

# **质粒 DNA 残留检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 说明书**

**货号：BP-QN120-100**

**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】

质粒 DNA 残留检测试剂盒（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生物制品样品中的质粒 DNA 残留。

### 【产品简介】

本试剂盒采用 PCR-荧光探针法，针对质粒的共有序列，设计引物探针，能够定量检测生物制品样品中的质粒 DNA 残留。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（磁珠法）配套使用。

### 【主要成分与含量】

试剂盒组分	规格 (100 Reactions/盒)
Plasmid qPCR MIX	1.0mL × 2 管
Plasmid 阴性对照	1.0mL × 2 管
Plasmid 内标*	1.0mL × 1 管
Plasmid 校准品 ST1	0.5mL × 1 管 ( $5 \times 10^1$ copies/ $\mu$ L)
Plasmid 校准品 ST2	0.5mL × 1 管 ( $5 \times 10^2$ copies/ $\mu$ L)
Plasmid 校准品 ST3	0.5mL × 1 管 ( $5 \times 10^3$ copies/ $\mu$ L)
Plasmid 校准品 ST4	0.5mL × 1 管 ( $5 \times 10^4$ copies/ $\mu$ L)
Plasmid 校准品 ST5	0.5mL × 1 管 ( $5 \times 10^5$ copies/ $\mu$ L)
Plasmid 校准品 ST6	0.5mL × 1 管 ( $5 \times 10^6$ copies/ $\mu$ L)

说明：

不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

试剂盒提供的校准品为线性化校准品。

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。

\*若想使用内标功能且样品提取时未添加内标，可在扩增时加内标，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 31 $\mu$ 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 Plasmid qPCR MIX、Plasmid 内标、Plasmid 阴性对照、Plasmid 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 Plasmid 加标浓度（以制备加  $5 \times 10^6$  copies 的 ERC 为例），具体操作

如下：

1) 取  $100\mu\text{L}$  待测样本加入  $1.5\text{ml}$  干净的离心管中。

2) 加入  $10\mu\text{L}$  Plasmid 校准品 ST5 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= (6 个浓度梯度的校准品+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，按照一孔  $20\mu\text{L}$  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	$20\mu\text{L}$ Plasmid qPCR MIX + $10\mu\text{L}$ ST1/ST2/ST3/ST4/ ST5/ ST6
NTC	$20\mu\text{L}$ Plasmid qPCR MIX + $10\mu\text{L}$ 阴性对照
NCS	$20\mu\text{L}$ Plasmid qPCR MIX + $10\mu\text{L}$ NCS 纯化液
待测样本	$20\mu\text{L}$ Plasmid qPCR MIX + $10\mu\text{L}$ 待测样本纯化液
样本 ERC	$20\mu\text{L}$ Plasmid qPCR MIX + $10\mu\text{L}$ 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  $100\mu\text{L}$ ，内标添加量为  $10\mu\text{L}$ 。

## 4. 荧光 PCR 反应

4.1 按照 2.2 的方法将核酸加入到 Plasmid 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	$50^\circ\text{C}$ : 2 分钟	1
预变性	$95^\circ\text{C}$ : 3 分钟	1
PCR 扩增	$95^\circ\text{C}$ : 10 秒, $60^\circ\text{C}$ (采集荧光) : 30 秒	45

荧光通道选择 FAM、CY5，其中 FAM 为 Plasmid DNA，CY5 为 Plasmid 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，以超扩增曲线基线期且处于刚进入指数扩增期为准。若仪器自动阈值线达到上述需求，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  $\leq 33$ ；对于强阳性结果，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 的浓度均值应  $\leq 1 \text{ copy}/\mu\text{L}$  或 Ct 均值大于校准品最低浓度 Ct 均值；标准曲线线性相关性  $R^2 > 0.98$ 。

## 6. 结果分析

### 6.1 以 SLAN-96P 或 SLAN-96S 为例：

1) 一般无需调整阈值线，若需要调整，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  $5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^3$ 、 $5 \times 10^2$ 、 $5 \times 10^1$ （含义为每孔加入的 Plasmid 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 ST6、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 建议设置为 0.1；CY5 建议通道 Threshold 设置为 0.02；  
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  $5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^3$ 、 $5 \times 10^2$ 、 $5 \times 10^1$ （含义为每孔加入的 Plasmid 浓度，单位为 copies/ $\mu\text{L}$ ），并且在相应的 Sample 一栏中命名为 ST6、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，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

