

MRC-5 残留 DNA 检测试剂盒

(PCR-荧光探针法)

说明书

货号：1101124

在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意点和常见问题！

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® MRC-5 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 MRC-5 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 MRC-5 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 MRC-5 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 MRC-5 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
MRC-5 DNA 定量参考品	NNA062	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
MRC-5 Primer & Probe MIX	NNC118	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
- 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 无菌 DNase/RNase-free 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

■ 实验操作流程

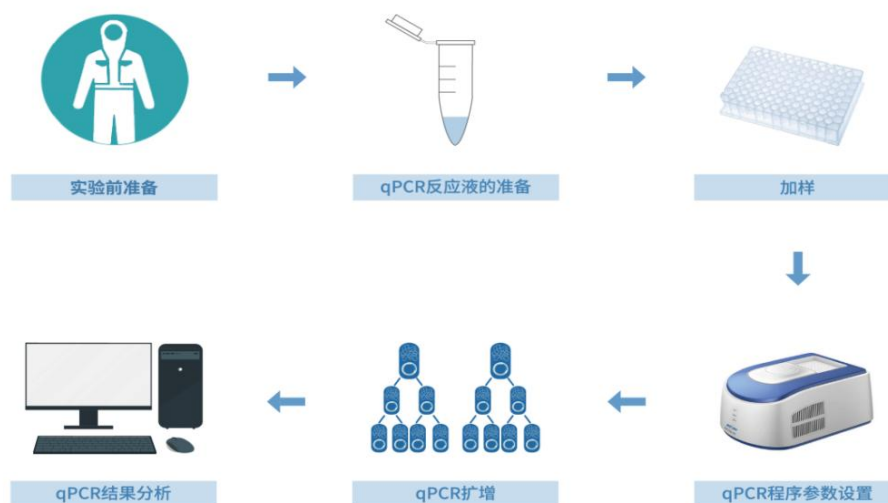


图 1 操作流程示意图

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。

$$\text{反应孔数} = (\text{5 个浓度梯度的标准曲线} + \text{1 个无模板对照 NTC} + \text{1 个阴性质控 NCS} + \text{待测样品} \times 2) \times 3$$

待测样品×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. MIX 总量计算: 根据反应孔数计算所需 MIX 总量。

$$\text{MIX 总量} = (\text{反应孔数} + 2) \times 20 \mu\text{L} \text{ (含有 2 孔的损失量)}$$

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	单孔反应
qPCR Reaction Buffer	17 μL
MRC-5 Primer & Probe MIX	3 μL
总体积	20 μL

二、样品准备

● MRC-5 DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

● MRC-5 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 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 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 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 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 90 μL DNA 稀释液。
5. 按表 3 依次进行 5 次稀释操作。

表 3. MRC-5 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	300 pg/ μ L
ST2	10 μ L ST1 + 90 μ L DNA 稀释液	30 pg/ μ L
ST3	10 μ L ST2 + 90 μ L DNA 稀释液	3 pg/ μ L
ST4	10 μ L ST3 + 90 μ L DNA 稀释液	300 fg/ μ L
ST5	10 μ L ST4 + 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 $^{\circ}$ 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。

● 加标回收 (ERC)

根据需要设置 ERC 中的 MRC-5 DNA 加样浓度(以制备加 30 pg MRC-5 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，标记为样品 ERC。

备注：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。

● 阴性对照 (NCS)

根据实验设置阴性质控，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，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
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

表 5. 96 孔板排版示例

NTC		S1	S1	S1	S1 ERC	S1 ERC	S1 ERC					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 5 个浓度梯度的 DNA 标准曲线（ST1-ST5）、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 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“MRC-5 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 MRC-5-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 分钟;
 - 95 °C 15 秒, 60 °C 1 分钟 (读取荧光), 40 个循环; 反应体积 30 μ L。


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“MRC-5 残留 DNA”设为 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。
 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 (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。

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 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 或 pg/mL 。

(二) 结果判断

1. 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。
 2. 无模板对照 NTC 的检测结果为其均值不超过 $6 \text{ fg}/\mu\text{L}$, 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 11 月 06 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: 400-878-2189