	ST1	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 SV40 LTA & 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 10 s 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“SV40LTA & E1A 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:

选择 FAM 检测通道代表 SV40LTA, 选择 CY5 检测通道代表 E1A。

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 SV40LTA-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 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 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min (读取荧光), 40 个循环; 反应体积 30  $\mu$ L。

## ❖ 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, 例如非线性化 SV40LTA 设为 2.80e+006、2.80e+005、2.80e+004、2.80e+003、2.80e+002 (单位为 copies/ $\mu$ L), 并且在相应的“样本名称”中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。
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/ $\mu$ L。

✧ 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,例如非线性化 SV40LTA 设为 2.80e+006、2.80e+005、2.80e+004、2.80e+003、2.80e+002 (单位为 copies/ $\mu$ L),并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。


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)、R2。

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/ $\mu$ L。

6. 样品的 Ct-IPC 值与 NCS 的 Ct-IPC 值要求在 $\pm 1$ 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,则表明样本可能有抑制。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. SV40LTA 的 NTC 检测均值应不超过 14.32 copies/ $\mu$ L, E1A 的 NTC 检测均值应不超过 17.79 copies/ $\mu$ L,或根据实验室自身验证结果设定具体标准。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: 2023 年 03 月 06 日

## 服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

[www.shenkebio.com](http://www.shenkebio.com)

地址: 浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: [Info@shenkebio.com](mailto:Info@shenkebio.com)

电话: 0572-2165910