

Hi5&AcNPV 残留 DNA 检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 说明书

货号：BP-QN23-100

版本：01 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】
Hi5&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（Hi5）-杆状病毒表达系统生产的基因工程疫苗中 Hi5 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 Hi5 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 Hi5 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配套使用。

试剂盒组分		规格（100 Reactions/盒）
Hi5&AcNPV qPCR MIX		1.0 mL × 2 管
Hi5&AcNPV 内标*		1.0 mL × 1 管
Hi5&AcNPV 阴性对照		1.0 mL × 2 管
Hi5&AcNPV 校准品 ST1		0.5 mL × 1 管（Hi5：3 fg/μL；AcNPV：3 copies/μL）
Hi5&AcNPV 校准品 ST2		0.5 mL × 1 管（Hi5：30 fg/μL；AcNPV：3 × 10 ¹ copies/μL）
Hi5&AcNPV 校准品 ST3		0.5 mL × 1 管（Hi5：300 fg/μL；AcNPV：3 × 10 ² copies/μL）
Hi5&AcNPV 校准品 ST4		0.5 mL × 1 管（Hi5：3 pg/μL；AcNPV：3 × 10 ³ copies/μL）
Hi5&AcNPV 校准品 ST5		0.5 mL × 1 管（Hi5：30 pg/μL；AcNPV：3 × 10 ⁴ copies/μL）
Hi5&AcNPV 校准品 ST6		0.5 mL × 1 管（Hi5：300 pg/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】
置于≤-20℃下避光保存，有效期 24 个月。
避免反复冻融，反复冻融次数不超过 10 次。
产品有效期及失效日期见标签。

【适用机型】
适用于 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 Light Cycler 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 Hi5&AcNPV qPCR MIX、Hi5&AcNPV 内标、Hi5&AcNPV 阴性对照、Hi5&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 Hi5&AcNPV 加样浓度（以制备 AcNPV 加标 3 × 10⁴ copies 的 ERC 为例），具体操作如下：

1) 取 100μL 待测样本加入 1.5mL 干净的离心管中。

2) 加入 10μL Hi5&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) ×3。然后按照 20μL/反应的量将 Hi5&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	20μL Hi5&AcNPV qPCR MIX + 20μL ST1/ST2/ST3/ST4/ ST5/ST6
NTC	20μL Hi5&AcNPV qPCR MIX + 20μL 阴性对照
NCS	20μL Hi5&AcNPV qPCR MIX + 20μL NCS 纯化液
待测样本	20μL Hi5&AcNPV qPCR MIX + 20μL 待测样本纯化液
样本 ERC	20μL Hi5&AcNPV qPCR MIX + 20μL 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 100μL，内标添加量为 10μL。

4 荧光 PCR 反应：

4.1 按照 2.2 的方法将核酸加入到 Hi5&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℃：2 分钟	1
预变性	95℃：3 分钟	1
PCR 扩增	95℃：10 秒，60℃（采集荧光）：30 秒	45

荧光通道选择 FAM、ROX、CY5，其中 FAM 为 Hi5 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 （含义为每孔加入的 Hi5 或 AcNPV 浓度，单位为 fg/μL 或 copies/μL），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 （含义为每孔加入的 Hi5 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、剂盒应在-20℃以下保存。
- 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、要带新的一次性 PE 手套对反应管封盖，避免徒手或使用过的手套接触反应管，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

