

E1B 残留 DNA 检测试剂盒

(PCR-荧光探针法)

说明书

货号：1101110

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® E1B 残留 DNA 检测试剂盒用于定量检测生物制品中宿主细胞, HEK293 和衍生细胞系 (如 293T、293F 等) 的 E1B 残留 DNA 的专用试剂盒。

本试剂盒利用荧光探针原理, 采用 qPCR 的方法定量检测样品中 E1B 残留 DNA。检测快速, 专一性强, 性能可靠。试剂盒配套有 E1B 线性化定量参考品, 供客户针对自己的线性化样品进行检测。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微量 E1B DNA。

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

组分	产品号	装量	储存条件
E1B 线性化 DNA 定量参考品	NNA014	冻干粉, 1 管	-18 °C 及以下
E1B Primer&Probe MIX	NNC034	300µL × 1 管	-18 °C 及以下, 避光
qPCR Reaction Buffer	NNB002	850 µL × 2 管	-18 °C 及以下, 避光
DNA 稀释液	NND001	1.5 mL × 3 管	-18 °C 及以下
IPC MIX	NNC066	150 µL × 1 管	-18 °C 及以下, 避光

■ 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 (包括但不限于以下机型, 使用前需验证检测灵敏度)

- SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统
- 7500 Real-Time PCR System
- CFX96 定量 PCR 系统
- qTOWER3G 定量 PCR 系统
- LightCycler480 定量 PCR 系统

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 1.5ml 无菌低吸附离心管
- 96 孔 qPCR 板或八联管

- 1000 μL , 100 μL , 10 μL 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

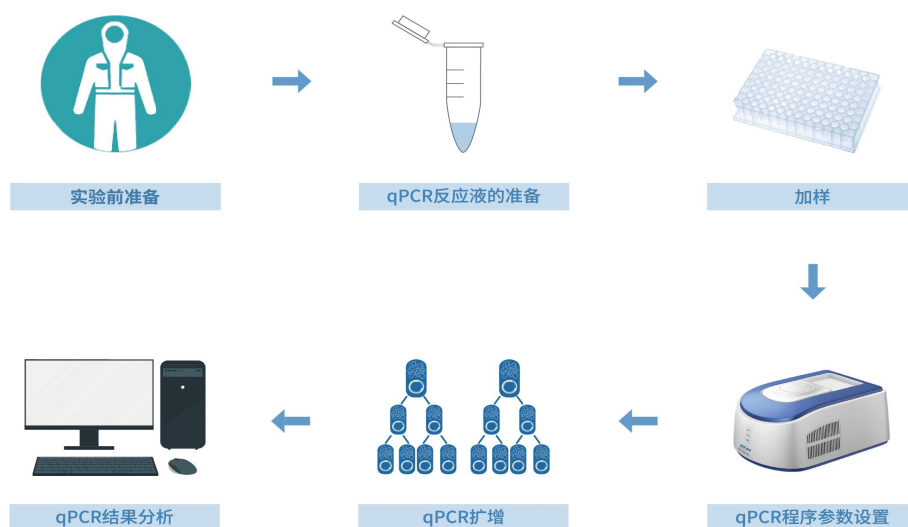


图 1 操作流程示意图

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. 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) × 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 配制表准备各试剂 qPCR MIX 用量。

表 2. qPCR MIX 配制表

组分	单孔用量
qPCR Reaction Buffer	15.9 μL
E1B Primer&Probe MIX	2.8 μL
IPC MIX	1.3 μL
总体积	20 μL

二、样品准备**● E1B 线性化 DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备**

E1B 线性化 DNA 定量参考品: 将 E1B 线性化 DNA 定量参考品快速离心 15 秒, 准确移取 55 μL ddH₂O 加至管底, 溶解冻干粉。

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

定量参考品浓度标注于管壁标签, 请确认后再进行稀释。

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. 将复溶后的 E1B 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 秒, 如此重复 3 次。
2. 取 8 支干净的 1.5mL 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 E1B 线性化 DNA 定量参考品稀释至 4.34×10^8 copies/μL, 得到 ST, 振荡混匀短时间快速离心 3-5 秒, 重复 3 次。

4. 每管中分别加入 90 μ L DNA 稀释液。
5. 按表 3 依次进行稀释操作。

表 3. E1B 线性化 DNA 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度 (copies/ μ L)
ST0	10 μ L ST + 90 μ L DNA 稀释液	4.34×10^7
ST1	10 μ L ST0 + 90 μ L DNA 稀释液	4.34×10^6
ST2	10 μ L ST1 + 90 μ L DNA 稀释液	4.34×10^5
ST3	10 μ L ST2 + 90 μ L DNA 稀释液	4.34×10^4
ST4	10 μ L ST3 + 90 μ L DNA 稀释液	4.34×10^3
ST5	10 μ L ST4 + 90 μ L DNA 稀释液	4.34×10^2
ST6	10 μ L ST5 + 90 μ L DNA 稀释液	4.34×10^1

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

1. 取 100 μ 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. 上述各试剂置于冰上, 轻微震荡混匀, 按表 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
NTC	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L DNA 稀释液
NCS	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L NCS 纯化液
待测样品	20 μ L qPCR MIX + 10 μ L 待测样品纯化液

表 5.96 孔板排版示例

NCS			S1	S1	S1							A
NCS			S2	S2	S2							B
NCS			S3	S3	S3				ST6	ST6	ST6	C
NTC			S4	S4	S4				ST5	ST5	ST5	D
NTC			S5	S5	S5				ST4	ST4	ST4	E
NTC									ST3	ST3	ST3	F
									ST2	ST2	ST2	G
									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 6 个浓度梯度的 E1B 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）。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 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”页面中选择步骤 1：选择反应孔。
3. 选择步骤 2：选择项目中的“E1B 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 E1B-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 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 分钟；

95°C 15 秒，60°C 1 分钟（读取荧光），40 个循环；反应体积 30μL。

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, 并在标品赋值中分别根据表 2 赋值, 例如“E1B 残留 DNA”设为 $4.34e+006$ 、 $4.34e+005$ 、 $4.34e+004$ 、 $4.34e+003$ 、 $4.34e+002$ 、 $4.34e+001$ (单位为 copies/ μ L), 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 copies/ μ 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, 设为 $4.34e+006$ 、 $4.34e+005$ 、 $4.34e+004$ 、 $4.34e+003$ 、 $4.34e+002$ 、 $4.34e+001$ (单位为 copies/ μ L), 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 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)、 R^2 。
 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/ μ L。

（二）结果判断

1. 样品的 Ct-IPC 值与 NCS 的 Ct-IPC 值要求在±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. NTC 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值 ≥ 35 。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。
- ✚ 结果分析的参数设置需依据具体的机型及使用的软件版本，一般也可由仪器自动判读。

修订日期：2023 年 06 月 19 日

生效日期：2023 年 06 月 21 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