

Sf9&AcNPV 残留 DNA 检测试剂盒

(PCR-荧光探针法) 说明书

货号：BP-QN21-100

版本：02 版

本产品仅供研究用

珠海横琴宝锐生物科技有限公司

【产品名称】

Sf9&AcNPV 残留 DNA 检测试剂盒 (PCR-荧光探针法)

【包装规格】

100 Reactions/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定量检测昆虫细胞 (Sf9) -杆状病毒表达系统生产的基因工程疫苗中 Sf9 细胞和杆状病毒 (AcNPV) 的残留 DNA。

【产品简介】

本试剂盒采用 PCR-荧光探针法, 分别针对 Sf9 细胞和 AcNPV 的保守基因设计引物探针, 能够定量检测昆虫细胞-杆状病毒表达系统生产的基因工程疫苗中 Sf9 细胞和杆状病毒 (AcNPV) 的残留 DNA。试剂盒含有内标, 用于监控提取与扩增是否异常, 防止假阴性的产生。本试剂盒含有 UDG 酶, 用于预防扩增产物的污染。

本试剂盒与珠海横琴宝锐核酸提取或纯化试剂盒Ⅱ (磁珠法) 或珠海横琴宝锐核酸提取或纯化试剂盒Ⅲ (磁珠法) 配套使用。

【主要成分与含量】

试剂盒组分	规格 (100 Reactions/盒)
Sf9&AcNPV qPCR MIX	1.0mL×2 管
Sf9&AcNPV 内标*	1.0mL×1 管
Sf9&AcNPV 阴性对照	1.0mL×2 管
Sf9&AcNPV 校准品 ST1	0.5mL×1 管 (Sf9: 3fg/μL; AcNPV: 3copies/μL)
Sf9&AcNPV 校准品 ST2	0.5mL×1 管 (Sf9: 30fg/μL; AcNPV: 3×10 ¹ copies/μL)
Sf9&AcNPV 校准品 ST3	0.5mL×1 管 (Sf9: 300fg/μL; AcNPV: 3×10 ² copies/μL)
Sf9&AcNPV 校准品 ST4	0.5mL×1 管 (Sf9: 3pg/μL; AcNPV: 3×10 ³ copies/μL)
Sf9&AcNPV 校准品 ST5	0.5mL×1 管 (Sf9: 30pg/μL; AcNPV: 3×10 ⁴ copies/μL)
Sf9&AcNPV 校准品 ST6	0.5mL×1 管 (Sf9: 300pg/μL; AcNPV: 3×10 ⁵ copies/μL)

说明:

不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

实验操作中需要但试剂盒中未提供的试剂: 核酸提取或纯化试剂盒。

*若不使用试剂盒内标功能, 提取时无需添加内标, 程序设置时不设置 CY5 通道, 结果分析时无需关注 CY5 结果。

*若样品提取时未添加内标, 扩增时加内标, 则配制 MIX 时每反应液加 1μL 内标, 分装 qPCR MIX 时分装 21μL/反应, 此时 PCR 总反应体积为 41μL/反应。

【储存条件及有效期】

- 1、置于≤-20℃下避光保存, 有效期 24 个月。
- 2、避免反复冻融, 反复冻融次数不超过 10 次。
- 3、产品有效期及失效日期见标签。

【适用机型】

包括但不限于以下机型: SLAN-96P、SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统; ABI7500、ABI QuantStudio™ 5 实时荧光定量 PCR 仪; Roche LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪; 伯乐 CFX96 定量 PCR 仪。

【检验方法】

从试剂盒中取出 Sf9&AcNPV qPCR MIX、Sf9&AcNPV 内标、Sf9&AcNPV 阴性对照、Sf9&AcNPV 校准品 ST1~ST6, 置于室温融化, 充分震荡混匀后瞬时离心备用。

1. 加样回收质控 ERC 制备

根据需要设置 ERC 中的 Sf9&AcNPV 加样浓度（以制备 AcNPV 加标 3×10^4 copies 的 ERC 为例），具体操作如下：

- 1) 取 100 μ L 待测样本加入 1.5mL 干净的离心管中。
- 2) 加入 10 μ L Sf9&AcNPV 校准品 ST4 后混匀瞬时离心，标记为样本 ERC。样本 ERC 和同批待测样本一起进行核酸提取纯化，得到的核酸即为样本 ERC 核酸。

2. 反应液准备

2.1 根据待测标本数，计算所需的 PCR 反应液数，一般建议做 3 个重复/样本。

PCR 反应液数 = (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 + 待测样本 + 待测样本 ERC) $\times$ 3。然后按照 20 μ L/反应的量将 Sf9&AcNPV qPCR MIX 反应液分装至 96 孔 PCR 板或者 PCR 八连管中。

2.2 各反应孔加样示例：

组分	加样量
标准曲线	20 μ L Sf9&AcNPV qPCR MIX + 20 μ L ST1/ST2/ST3/ST4/ ST5/ST6
NTC	20 μ L Sf9&AcNPV qPCR MIX + 20 μ L 阴性对照
NCS	20 μ L Sf9&AcNPV qPCR MIX + 20 μ L NCS 纯化液
待测样本	20 μ L Sf9&AcNPV qPCR MIX + 20 μ L 待测样本纯化液
样本 ERC	20 μ L Sf9&AcNPV qPCR MIX + 20 μ L 样本 ERC 纯化液

3. 样本核酸提取：

操作步骤参照核酸提取或纯化试剂盒说明书，样本量为 100 μ L，内标添加量为 10 μ L。

4. 荧光 PCR 反应：

4.1 按照 2.2 的方法将核酸加入到 Sf9&AcNPV qPCR MIX 中，盖好反应管盖或者用光学膜封闭 96 孔 PCR 板，混匀后瞬时离心，转移到荧光 PCR 仪器上。

4.2 在荧光 PCR 仪上运行以下程序：

步骤	条件	循环数
UDG 处理	50 $^{\circ}$ C：2 分钟	1
预变性	95 $^{\circ}$ C：3 分钟	1
PCR 扩增	95 $^{\circ}$ C：10 秒，60 $^{\circ}$ C（采集荧光）：30 秒	45

荧光通道选择 FAM、ROX、CY5，其中 FAM 为 Sf9 基因，ROX 为 AcNPV 基因，CY5 为内标。若仪器为 ABI 系列，参比荧光选择 none。

5. 结果判定

5.1 阈值线设定

阈值线依据仪器噪声情况进行调整，将阈值线设置到超过本底信号波动位置。

5.2 内标的判读

对于阴性结果内标 Ct 值应 ≤ 35 ；对于阳性结果，可能会因为竞争抑制，导致阳性结果内标不出值或者出值较差。

5.3 试验成立条件

NTC, NCS 的 FAM 及 ROX 通道显示无 Ct 值或无典型扩增曲线；标准曲线线性相关性 $R^2 > 0.98$ 。

6. 结果分析

6.1 以 SLAN-96P 为例：

1) 若需要调整阈值线，在“实验分析”面板的“参数设置”中，将阈值设置到超过本底信号波动位置。

2) 在“孔板编辑”面板中，将校准品的“样本类型”一栏设置为标准品，并且在“属性”一栏通道

1 或通道 3 分别赋值为 3 、 3×10^1 、 3×10^2 、 3×10^3 、 3×10^4 、 3×10^5 (含义为每孔的 Sf9 或 AcNPV 浓度, 单位为 fg/ μ L 或 copies/ μ L), 并且在相应的“样本名称”一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。

3) 在“实验分析”的“标准曲线”面板中, 可读取标准曲线的斜率、截距、相关系数、扩增效率。

4) 在“实验分析”的“反应孔信息表”面板中, “浓度”一栏可读取检测结果的浓度值, 单位为 fg/ μ L 或 copies/ μ L。根据待测样本和样本 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。

6.2 以 ABI 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 2.4 为例:

1) 若需要调整阈值线, 在 Analysis 的 Amplification Plot 面板中, 将 FAM 通道、ROX 通道、CY5 通道 Threshold 设置到超过本底信号波动位置, 点击 Analyze;

2) 在 Setup 的 Plate Setup 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 3 、 3×10^1 、 3×10^2 、 3×10^3 、 3×10^4 、 3×10^5 (含义为每孔的 Sf9 或 AcNPV 浓度, 单位为 fg/ μ L 或 copies/ μ L), 并且在相应的 Sample 一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC, 将阴性质控 NCS 孔、待测样本孔、样本 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;

3) 在 Analysis 的 Standard Curve 面板中, 可读取标准曲线的 Slope、Y-Inter、 R^2 等;

4) 在 Analysis 的 View Well Table 面板中, Quantity 一栏可读取检测结果的浓度值, 单位为 fg/ μ L 或 copies/ μ L。根据待测样本和样本 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。

【注意事项】

1、试剂盒应在 -20°C 以下保存运输。

2、实验前请仔细阅读本试剂盒说明书, 严格按照操作步骤执行, 在操作过程中对时间、试剂体积等精确控制可以获得最好的结果。

3、核酸提取有关耗材确保洁净、无 DNase/RNase, 提取过程尽量低温、快速, 完成后进入下一步实验或冷冻保存。

4、不要使用过期组分或者不同批次组分混合使用。

5、冻存试剂使用前应于室温下完全融化, 瞬时离心使液体完全沉于管底。避免反复冻融, 以免影响试剂性能。

6、对于顶部采光仪器要带新的一次性 PE 手套对反应管封盖, 对于底部采光仪器要避免徒手或使用过的手套接触反应管底, 检测过程中使用不带荧光物质一次性无粉乳胶手套。

7、实验室应严格按照有关规定分区管理, 依照配液区→模板提取区→扩增区→分析区顺序进行基因检测。各区间人员、器材、试剂及空气流向应有严格要求。

8、样品、校准品等在使用后及时封盖, 避免组分间及气溶胶等的污染造成假阳性。

9、扩增产物禁止开盖, 实验产生的废弃物应及时收集, 远离 PCR 实验室进行无害化处理。

10、如果样本中靶标为强阳性时, 由于体系的竞争抑制, 可能会对内标检测造成影响。

【免责声明】

在所有情况下, 本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。

【公司信息】

邮箱: marketing@biori.com.cn

网址: www.biori.com

