

Hi5&AcNPV 残留 DNA 检测试剂盒

（多重 PCR-荧光探针法）

说明书

货号：1101102

在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意点！

版本：A/3

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® Hi5&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(High Five)杆状病毒表达系统来源的基因工程疫苗中残留的 Hi5 细胞 DNA 和杆状病毒（AcNPV）DNA 的专用试剂盒。

本试剂盒利用荧光探针原理，采用多重 qPCR 的方法定量检测样品中 Hi5 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 Hi5&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 Hi5&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
Hi5&AcNPV DNA 定量参考品	NNA034	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
Hi5&AcNPV Primer&Probe MIX	NNC038	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 无菌低吸附有滤芯枪头

■ 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

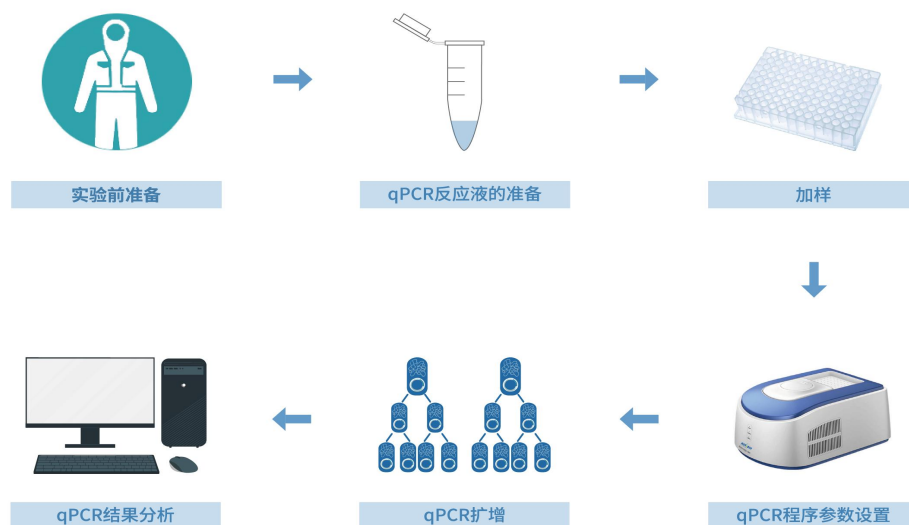


图 1 操作流程示意图

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 = (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 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
Hi5&AcNPV Primer&Probe MIX	2.8 μL
IPC MIX	1.3 μL
总体积	20 μL

二、样品准备**● Hi5&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 Hi5 DNA 浓度为 30 ng/μL; AcNPV DNA 浓度为 2 ng/μL, 换算成拷贝数为 5.14×10^8 copies /μL。

将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。

用试剂盒中提供的 DNA 稀释液将定量参考品进行梯度稀释, 具体操作如下:

1. 将试剂盒中的 Hi5&AcNPV 定量参考品和 DNA 稀释液置于冰上或 2-8°C 条件下融化。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 ST, ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5。
3. 在 ST 管中用 DNA 稀释液将 Hi5&AcNPV DNA 定量参考品稀释 10 倍, 得到 ST。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。

- 在 ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5 管中分别加入 90 μL DNA 稀释液。
- 按表 3 依次进行 6 次稀释操作。

表 3. Hi5&AcNPV DNA 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	Hi5 ($\text{pg}/\mu\text{L}$)	AcNPV (copies / μL) *	AcNPV ($\text{pg}/\mu\text{L}$) *
ST0	10 μL ST + 90 μL DNA 稀释液	300	5.14×10^6	20
ST1	10 μL ST0 + 90 μL DNA 稀释液	30	5.14×10^5	2
ST2	10 μL ST1 + 90 μL DNA 稀释液	3	5.14×10^4	0.2
ST3	10 μL ST2 + 90 μL DNA 稀释液	0.3	5.14×10^3	0.02
ST4	10 μL ST3 + 90 μL DNA 稀释液	0.03	5.14×10^2	0.002
ST5	10 μL ST4 + 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 $^{\circ}\text{C}$ 。

若 DNA 稀释液中有析出, 建议于 37 $^{\circ}\text{C}$ 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。

*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

- 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 μL qPCR MIX + 10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ ST5
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

S1	S1	S1										A
S2	S2	S2							ST1	ST1	ST1	B
S3	S3	S3							ST2	ST2	ST2	C
S4	S4	S4							ST3	ST3	ST3	D
S5	S5	S5							ST4	ST4	ST4	E
									ST5	ST5	ST5	F
												G
NCS	NCS	NCS	NTC	NTC	NTC							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 Hi5&AcNPV 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)。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”，“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“Hi5&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：

选择 FAM 通道代表 Hi5 DNA 检测信号，选择 CY5 通道代表 AcNPV DNA 检测信号，选择 VIC 通道代表 IPC 检测信号。

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 Hi5-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（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“通道 1 目标：Hi5-DNA”中标品赋值设为 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） 5.14×10^5 、 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。
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/ μ L。

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

选择 FAM 检测通道代表 Hi5，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 Hi5 设为 30、3、0.3、0.03、0.003（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。
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 。

✚ 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。

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