

Sf9&AcNPV 残留 DNA 检测试剂盒

（多重 PCR-荧光探针法）

说明书

货号：1101101

在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意点！

版本：A/5

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® Sf9&AcNPV 残留 DNA 检测试剂盒（多重 PCR-荧光探针法）用于定量检测昆虫细胞（Sf9）杆状病毒表达系统来源的基因工程疫苗中残留的 Sf9 细胞 DNA 和杆状病毒（AcNPV）DNA 的专用试剂盒。

本试剂盒利用 Taqman 探针原理，采用多重 qPCR 的方法定量检测样品中 Sf9 和 AcNPV 残留 DNA。检测快速，专一性强，性能可靠，最低检测限可以达到 50 copies/反应。试剂盒配套有 Sf9&AcNPV 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，可准确定量样品中残留的 Sf9&AcNPV 微量 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
Sf9&AcNPV DNA 定量参考品	NNA051	冻干粉，1 管	-18 °C及以下
qPCR Reaction Buffer	NNB001	850 μL × 2 管	-18 °C及以下，避光
Sf9&AcNPV Primer&Probe MIX	NNC059	300 μL × 1 管	-18 °C及以下，避光
IPC MIX	NNC067	150 μL × 1 管	-18 °C及以下，避光
DNA 稀释液	NND001	1.5 mL × 3 管	-18 °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
- 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

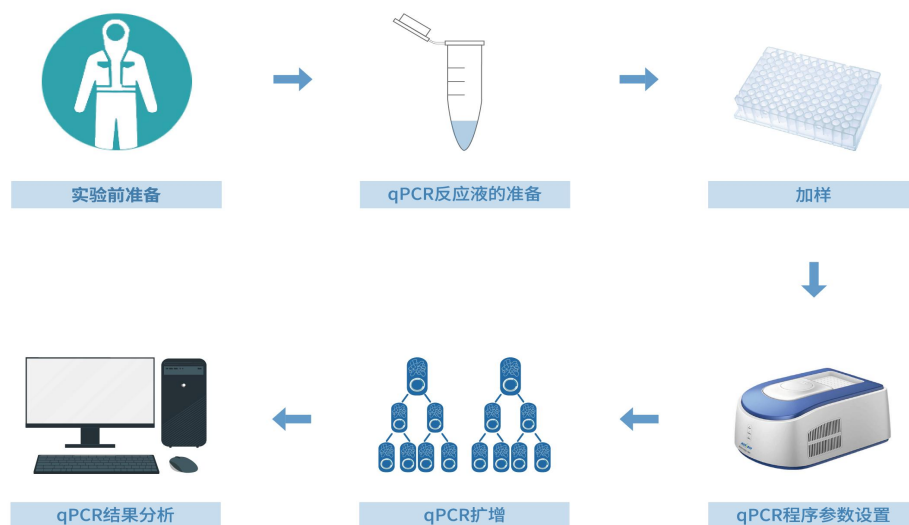


图 1 操作流程示意图

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
Sf9&AcNPV Primer&Probe MIX	2.8 μL
IPC MIX	1.3 μL
总体积	20 μL

二、样品准备

● Sf9&AcNPV DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

定量参考品浓度标注于管壁标签。其中 Sf9 DNA 浓度为 30 ng/μL； AcNPV DNA 浓度为 2 ng/μL，换算成拷贝数为 5.14×10⁸ copies /μL。

将定量参考品快速离心 15 秒，准确移取 55 μLddH₂O 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。

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 Sf9&AcNPV 定量参考品和 DNA 稀释液置于冰上或 2-8 °C 条件下融化后。轻弹数下混匀，短时间快速离心 3 - 5 秒，如此重复 3 次。
- 2.取 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 Sf9&AcNPV 定量参考品稀释 10 倍，得到 ST0，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，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. Sf9&AcNPV 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	Sf9 (pg /μL)	AcNPV (copies /μL) *	AcNPV (pg /μL) *
ST1	10 μL ST0 + 90 μL DNA 稀释液	300	5.14 × 10 ⁶	20
ST2	10 μL ST1 + 90 μL DNA 稀释液	30	5.14 × 10 ⁵	2
ST3	10 μL ST2 + 90 μL DNA 稀释液	3	5.14× 10 ⁴	0.2
ST4	10 μL ST3 + 90 μL DNA 稀释液	0.3	5.14× 10 ³	0.02
ST5	10 μL ST4 + 90 μL DNA 稀释液	0.03	5.14 × 10 ²	0.002
ST6	10 μL ST5 + 90 μL DNA 稀释液	0.003	5.14 × 10 ¹	0.0002

已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于 2-8 ℃。

若 DNA 稀释液中有析出，建议于 37 ℃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。

*对于 AcNPV DNA，客户可选择拷贝数浓度或质量浓度作为标曲赋值。

● 阴性对照（NCS）

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。

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，轻微震荡混匀，按表 4 所示加样：
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。

表 4.各反应孔加样示例

各样品	加样量
标准曲线	20 μL qPCR MIX + 10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ ST5/ST6
NTC	20 μL qPCR MIX + 10 μL DNA 稀释液
NCS	20 μL qPCR MIX + 10 μL 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 μL qPCR MIX + 10 μL 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 Sf9&AcNPV 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。

(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”，“基本设置”中设置实验信息。
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“Sf9&AcNPV 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 Sf9-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 AcNPV-DNA，选择报告荧光基团为 CY5，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。

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“通道 1 目标 Sf9-DNA”中标品赋值设为 300、30、3、0.3、0.03、0.003，“通道 4 目标：AcNPV-DNA”中标品赋值设为（以拷贝数浓度为例） 5.14×10^6 、 5.14×10^5 、 5.14×10^4 、 5.14×10^3 、 5.14×10^2 、 5.14×10^1 ，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 pg/μL。

- 以 **7500 Real-Time PCR System**、软件版本 1.4 为例：

选择 FAM 检测通道代表 Sf9，同样选择 CY5 通道代表 AcNPV。

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，例如 Sf9 设为 300、30、3、0.3、0.03、0.003（单位为 pg /μL），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。

（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 值于 NCS 的 Ct-IPC 值相比明显增大，则表明样品可能有抑制。建议同时测试加标样品，优先考虑样品回收率结果，IPC 结果作为参考。
 2. 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。
 3. 无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值 ≥ 35 。
- ✚ 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 11 月 09 日

生效日期：2023 年 11 月 10 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