

猪源残留 DNA 检测试剂盒
(PCR-荧光探针法)
说明书

货号：1101113

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®猪源残留 DNA 检测试剂盒是用于定量检测各种生物材料（如生物修复膜、生物补片、脱细胞基质等）中猪源 DNA 的专用试剂盒。

本试剂盒利用 PCR 荧光探针法原理，定量检测样品中残留的猪源 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 Porcine DNA 定量参考品。本试剂盒与动物源性生物材料残留 DNA 提取试剂盒（磁珠法）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
Porcine DNA 定量参考品	NNA031	100 μ L×1 管	-18°C及以下
AT qPCR Reaction Buffer	NNB012	850 μ L×2 管	-18°C及以下，避光
Porcine Primer&Probe MIX	NNC043	300 μ L×1 管	-18°C及以下，避光
IPC MIX	NNC066	150 μ L×1 管	-18°C及以下，避光
DNA 稀释液	NND001	1.5 mL×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 实时荧光检测系统
- 7500 Real-Time PCR System

■ 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
- UNG 酶（确定使用前建议验证酶效果）

■ 相关设备

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

■ 操作过程

❖ Porcine DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备




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

1. 将试剂盒中的 Porcine 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 3~5 s, 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 Porcine DNA 定量参考品稀释至 30 ng/ μ L, 振荡混匀后短时间快速离心 3~5 s, 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 90 μ L DNA 稀释液。
5. 按表 2 依次进行 6 次稀释操作。

表 2. Porcine DNA 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度
ST1	10 μ L ST0+90 μ L DNA 稀释液	3 ng/ μ L
ST2	10 μ L ST1+90 μ L DNA 稀释液	300 pg/ μ L
ST3	10 μ L ST2+90 μ L DNA 稀释液	30 pg/ μ L
ST4	10 μ L ST3+90 μ L DNA 稀释液	3 pg/ μ L
ST5	10 μ L ST4+90 μ L DNA 稀释液	300 fg/ μ L
ST6	10 μ L ST5+90 μ L DNA 稀释液	30 fg/ μ L

-  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。

❖ 加样回收质控 ERC 的制备

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

1. 取 100 μ L 样品基质溶液 (或 DNA 稀释液) 加入 1.5 mL 干净的离心管中,
2. 再加入 10 μ L ST1, 混匀, 标记为样品 ERC。

🚦 样品 ERC 和同批待测样品一起进行样品前处理, 制备成样品 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 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 所示准备 qPCR MIX:

表 3. qPCR MIX 配制表

组份	单孔反应
AT qPCR Reaction Buffer	15.9 μL
Porcine Primer&Probe MIX	2.8 μL
IPC MIX	1.3 μL
总体积	20 μL
UNG 酶(可选)	0.1U

❖ 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/ST6
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
待测样品	20 μL qPCR MIX+10 μL 待测样品纯化液
样品 ERC	20 μL qPCR MIX+10 μL 样品 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		ST6	ST6	ST6	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
NCS		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
												G
												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 (ST1~ST6)、1 个无模板对照 NTC、5 个待测样品 (S1~S5) 和每个样品的 ERC (S1 ERC~S5 ERC)、1 个阴性质控样品 NCS。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。

2. 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“猪源残留 DNA”程序。
4. “实验运行”页面中点击“开始”运行程序。

◇ 其他定量 PCR 检测系统程序设置如下:

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, 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, 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: 25°C UNG 酶作用 10 min (可选); 95°C 预变性 10 min; 95°C 15 s, 60°C 40 s (读取荧光), 40 个循环; 反应体积 30 μL 。


✚ 各实验室可根据所用机型设置合理的反应程序。

 若检测体系里加入 UNG 酶，反应程序需要设置一步 25°C UNG 酶作用 10 min。

❖ qPCR 结果分析

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“猪源残留残留 DNA”设为 3000、300、30、3、0.3、0.03，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 pg/μL。

✧ 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 3000、300、30、3、0.3、0.03（含义为每孔的模板浓度，单位为 pg/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 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、S5，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）、R²。

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 pg/μL。

6. 分析 IPC 的 Ct 值，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。

7. 阴性质控 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。

8. 无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值≥35，或根据实验室自身验证结果设定具体标准。

 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 01 月 16 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