

# HEK293 残留 DNA 片段分析检测试剂盒

## (PCR-荧光探针法)

### 说明书

货号：1103176

在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意点！

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® HEK293 残留 DNA 片段分析检测试剂盒（PCR-荧光探针法）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 HEK293 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（75bp、122bp、244bp、562bp）来定量检测分析样品中 HEK293 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 HEK293 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。

该试剂盒仅供研究使用，不可用于临床。

## ■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

序号	组分	产品号	装量	储存条件
I	HEK293 Primer&Probe MIX-75	NNC012	300 $\mu$ L $\times$ 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下，避光
	HEK293 Primer&Probe MIX-122	NNC013	300 $\mu$ L $\times$ 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下，避光
	HEK293 Primer&Probe MIX-244	NNC014	300 $\mu$ L $\times$ 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下，避光
	HEK293 Primer&Probe MIX-562	NNC015	300 $\mu$ L $\times$ 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下，避光
	qPCR Reaction Buffer	NNB001	850 $\mu$ L $\times$ 8 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下，避光
	IPC MIX	NNC069	550 $\mu$ L $\times$ 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下，避光
II	DNA 稀释液	NND001	1.5 mL $\times$ 3 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下
	HEK293 DNA 定量参考品	NNA005	50 $\mu$ L $\times$ 1 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
- CFX96 定量 PCR 系统

- FQD-96A 定量 PCR 系统

## ■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 1.5 mL 低吸附无菌离心管
- 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

- 荧光定量 PCR 仪
- 1000  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  移液枪

## ■ 实验操作流程

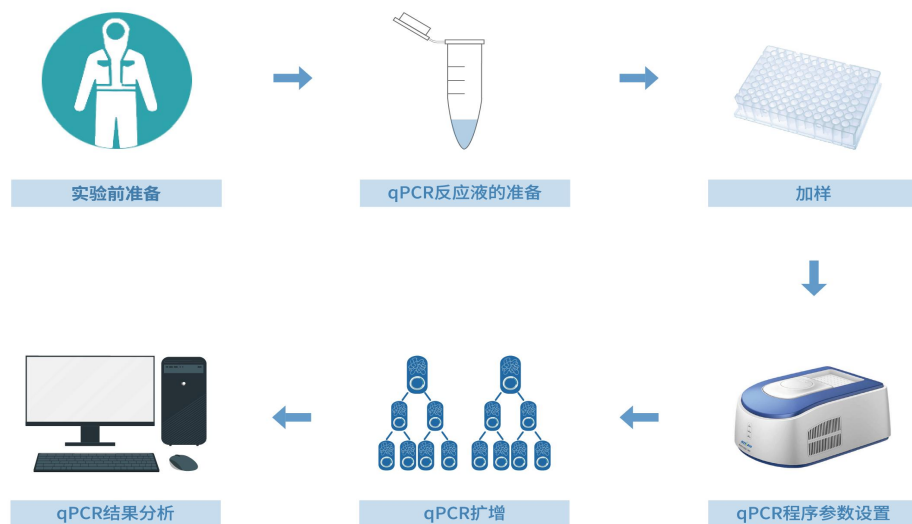


图 1 操作流程示意图

## 一、试剂、仪器准备

### (一) 实验前准备:

1. 穿戴无 DNA 污染的工作服、一次性乳胶手套、一次性无纺布帽子。
2. 工作台面、移液枪及离心管架紫外照射 30 分钟，喷洒 75%酒精并擦干。
3. 将试剂盒从冰箱-18  $^{\circ}\text{C}$ 以下区域转移至 **2-8  $^{\circ}\text{C}$ 区域或冰上融化**，涡旋振荡混匀并瞬时离心。

**(二) qPCR 反应液准备:**

1. 反应孔数计算: 根据检测样品的数量, 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

2. MIX 总量计算: 根据反应孔数计算所需 MIX 总量。

MIX 总量 = (反应孔数 + 2) × 20 μL (含有 2 孔的损失量)

3. qPCR MIX 配制: 根据表 2、3、4、5 所示准备对应扩增片段的 qPCR MIX。

备注: 为满足同步进行四种扩增片段检测, DNA 模板需 ≥ 120 μL, 建议每个样品同时准备 2 管进行前处理, 提取完成后混匀使用。

表 2. qPCR MIX-75 配制表

组分	单孔用量
qPCR Reaction Buffer	15.9 μL
Primer&Probe MIX-75	2.8 μL
IPC MIX	1.3 μL
总体积	20 μL

表 3. qPCR MIX-122 配制表

组分	单孔用量
qPCR Reaction Buffer	15.9 μL
Primer&Probe MIX-122	2.8 μL
IPC MIX	1.3 μL
总体积	20 μL

表 4. qPCR MIX-244 配制表

组分	单孔用量
qPCR Reaction Buffer	15.9 $\mu\text{L}$
Primer&Probe MIX-244	2.8 $\mu\text{L}$
IPC MIX	1.3 $\mu\text{L}$
总体积	20 $\mu\text{L}$

表 5. qPCR MIX-562 配制表

组分	单孔用量
qPCR Reaction Buffer	15.9 $\mu\text{L}$
Primer&Probe MIX-562	2.8 $\mu\text{L}$
IPC MIX	1.3 $\mu\text{L}$
总体积	20 $\mu\text{L}$

## 二、样品准备

### ● HEK293 DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

**HEK293 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。**

备注：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。

用试剂盒中提供的 DNA 稀释液将定量参考品进行稀释，具体操作如下：

1. 将试剂盒中的 HEK293 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 秒，如此重复 3 次。
2. 取 6 支干净的 1.5 mL 离心管，分别标记为 ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5。
3. 在 ST0 管中用 DNA 稀释液将 HEK293 DNA 定量参考品稀释至 3ng/ $\mu\text{L}$ ，振荡混匀后短时间快速离心 3~5 秒，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 管中分别加入 180 $\mu$ L DNA 稀释液。
5. 按表 6 依次进行 5 次稀释操作。

表 6. HEK293 DNA 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度
ST1	20 $\mu$ L ST0 + 180 $\mu$ L DNA 稀释液	300 pg/ $\mu$ L
ST2	20 $\mu$ L ST1 + 180 $\mu$ L DNA 稀释液	30 pg/ $\mu$ L
ST3	20 $\mu$ L ST2 + 180 $\mu$ L DNA 稀释液	3 pg/ $\mu$ L
ST4	20 $\mu$ L ST3 + 180 $\mu$ L DNA 稀释液	300 fg/ $\mu$ L
ST5	20 $\mu$ L ST4 + 180 $\mu$ L DNA 稀释液	30 fg/ $\mu$ L

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

若 DNA 稀释液中有析出, 建议于 37  $^{\circ}$ 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。

#### ● 阴性对照 (NCS)

1. 取 100  $\mu$ L DNA 稀释液加入 1.5 mL 干净的离心管中, 标记为阴性质控 NCS。

备注: 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。

### 三、操作步骤

#### (一) 加样

1. 各试剂置于冰上, 轻微振荡混匀, 参考表 7、8、9、10、11 所示加样:

表 7. MIX-75 各反应孔加样示例

各样品	加样量
ST-75	20 $\mu$ L qPCR MIX-75 + 10 $\mu$ L ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	20 $\mu$ L qPCR MIX-75 + 10 $\mu$ L DNA 稀释液
NCS	20 $\mu$ L qPCR MIX-75 + 10 $\mu$ L 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 $\mu$ L qPCR MIX-75 + 10 $\mu$ L 待测样品纯化液

表 8. MIX-122 各反应孔加样示例

各样品	加样量
ST-122	20 $\mu$ L qPCR MIX-122 + 10 $\mu$ L ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	20 $\mu$ L qPCR MIX-122 + 10 $\mu$ L DNA 稀释液
NCS	20 $\mu$ L qPCR MIX-122 + 10 $\mu$ L 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 $\mu$ L qPCR MIX-122 + 10 $\mu$ L 待测样品纯化液

表 9. MIX-244 各反应孔加样示例

各样品	加样量
ST-244	20 $\mu$ L qPCR MIX-244 + 10 $\mu$ L ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	20 $\mu$ L qPCR MIX-244 + 10 $\mu$ L DNA 稀释液
NCS	20 $\mu$ L qPCR MIX-244 + 10 $\mu$ L 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 $\mu$ L qPCR MIX-244 + 10 $\mu$ L 待测样品纯化液

表 10. MIX-562 各反应孔加样示例

各样品	加样量
ST-562	20 $\mu$ L qPCR MIX-562 + 10 $\mu$ L ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	20 $\mu$ L qPCR MIX-562 + 10 $\mu$ L DNA 稀释液
NCS	20 $\mu$ L qPCR MIX-562 + 10 $\mu$ L 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 $\mu$ L qPCR MIX-562 + 10 $\mu$ L 待测样品纯化液

表 11. 96 孔板排版示例

MIX-75			MIX-122			MIX-244			MIX-562			
NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	A
NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	B
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	C
ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	D
ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	E
ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	F
ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	G
ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	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、1个阴性质控NCS、1个待测样品。每个检测做3个重复孔。其中1~3列为qPCR MIX-75, 4~6列为qPCR MIX-122, 7~9列为qPCR MIX-244, 10~12列为qPCR MIX-562。

✧ 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, 轻微振荡混匀, 短时间快速离心10秒后放入qPCR仪。

## (二) 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 HEK293-75 反应孔, 选择步骤 2 项目中的“HEK293 SIZE-75bp”程序; 选择检测 HEK293-122 反应孔, 选择步骤 2 项目中的“HEK293 SIZE-122bp”程序; 选择检测 HEK293-244 反应孔, 选择步骤 2 项目中的“HEK293 SIZE-244bp”程序; 选择检测 HEK293-562 反应孔, 选择步骤 2 项目中的“HEK293 SIZE-562bp”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:

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 HEK293-75、HEK293-122、HEK293-244、HEK293-562, 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 分钟;**

**95 °C 15 秒, 60 °C 30 秒, 72 °C 1 分 30 秒 (读取荧光), 40 个循环;**  
反应体积 30 $\mu$ L。


各实验室可根据所用机型设置合理的反应程序。



## 四、结果计算与判断

### (一) 结果计算

- 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。“HEK293 SIZE-75bp、HEK293 SIZE-122bp、HEK293 SIZE-2445bp 和 HEK293 SIZE-562bp”设为 300、30、3、0.3、0.03, 并在相应的“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 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, HEK293-75 将 Threshold 设置为 0.04, HEK293-122、HEK293-244、HEK293-562 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 (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。
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、S, 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 pg/μL。

6. 以 MIX-75 的待测样品检测值为 100%，计算 MIX-122、MIX-244、MIX-562 的待测样品百分比。

## (二) 结果判断

1. 分析 IPC 的 Ct 均值，正常情况下样品 Ct-IPC 均值应在 NCS Ct-IPC 均值  $\pm 1.0$  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。
2. 阴性质控 NCS、无模板对照 NTC FAM 信号的 Ct 值应大于标曲最低浓度 FAM 信号 Ct 值。

✚ 上述示例结果分析的参数设置仅供参考，具体需依据实验室的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 07 月 05 日

生效日期: 2023 年 07 月 14 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