

MDCK 残留 DNA 检测试剂盒
(PCR-荧光探针法)
说明书

货号：SK030209M100

版本：A/3

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 检测试剂盒用于定量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 的专用试剂盒。

本试剂盒利用荧光探针原理, 定量检测样品中 MDCK 残留 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 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, 可准确定量样品中 MDCK 残留 DNA。

■ 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 2 管	-18 $^{\circ}$ C及以下, 避光
MDCK Primer&Probe MIX	NNC024	300 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

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
- StepOne Plus Real-Time PCR System
- CFX96 定量 PCR 系统
- LineGene 9600 定量 PCR 系统
- Mx3000PTM 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
- 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

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

1. 将试剂盒中的 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 3-5 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 DNA 定量参考品稀释至 3 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 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 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	10 μL ST0+90 μL DNA 稀释液	300 $\text{pg}/\mu\text{L}$
ST2	10 μL ST1+90 μL DNA 稀释液	30 $\text{pg}/\mu\text{L}$
ST3	10 μL ST2+90 μL DNA 稀释液	3 $\text{pg}/\mu\text{L}$
ST4	10 μL ST3+90 μL DNA 稀释液	300 $\text{fg}/\mu\text{L}$
ST5	10 μL ST4+90 μL DNA 稀释液	30 $\text{fg}/\mu\text{L}$
ST6	10 μL ST5+90 μL DNA 稀释液	3 $\text{fg}/\mu\text{L}$

- ✚ 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。

❖ 加样回收质控 ERC 的制备

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


1. 取 100 μL 待测样品加入 1.5 mL 干净的离心管中。
2. 再加入 10 μL ST3, 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 $\times 2$) $\times 3$

 待测样品 $\times 2$ 是因为我们推荐每个待测样品检测时都应同时做样品 ERC。

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	17 μL
MDCK Primer&Probe MIX	3 μL
总体积	20 μL

❖ 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 μ L qPCR MIX + 10 μ L ST1/ST2/ST3/ST4/ST5/ST6
NTC	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L DNA 稀释液
NCS	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L 待测样品纯化液
样品 ERC	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L 样品 ERC 纯化液

✚ 加样完成后每孔总体积为 30 μ L。

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
		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
NCS												G
												H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

✚ 该示例表示的是检测 6 个浓度梯度的 DNA 标准曲线 (ST1-ST6)、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、5 个待测样品 (S1-S5) 和每个样品的 ERC (S1 ERC-S5 ERC)。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“MDCK 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 MDCK-DNA, 选择报告荧光基团为 FAM, 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 μL 。

❖ 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“MDCK 残留 DNA”设为 300、30、3、0.3、0.03、0.003, 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 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 。

✧ 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 3000、300、30、3、0.3、0.03 (含义为每孔的 DNA 总量, 单位为 pg), 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、样品 ERC 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、ERC, 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、待测样品、样品 ERC 的检测值, 单位为 $\text{pg}/10 \mu\text{L}$ 。后续可在检测报告中将单位

换算为 pg/ μ L 或 pg/mL。

6. 根据待测样品和样品 ERC 的检测结果计算加样回收率，加样回收率要求在 50%-150%之间。

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 \geq 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 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