



质粒 DNA (卡那霉素抗性基因) 残留检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 说明书

版本: A/0

英文名称: Residual Plasmid DNA (Kanamycin Resistance Gene) Detection Kit

货号: 1101129 规格: 100 Reactions

所述产品仅供研究使用, 不得用于人或动物的诊断及治疗目的。



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！

第一章 产品信息

1.1 产品描述

SHENTEK® 质粒 DNA（卡那霉素抗性基因）残留检测试剂盒（PCR-荧光探针法）用于定量检测生物制品生产过程及终产品中含卡那抗性基因的质粒 DNA 残留的专用试剂盒。

本试剂盒利用荧光探针原理，定量检测样品中含卡那抗性基因的质粒 DNA 的残留。检测快速，专一性强，性能可靠，本试剂盒含 dUTP，可使用 UNG 酶系统以预防污染。本试剂盒配套有质粒 KanR DNA 定量参考品与 SHENTEK® 宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒配套使用(<https://www.shenkebio.com>)，可准确定量样品中残留的微量质粒 KanR DNA。

1.2 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
KanR DNA Control	NNA084	1 × 冻干粉	-20°C
DNA Dilution Buffer (DDB)	NND001	3 × 1.5 mL	
ddH ₂ O	NND010	1 × 1 mL	
KanR Primer&Probe MIX	NNC169	1 × 300 µL	-20°C, protect from light
AT qPCR Reaction Buffer	NNB012	2 × 850 µL	
IPC MIX-6	NNC145	1 × 200 µL	

1.3 有效期

规定储存条件下 24 个月，具体详见试剂盒标签。

1.4 实验所需设备/材料

表 2. 实验所需设备/材料

适配机型 (包括但不限于)	SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统 (货号: 1610860)
	ABI 7500 实时荧光定量 PCR 系统
	LightCycler 480 II 实时荧光定量 PCR 系统
设备	迷你离心机
	涡旋振荡器
	移液器
耗材	1.5 mL 低吸附离心管 (货号: 1901100)
	PCR 8 联管 (货号: 1903100) 或 96 孔板
	低吸附滤芯枪头 (货号: 1901980-10/100/1000)
材料	UNG 酶 (如需)

1.5 快速操作实验流程

01 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

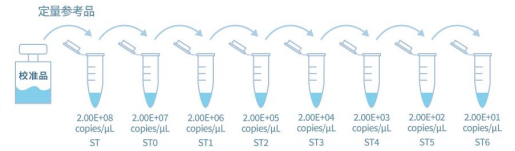
- KanR DNA Control
- DNA Dilution Buffer (DDB)
- KanR Primer&Probe MIX
- AT qPCR Reaction Buffer
- IPC MIX-6
- UNG酶 (如需)



涡旋振荡



瞬时离心3~5 秒

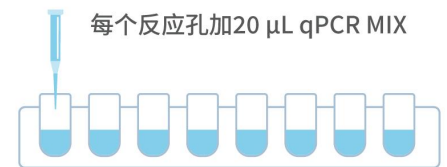


加样回收质控ERC的制备: 以加标量 $2.00\text{E}+04$ copies为例, 在 $100\ \mu\text{L}$ 待测样品中, 加入 $10\ \mu\text{L}$ ST4。

02 qPCR预混液配制

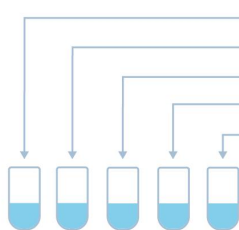


qPCR MIX配制 (单孔用量为例)
加入 $15\ \mu\text{L}$ AT qPCR Reaction Buffer
加入 $3\ \mu\text{L}$ KanR Primer&Probe MIX
加入 $2\ \mu\text{L}$ IPC MIX-6
加入 $0.1\ \text{U}$ UNG酶 (如需)



每个反应孔加 $20\ \mu\text{L}$ qPCR MIX

03 加样



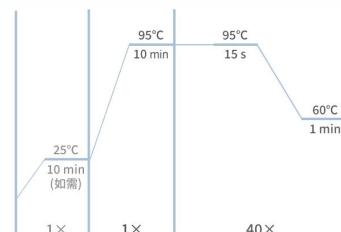
NTC (加入 $10\ \mu\text{L}$ DDB)
NCS (加入 $10\ \mu\text{L}$ NCS纯化液)
Sample (加入 $10\ \mu\text{L}$ 样品纯化液)
ERC (加入 $10\ \mu\text{L}$ ERC纯化液)
ST (加入 $10\ \mu\text{L}$ 标准品溶液)

盖紧管盖或封好封板膜



离心10 秒

04 qPCR程序设置与运行



第二章 试剂盒使用

2.1 实验前准备

- 1) 穿戴无污染的工作服、一次性乳胶手套、一次性无纺布帽子。
- 2) 工作台面、移液器及离心管架紫外照射 30 分钟，喷洒 75%酒精并擦干。
- 3) 将试剂盒转移至 2-8 °C 区域或冰上融化。

2.2 定量参考品的稀释和标准曲线制备

备注： DNA Control 浓度标注于管壁标签上，请确认浓度后再进行稀释。

每一步稀释后均需要涡旋振荡混匀（观察到管内液体形成稳定且连续的涡流）后快速离心 3-5 秒，重复 3 次，以确保定量参考品与 DNA Dilution Buffer (DDB) 充分混匀。

若 DDB 中有析出，建议于 37 °C 条件下进行孵育。已融化未使用的 DDB 可保存于 2-8 °C。

- 1) 第一次使用时，将 KanR DNA Control 快速离心 1 分钟，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 3-5 秒，如此重复 3 次，再静置 10 分钟后使用；
- 2) 将 1.5 mL 离心管分别标记为 ST, ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6；
- 3) 在 ST 管中用 DDB 将 DNA Control 稀释至 2.00E+08 copies/µL；
- 4) 在 ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6 管中分别加入 90 µL DDB；
- 5) 按下表依次进行稀释操作。

表 3. 定量参考品的稀释

稀释管	稀释	浓度 (copies/µL)
ST	使用 DDB 稀释定量参考品	2.00E+08
ST0	10 µL ST + 90 µL DDB	2.00E+07
ST1	10 µL ST0 + 90 µL DDB	2.00E+06
ST2	10 µL ST1 + 90 µL DDB	2.00E+05
ST3	10 µL ST2 + 90 µL DDB	2.00E+04
ST4	10 µL ST3 + 90 µL DDB	2.00E+03
ST5	10 µL ST4 + 90 µL DDB	2.00E+02
ST6	10 µL ST5 + 90 µL DDB	2.00E+01

2.3 加样回收质控（ERC）的制备

根据实验需要，设置 ERC (Extraction Recovery Control)。以制备加 2.00E+04 copies DNA 量的样品 ERC 为例，具体操作如下：

- 1) 取 100 μL 待测样品中加入 1.5 mL 低吸附离心管中；
- 2) 再加入 10 μL ST4，充分混匀后短暂离心，标记为 ERC。

备注：ERC 和同批待测样品一起进行提取，制备成 ERC 纯化液。

2.4 阴性质控样品（NCS）的制备

取 1.5 mL 低吸附离心管，标记为 NCS (Negative Control Sample)，加入 100 μL DDB。

备注：NCS 和同批待测样品一起进行提取，制备成 NCS 纯化液。

2.5 qPCR 预混液配制及加样

- 1) 反应孔数计算：根据标准曲线、样品和对照样品的数量，计算检测所需反应孔数，一般做 3 个重复孔/样。
- 2) 预混液（qPCR MIX）配制：待各组分完全融化后，充分混匀试剂并短暂离心，按照下表所示的试剂和体积，制备 qPCR MIX，并充分混匀，短暂离心。

表 4. qPCR MIX 配制

组分	单孔用量	30 孔用量 ^[1]
AT qPCR Reaction Buffer	15 μL	495 μL
KanR Primer&Probe MIX	3 μL	99 μL
IPC MIX-6	2 μL	66 μL
总体积	20 μL	660 μL
UNG 酶（如需）	0.1 U	3.3 U

^[1] 以 30 个反应孔同时含 10%的移液损耗为例

- 3) 反应体系加样：将 qPCR MIX 按照排版进行分液，将 NTC、样品、质控样品、标准品加入 96 孔板的相应位置，实际检测时可根据样品多少，参照此示例进行 96 孔板排板加样。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	NTC			S1-S6	S1-S6	S1-S6	S1 ERC-S6 ERC	S1 ERC-S6 ERC	S1 ERC-S6 ERC	ST6-ST1	ST6-ST1	ST6-ST1	NTC
B	NTC			S1-S6	S1-S6	S1-S6	S1 ERC-S6 ERC	S1 ERC-S6 ERC	S1 ERC-S6 ERC	ST6-ST1	ST6-ST1	ST6-ST1	NCS
C	NTC			S1-S6	S1-S6	S1-S6	S1 ERC-S6 ERC	S1 ERC-S6 ERC	S1 ERC-S6 ERC	ST6-ST1	ST6-ST1	ST6-ST1	S1-S6
D	NCS			S1-S6	S1-S6	S1-S6	S1 ERC-S6 ERC	S1 ERC-S6 ERC	S1 ERC-S6 ERC	ST6-ST1	ST6-ST1	ST6-ST1	S1 ERC-S6 ERC
E	NCS			S1-S6	S1-S6	S1-S6	S1 ERC-S6 ERC	S1 ERC-S6 ERC	S1 ERC-S6 ERC	ST6-ST1	ST6-ST1	ST6-ST1	ST6-ST1
F	NCS			S1-S6	S1-S6	S1-S6	S1 ERC-S6 ERC	S1 ERC-S6 ERC	S1 ERC-S6 ERC	ST6-ST1	ST6-ST1	ST6-ST1	ST6-ST1
G													
H													

- ① 向每个反应孔中加入 20 μ L qPCR MIX;
- ② 向相应孔中依次加入 10 μ L DDB (NTC)、NCS 纯化液 (NCS)、待测样品纯化液 (S1-S6)、ERC 纯化液 (S1 ERC-S6 ERC)、标准品溶液 (ST6-ST1)。

4) 盖紧管盖或封好封板膜，轻微振荡混匀，短时间快速离心 10 秒。

2.6 qPCR 仪器设置

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“KanR 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 KanR 残留 DNA，选择报告荧光基团为 FAM，猝灭荧光基团为 none；创建 VIC 探针，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) 设置反应程序：

温度	时间 (mm:sec)	循环数
25 $^{\circ}$ C ^[1]	10:00	1
95 $^{\circ}$ C	10:00	1
95 $^{\circ}$ C	00 :15	40
60 $^{\circ}$ C ^[2]	01 :00	

^[1] 若 qPCR MIX 配制时未添加 UNG 酶，则该步省略。

^[2] 读取荧光。

2.7 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 3 赋值，例如“KanR 残留 DNA”设为 2.00E+06、2.00E+05、2.00E+04、2.00E+03、2.00E+02、2.00E+01 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”可读取每个反应孔的检测值，单位为 copies/μL。

以 ABI 7500 Real-Time PCR System、软件版本 2.4 为例：

- 1) 在 Results 的 Amplification Plot 面板中，建议将 FAM 信号的 Threshold 设置为 0.05，将 VIC 信号的 Threshold 设置为 0.1，Baseline 设置为自动。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 一栏根据表 3 分别赋值为 2.00E+06、2.00E+05、2.00E+04、2.00E+03、2.00E+02、2.00E+01，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 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 Slope、Intercept、 R^2 。
- 5) 在 Results 的 Report 面板中，Mean Quantity 一栏可读取 NTC、NCS、ERC、待测样品的检测值，单位为 copies/μL。

备注：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。

2.8 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) 样品的 IPC Ct 值与 NCS 的 IPC Ct 值要求在 ± 1 个 Ct 值范围内，如样品的 IPC Ct 值与 NCS 的 IPC Ct 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。

- 3) NCS 和 NTC 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。

生效日期：2026 年 08 月 07 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