

PG13 残留 DNA 检测试剂盒

(PCR-荧光探针法)

说明书

货号：1101123

在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意

版本：A/0

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® PG13 残留 DNA 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 PG13 宿主细胞 DNA 的专用试剂盒。

本试剂盒利用 PCR 荧光探针法原理，定量检测分析样品中 PG13 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 PG13 DNA 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 PG13 残留 DNA。

该试剂盒仅供研究使用，不可用于诊断。

■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
PG13 DNA 定量参考品	NNA049	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
PG13 Primer & Probe MIX	NNC101	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
- 7500 Real-Time PCR System
- LightCycler 480 II

■ 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

■ 实验操作流程

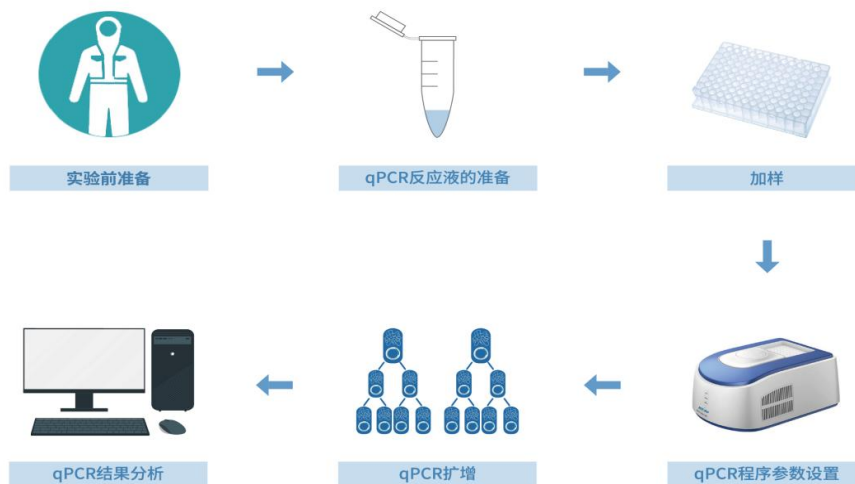


图 1 操作流程示意图

一、试剂、仪器准备

(一) 实验前准备:

1. 穿戴适当的工作及防护服, 至少穿戴无 DNA 污染的工作服、一次性反穿衣、一次性乳胶手套、一次性无纺布帽子和医用口罩。
2. 工作区及环境采取适当的消毒, 消残留核酸措施。至少工作台面、移液枪、枪头、八联管及管盖、离心管及离心管架紫外照射时长不少于 1 小时, 使用核酸清除剂、75%酒精全面擦拭消毒。
3. 将试剂盒从冰箱-18 °C 以下区域转移至 2-8 °C 区域融化, 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= (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 +阳性质控 PCS+待测样品×2) × 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: 将各试剂根据表 2 所示准备 qPCR MIX:

表 2. qPCR MIX 配制表

组分	单孔用量
qPCR Reaction Buffer	17 μL
PG13 Primer & Probe MIX	3 μL
总体积	20 μL

二、样品准备

● PG13 DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

PG13 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 稀释液将定量参考品进行稀释, 具体操作如下:

1. 将试剂盒中的 PG13 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. 根据 PG13 DNA 定量参考品标签上标注的浓度, 在 ST0 管中用 DNA 稀释液将 PG13 DNA 定量参考品稀释至 3 ng/μL, 振荡混匀后短时间快速离心 3-5 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 3 依次进行 6 次稀释操作。

表 3. PG13 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 pg/μL
ST2	10 μL ST1 + 90 μL DNA 稀释液	30 pg/μL
ST3	10 μL ST2 + 90 μL DNA 稀释液	3 pg/μL
ST4	10 μL ST3 + 90 μL DNA 稀释液	300 fg/μL
ST5	10 μL ST4 + 90 μL DNA 稀释液	30 fg/μL
ST6	10 μL ST5 + 90 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 °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。

●待测样品加标回收质控 (ERC)

根据需要设置待测样品 ERC 中的 PG13 DNA 加标浓度(以制备加 30 pg PG13 DNA 量的样品 ERC 为例), 具体操作如下:

1. 取 100 μ L 待测样品加入 1.5 mL 干净的离心管中。
2. 再加入 10 μ L ST3, 混匀, 标记为待测样品 ERC。

备注: 待测样品 ERC 和同批待测样品一起进行样品前处理, 制备成待测样品 ERC 纯化液。

●前处理阳性质控样品 (PCS)

根据需要设置 PCS (以制备加 30 pg PG13 DNA 量的 PCS 为例), 具体操作如下:

1. 取 100 μ L DNA 稀释液加入 1.5 mL 干净的离心管中。
2. 再加入 10 μ L ST3, 混匀, 标记为 PCS。

备注: PCS 和同批待测样品一起进行样品前处理, 制备 PCS 纯化液。

●前处理阴性质控样品 (NCS)

1. 取 100 μ L DNA 稀释液加入 1.5 mL 干净的离心管中, 标记为 NCS。

备注: NCS 和同批待测样品一起进行样品前处理, 制备 NCS 纯化液。

三、操作步骤

(一) 加样

1. 各试剂置于冰上或 2-8 °C 条件, 轻微振荡混匀参考表 4 所示加样:

表 4. 各反应孔加样示例

各样品	加样量
标准曲线	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L ST1/ST2/ST3/ST4/ST5/ST6
无模板对照 NTC	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L DNA 稀释液
阴性质控 NCS	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L 阴性质控 NCS 纯化液
阳性质控 PCS	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L 阳性质控 PCS 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 待测样品 ERC 纯化液

表 5.96 孔板排版示例

ST6	ST6	ST6		S1	S1	S1	S1 ERC	S1 ERC	S1 ERC		NCS	A
ST5	ST5	ST5		S2	S2	S2	S2 ERC	S2 ERC	S2 ERC		NCS	B
ST4	ST4	ST4		S3	S3	S3	S3 ERC	S3 ERC	S3 ERC		NCS	C
ST3	ST3	ST3		S4	S4	S4	S4 ERC	S4 ERC	S4 ERC			D
ST2	ST2	ST2		S5	S5	S5	S5 ERC	S5 ERC	S5 ERC		NTC	E
ST1	ST1	ST1									NTC	F
											NTC	G
				PCS	PCS	PCS						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 个阴性质控样品 NCS、1 个阳性质控样品 PCS、5 个待测样品 (S1-S5) 及其对应的样品 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。

(二) qPCR 程序设置

将八联管用管盖封闭, 轻微震荡混匀, 短时间快速离心 10 秒后放入 qPCR 仪, 接着进行 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“PG13 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 PG13-DNA, 选择报告荧光基团为 FAM, 猝灭荧光基团为 none (如有); 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。

四、结果计算与判断

(一) 结果计算

- 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, 将标准曲线孔的样品类型一栏设置为标准品, 并且在样品赋值一栏分别赋值为 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), 并且在相应的样品名称一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。
 2. 在孔板编辑面板中, 将无模板对照 NTC 孔的样品类型一栏设置为无模板对照, 将阴性质控 NCS 孔、阳性质控 PCS 孔、待测样品孔的样品类型一栏设置为待测样品, 并且在相应的样品名称一栏中命名为 NTC、NCS、PCS、S1、S2、S3、S4、S5、S1ERC、S2ERC、S3ERC、S4ERC、S5ERC。
 3. 在“实验分析”页面点击 , 可读取各标准曲线的斜率、截距、相关系数和扩增效率。
 4. 在“反应孔信息表中”可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、阳性质控 PCS、待测样品、待测样品 ERC 的检测值, 单位为 pg/ μ L。
- 以 7500 Real-Time PCR System、软件版本 2.4 为例。
 1. 在 Setup 的 Plate Setup 面板的 Define Targets and Samples 模块和 Assign Targets and Samples 模块中, 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。
 2. 在 Setup 的 Plate Setup 面板的 Define Targets and Samples 模块和 Assign Targets and Samples 模块中, 将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC, 将阴性质控 NCS 孔、阳性质控 PCS 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、PCS、S1、S2、S3、S4、S5、S1ERC、S2ERC、S3ERC、S4ERC、S5ERC。
 3. 在 Analysis 的 Amplification Plot 面板中, 将 Threshold 设置为 **0.02**, Auto Baseline, 点击 Analyze。
 4. 在 Analysis 的 Standard Curve 面板中, 可读取各标准曲线的斜率 (Slope)、截距 (Inter)、 R^2 。
 5. 在 Analysis 的 View Well Table 面板中, Quantity 和 Quantity Mean 一栏可

读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、阳性质控 PCS、待测样品、待测样品 ERC 的检测值，单位为 pg/ μ L。

(二) 结果判断

1. 分析加标回收率 (ERC)：一般要求 ERC 达到 50%~150%，若 ERC 偏低，则表明 DNA 的提取过程受到显著抑制，需要优化样品处理方案。此外，具体样品的 DNA 加标量设定在其无加标测试值的 2-10 倍为宜，若比值与推荐值相比偏离较大，则表明加标量不合理，建议调整加标量。
 2. 阴性质控 NCS 的 Ct 均值应大于标曲最低浓度 Ct 均值或扩增曲线无明显起峰，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。
 3. 无模板对照 NTC 的检测结果应为未检出或 Ct 值 \geq 35.00，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。

生效日期：2023 年 08 月 30 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