

Human DNA 残留片段分析试剂盒 (PCR-荧光探针法) 说明书

产品简介

Human DNA残留片段分析试剂盒用于定量分析检测各种生物制品的中间品、半成品和成品中Human宿主细胞DNA残留片段大小分布,辅助进行生物制品的核酸质控。适用的生物制品类型包括核酸、细胞、细胞培养上清、质粒收获液、蛋白制品等。

本试剂盒利用 qPCR 荧光探针法原理,设计了三种扩增片段长度不同的引物探针(102bp、198bp、301bp),用 Human 基因组 DNA 标准品分别对不同的扩增片段制作标准曲线来定量检测分析样品中 Human 残留 DNA 片段的大小分布情况。试剂盒经完整性能验证,灵敏度达到 30fg,能够专一且快速检测 Human 残留 DNA 片段的大小分布情况。

试剂盒组分

表 1 试剂盒组分

组分	3*30 反应装量	3*100 反应装量
Human DNA 定量标准品	10 μL ×1 管	50 μL ×1 管
2× qPCR Reaction Mix	1250 μL ×1 管	1250 μL ×3 管
H102 Primer&Probe MIX	33 μL ×1 管	100 μL ×1 管
H198 Primer&Probe MIX	33 μL ×1 管	100 μL ×1 管
H301 Primer&Probe MIX	33 μL ×1 管	100 μL ×1 管
IPC MIX	100 μL ×1 管	330 μL ×1 管
50×ROX Low	40 μL ×1 管	120 μL ×1 管
50×ROX High	40 μL ×1 管	120 μL ×1 管
DNA 稀释液	1.8 mL×1 管	1.8 mL×4 管

*请对应机型选择适配的 ROX。

包装与规格

货号 10903004 3*30 反应/盒

货号 10903005 3*100 反应/盒

储存条件及有效期

储存条件：-20°C±5°C避光保存。

有效期：12 个月。

试剂盒反复冻融5次内有效。

适配机型（包括但不限于）

- Thermo Scientific: ABI 7500 Real-Time PCR System (ROX Low)
- ABI Quant Studio 6 (ROX High)
- 杭州博日科技: FQD-96A (No ROX)

需要额外准备的耗材与设备

实验前请准备好下列耗材与设备：

- 1.5ml 或 2mL 无菌低吸附离心管
- 与 PCR 仪适配的 96 孔 qPCR 板或八联排管
- 1000μl, 200μl, 10μl 无菌低吸附带滤芯枪头
- 荧光定量 PCR 仪
- 离心机
- 震荡器
- 各规格移液器（如 1000μl, 200μl, 10μl, 2.5μl 等）

实验操作流程

1. Human DNA 定量标准品稀释和标准曲线制备

使用试剂盒中的 DNA 稀释液将 Human DNA 定量标准品进行梯度稀释，具体操作如下：

- 1) 将试剂盒中的 Human DNA 和 DNA 稀释液置于冰上或 2-8°C 条件下融化，待完全融化后，轻微振荡混匀，低速离心 10 sec。
- 2) 取 6 支洁净的 1.5 mL 离心管，分别标记为 ST0、ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。

- 3) 在 ST0 管中取 6 μ L Human DNA 定量标准品加 14 μ L DNA 稀释液稀释至 3ng/ μ L, 得到 ST0, 振荡混匀后快速离心 3~5 sec, 重复 3 次以确保定量标准品与 DNA 稀释液充分混匀。
- 4) 在 ST1, ST2, ST3, ST4, ST5 管中分别加入 180 μ L DNA 稀释液。
- 5) 按表 2 依次进行 5 次稀释操作, 每次稀释后确保充分混匀后再进行下一个梯度的稀释。

表 2 标准品梯度稀释

稀释管	稀释体积	终浓度 (pg/ μ L)
ST1	20 μ L ST0 + 180 μ L DNA 稀释液	300
ST2	20 μ L ST1 + 180 μ L DNA 稀释液	30
ST3	20 μ L ST2 + 180 μ L DNA 稀释液	3
ST4	20 μ L ST3 + 180 μ L DNA 稀释液	0.3
ST5	20 μ L ST4 + 180 μ L DNA 稀释液	0.03

- ✚ 每个浓度做 3 个复孔, 标准曲线浓度梯度可根据实际验证结果选择, 应至少有 5 个浓度梯度。
- ✚ 为减少反复冻融次数和避免污染, 建议初次使用时将 Human DNA 定量标准品分装储存于 -20 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C。
- ✚ 标准品的稀释应在每次实验前重新制备, 不可使用前一次或前一日制备的标准品。
- ✚ 已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于 2-8 $^{\circ}$ C 7 天, 若长时间不用, 请放置于 -20 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C。

2. 待测样本 S 的制备

根据实验设置待测样本 S, 具体操作如下:

- 1) 取 100 μ L 待测样本加入 1.5 mL 洁净的离心管中, 标记为 S, 使用宿主残留样本前处理试剂盒进行样本前处理, 制备待测样本 S 纯化液。
 - 2) 建议设置加标样品 (ERC), 与待测样品进行同步处理, 作为回收率考察。
- ✚ 一般建议样品加标量设置为样品 Human DNA 实际残留量的 2-10 倍。若样品 Human DNA 实际残留量低于本试剂盒的定量限, 加标量应设置在定量限范围之内, 保证检测结果的准确性。

3. 阴性质控 NCS 的制备

根据实验设置阴性抽提质控 NCS，具体操作如下：

- 1) 取 100 μL 样本基质溶液（或 DNA 稀释液）加入 1.5 mL 洁净的离心管中，标记为 NCS。
- 2) 阴性质控 NCS 和同批待测样本一起进行样本前处理，制备成阴性质控 NCS 纯化液。

4. 反应体系混合液（qPCR MIX）的准备

- 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 + 待测样品数) \times 3

- 2) 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR 反应液总量（含有 2 孔的损失量）：

qPCR MIX = (反应孔数 + 2) \times 15 μL

- 3) 各试剂放在冰上或 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下充分融化后，轻微震荡混匀，参照表 3、表 4、表 5 所示配制反应 MIX。

表 3 片段 H102 qPCR MIX 配制表

组分	单孔反应 (μL)
2 \times qPCR Reaction Mix	12.5
H102 Primer&Probe MIX	1
IPC MIX	1.1
ROX	0.4
总体积	15

表 4 片段 H198 qPCR MIX 配制表

组分	单孔反应 (μL)
2 \times qPCR Reaction Mix	12.5
H198 Primer&Probe MIX	1
IPC MIX	1.1
ROX	0.4

总体积	15
-----	----

表 5 片段 H301 qPCR MIX 配制表

组分	单孔反应 (μL)
2× qPCR Reaction Mix	12.5
H301 Primer&Probe MIX	1
IPC MIX	1.1
ROX	0.4
总体积	15

✚ 为满足同步进行三种扩增片段检测，DNA 模板需 $\geq 100\mu\text{l}$ ，建议每个样品同时准备 2 管进行前处理，提取完成后混匀使用。

5. 加样

1) 上述各试剂置于冰上融化，轻微振荡混匀，按照表 6、表 7、表 8 所示加样：

表 6 片段 H102 各反应孔加样示例

标准曲线	15 μL qPCR MIX+10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	15 μL qPCR MIX+10 μL DNA 稀释液
NCS	15 μL qPCR MIX+10 μL NCS 纯化液
待测样品	15 μL qPCR MIX+10 μL 待测样品纯化液

表 7 片段 H198 各反应孔加样示例

标准曲线	15 μL qPCR MIX+10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	15 μL qPCR MIX+10 μL DNA 稀释液
NCS	15 μL qPCR MIX+10 μL NCS 纯化液
待测样品	15 μL qPCR MIX+10 μL 待测样品纯化液

表 8 片段 H301 各反应孔加样示例

标准曲线	15 μL qPCR MIX+10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	15 μL qPCR MIX+10 μL DNA 稀释液
NCS	15 μL qPCR MIX+10 μL NCS 纯化液

待测样品	15 μ L qPCR MIX+10 μ L 待测样品纯化液
------	--

加样完成后每孔总体积为 25 μ L。

表 9 96 孔板排版示例

	Mix-H102			Mix-H198			Mix-H301			样本		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	S1-102	S1-102	S1-102
B	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	S2-102	S2-102	S2-102
C	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	S1-198	S1-198	S1-198
D	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	S2-198	S2-198	S2-198
E	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	S1-301	S1-301	S1-301
F										S2-301	S2-301	S2-301
G	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS			
H	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC			

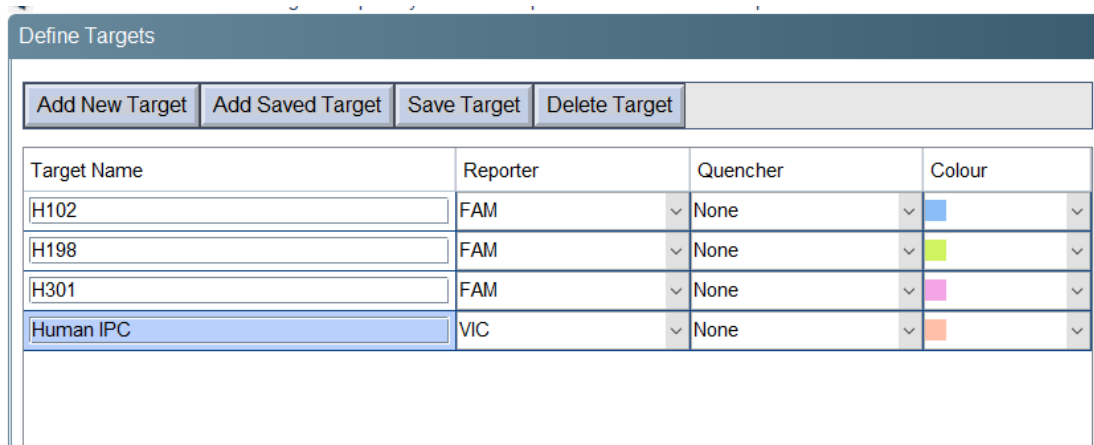
该示例表示的是 5 个浓度梯度的标准曲线 (ST1~5)、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、2 个待测样品 (S1~S2)。每个检测做 3 个重复孔。实际检测时可根据样品多少, 参照表 9 示例进行 96 孔板排版加样。

- 1) 加样完成后, 将 96 孔板用光学膜封闭, 轻微震荡混匀, 短时间快速离心 10 sec 后放入 qPCR 仪, 如有气泡, 需将气泡排尽。

6. 扩增程序参数设置

以 ABI 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 2.3 为例

- 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“H102”, 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“H198”, 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“H301”, 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 Human 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, 参比荧光可根据仪器型号等情况, 选择是否需要添加)。



- 3) 在“Assign target (s) to the selected wells”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“300”、“30”、“3”、“0.3”、“0.03”（含义为每孔的 DNA 浓度，单位为 pg/μL），并且在相应的“Sample Name”一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。
- 4) 将无模板对照 NTC 孔的“Task”一栏设置为“NTC”；将阴性质控 NCS 孔、待测样本 S 孔的“Task”一栏设置为“Unknown”，并且在相应的“Sample Name”一栏中分别命名为“NCS”、“S”。
- 5) 扩增程序设置：设置两步法扩增程序，反应体积 25 μL。

表 10 qPCR 扩增程序

循环步骤	温度 (°C)	时间	循环数
UDG 消化	37	2 min	1
预变性	95	2 min	1
变性	95	10 sec	45
退火/延伸（收集荧光）	60	30 sec（采光）	

- 6) 之后点击“Start Run”，开始仪器运行。

7. qPCR 结果分析

- 1) 在“Analysis”的“Amplification Plot”面板中，系统会自动给出“Threshold”，有时系统给出的“Threshold”离基线太近，导致复孔之间 Ct 相差甚远，可手动调节“Threshold”至合适位置（ABI 7500 建议设置为 0.3），点击“Analyze”。此时可在“Multicomponent Plot”初步查看扩增曲线的形态是否正常。

- 2) 在“Analysis”的“Standard Curve”面板中,可读取标准曲线的 R^2 、扩增效率(Eff%)、斜率(Slope)、截距(Intercept)等。正常的标曲: $R^2 > 0.99$, 扩增效率在 $90\% \leq \text{Eff}\% \leq 110\%$ 范围内, Slope 在 $-3.8 \sim -3.1$ 。
- 3) 在“Analysis”的“View well table”面板中,“Quantity”一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样本 TS 的检测值,单位为 $\text{pg}/\mu\text{L}$, 后续可在检测报告中进行单位换算。
- 4) 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。
- 5) 阴性质控 NCS 的 Ct 值应大于标曲最低浓度 Ct 的均值。
- 6) 无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undetermined 或大于标准曲线最低浓度点 2 个 Ct 值以上。

注意事项

1. 本产品仅作科研用途,不用于临床诊断。
2. 本试剂盒需在有效期内使用。
3. 为了您的安全和健康,请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
4. 注意在不同加样步骤间及时更换吸头、避免交叉污染,避免长时开盖。
5. 使用本试剂前请仔细阅读本说明书,实验应规范操作,包括样本处理、反应体系的配制及加样。
6. 试剂盒内所有组分建议在低温环境融化后使用,且使用前每个组分请上下颠倒轻轻混匀,尽量避免起泡,并经短暂离心后使用。
7. 避免反复冻融本品,反复冻融可能使产品性能下降。
8. 本产品长期保存可置于 $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ 避光保存。如果在短期内需要频繁使用,可在 $2-8^\circ\text{C}$ 保存。

【基本信息】

生产企业名称:北京阅微基因技术股份有限公司

住所:北京市海淀区三里河路 17 号 10 层 1005 至 1010

售后服务单位名称:北京阅微基因技术股份有限公司

生产地址:北京市昌平区中关村科技园区白浮泉北街 1 号院 1 号楼-1 至 6 层 101 三层及六层 601