

# E1B 残留 DNA 检测试剂盒

## (PCR-荧光探针法) 说明书

货号：BP-QN04-100

版本：04 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】

E1B 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】

用于定量检测生物制品中宿主细胞，如 HEK293、293T 细胞，来源的 E1B 残留 DNA 的专用试剂盒。

### 【产品简介】

本试剂盒采用 PCR-荧光探针法，针对 E1B 基因设计引物探针，搭配即用型线性 E1B DNA 定量参考品，能够定量检测生物制品中宿主细胞，如 HEK293、293T 细胞，来源的 E1B 残留 DNA。试剂盒含有外源性内标，内标可以与样本一起参与提取扩增，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。

### 【主要成分与含量】

试剂盒组分	规格 (100 Reactions/盒)
E1B qPCR MIX	1.0mL×2 管
E1B 内标*	1.0mL×1 管
E1B 阴性对照	1.0mL×2 管
E1B 校准品 ST1	0.5mL×1 管 ( $1.42 \times 10^1$ copies/ $\mu$ L)
E1B 校准品 ST2	0.5mL×1 管 ( $1.42 \times 10^2$ copies/ $\mu$ L)
E1B 校准品 ST3	0.5mL×1 管 ( $1.42 \times 10^3$ copies/ $\mu$ L)
E1B 校准品 ST4	0.5mL×1 管 ( $1.42 \times 10^4$ copies/ $\mu$ L)
E1B 校准品 ST5	0.5mL×1 管 ( $1.42 \times 10^5$ copies/ $\mu$ L)

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 1 $\mu$ L 内标，分装 qPCR Mix 时分装 21 $\mu$ L/反应，此时 PCR 总反应体积为 41 $\mu$ L/反应。

### 【储存条件及有效期】

1、置于≤-20°C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 E1B qPCR MIX、E1B 内标、E1B 阴性对照、E1B 校准品 ST1-ST5，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 E1B DNA 加样浓度（以制备加  $1.42 \times 10^4$  copies E1B DNA 量的 ERC 为

例)，具体操作如下：

1) 取 100 $\mu$ L 待测样本加入 1.5mL 干净的离心管中；

2) 加入 10 $\mu$ L ST3 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。

PCR 反应液数= (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+待测样本+待测样本 ERC)  $\times$  3。然后将相应数量的 PCR 反应液，按照每孔 20 $\mu$ L 的量分装至 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 $\mu$ L E1B qPCR MIX + 20 $\mu$ L ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	20 $\mu$ L E1B qPCR MIX + 20 $\mu$ L 阴性对照
NCS	20 $\mu$ L E1B qPCR MIX + 20 $\mu$ L NCS 纯化液
待测样本	20 $\mu$ L E1B qPCR MIX + 20 $\mu$ L 待测样本纯化液
样本 ERC	20 $\mu$ L E1B qPCR MIX + 20 $\mu$ 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说明书，样本量为 100 $\mu$ L，内标添加量为 10 $\mu$ L。

## 4 荧光 PCR 反应

4.1 按照 2.2 的方法将核酸加入到 E1B 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°C: 2 分钟	1
预变性	95°C: 3 分钟	1
PCR 扩增	95°C: 10 秒, 60°C (采集荧光): 30 秒	45

荧光通道选择 FAM、CY5，其中 FAM 为 E1B DNA，CY5 为 E1B 内标。若仪器为 ABI 系列，参比荧光选择 ROX。

## 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，以刚好超过 E1B 阴性对照品扩增曲线的最高点为准。若仪器自动阈值线超过了 E1B 阴性对照品扩增曲线最高点，也可以采用仪器自动阈值。

### 5.2 内标的判读

对于阴性结果内标 Ct 值应 $\leq$ 40；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

无模板对照 NTC 的检测结果为其均值不超过 0.284 copies/ $\mu$ L，或根据实验室自身验证结果设定具体标准。标准曲线线性相关性  $R^2 > 0.99$ 。

## 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，将阈值设置到合适高度；

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”一栏分别赋值为  $1.42 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L、 $1.42 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L、 $1.42 \times 10^3$  copies/ $\mu$ L、 $1.42 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L、

$1.42 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$  (含义为每孔加入的 DNA 浓度, 单位为 copies/ $\mu\text{L}$ ), 并且在相应的“样本名称”一栏中命名为 ST5、ST4、ST3、ST2、ST1;

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 copies/ $\mu\text{L}$ 。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 Threshold 设置为 0.1、CY5 通道 Threshold 设置为 0.1, 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  $1.42 \times 10^5$  copies/ $\mu\text{L}$ 、 $1.42 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$ 、 $1.42 \times 10^3$  copies/ $\mu\text{L}$ 、 $1.42 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ 、 $1.42 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$  (含义为每孔加入的 DNA 浓度, 单位为 copies/ $\mu\text{L}$ ), 并且在相应的 Sample 一栏中命名为 ST5、ST4、ST3、ST2、ST1。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<sup>2</sup> 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 copies/ $\mu\text{L}$ 。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。

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、无 HEK293、腺病毒或 E1B 等核酸残留及相关产物, 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 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。

11、建议使用各仪器新版本的软件进行实验及数据分析。

### 【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

