

【产品名称】

Human 残留 DNA 片段分析检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【产品货号】

BP-QN68-100

【包装规格】

4×100 Reactions/盒

【预期用途】

本试剂盒是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 残留片段大小分布的试剂盒。

【产品简介】

本试剂盒采用 PCR 荧光探针法，针对 Human 基因组的保守序列，设计了四种不同的扩增片段（66bp、177bp、200bp、528bp）来定量检测分析样本中 Human 残留 DNA 片段大小的分布情况。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（4×100 Reactions/盒）
Human 片段-66bp qPCR MIX	1.0mL×2 管
Human 片段-177bp qPCR MIX	1.0mL×2 管
Human 片段-200bp qPCR MIX	1.0mL×2 管
Human 片段-528bp qPCR MIX	1.0mL×2 管
Human 片段内标*	1.0mL×1 管
Human 片段阴性对照	1.0mL×2 管
Human 片段校准品 ST1	1.0mL×1 管（30fg/μL）
Human 片段校准品 ST2	1.0mL×1 管（300fg/μL）
Human 片段校准品 ST3	1.0mL×1 管（3pg/μL）
Human 片段校准品 ST4	1.0mL×1 管（30pg/μL）
Human 片段校准品 ST5	1.0mL×1 管（300pg/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 31μL/反应。

【储存条件及有效期】

- 1、置于≤-18℃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 7 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 Human 片段-66bp qPCR MIX、Human 片段-177bp qPCR MIX、Human 片段-200bp qPCR MIX、Human 片段-528bp qPCR MIX、Human 片段内标、Human 片段阴性对照、Human 片段校准品 ST1-ST5，置于室温融化，充分振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 Human 片段加样浓度（加标浓度一般为样品实际残留 DNA 浓度的 2-10 倍，以制备 30pg Human 片段量的 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 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) × 3。然后将相应数量的 PCR 反应液，按照每孔 20μL 的量分装至 96 孔 PCR 板或者 PCR 八连管中。

注：为满足同步进行四种扩增片段检测，DNA 模板需 ≥ 120μL，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。

2.2 各反应孔加样示例：

表 1 Human 片段-66bp/177bp/200bp/528bp 各反应孔加样示例

组分	加样量
标准曲线	20μL Human 片段-66bp/177bp/200bp/528bp qPCR MIX + 10μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	20μL Human 片段-66bp/177bp/200bp/528bp qPCR MIX + 10μL 阴性对照
NCS	20μL Human 片段-66bp/177bp/200bp/528bp qPCR MIX + 10μL NCS 纯化液
待测样本	20μL Human 片段-66bp/177bp/200bp/528bp qPCR MIX + 10μL 待测样本纯化液
样本 ERC	20μL Human 片段-66bp/177bp/200bp/528bp qPCR MIX + 10μL 样本 ERC 纯化液

2.3 孔板排版布局可参考下表：

表 2 Human 片段-孔板排版示例

	MIX-66			MIX-177			MIX-200			MIX-528		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC
B	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1
E	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2
F	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3
G	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4
H	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5

*该示例表示的是检测各片段梯度的 DNA 标准曲线、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、1 个待测样品 S。每个检测做 3 个重复孔。其中 1-3 列为 66bp qPCR MIX，4-6 列为 177bp qPCR MIX，7-9 列为 200bp qPCR MIX，10-12 列为 528bp qPCR MIX。

*实际检测时可根据样品多少，参照此示例进行排版加样。

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 Human 片段-66bp qPCR MIX、Human 片段-177bp qPCR MIX、Human 片段-200bp qPCR MIX、Human 片段-528bp 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，57℃（采集荧光）：1 分钟 30 秒	40
冷却	25℃*：10S	1

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

*若荧光 PCR 仪温度无法设置 25℃，可将冷却步骤温度设置为 37℃。

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，取第 3 到 15 次循环的荧光强度均值加 10 倍标准差，或采用阴性对照荧光值的最高点作为荧光阈值，或将阈值线设置到超过本底信号波动位置。

5.2 内标的判读

- 1) 对于阴性样本和 NCS 结果，内标 Ct 值应≤35；
- 2) 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出值较差。

*仅分析 HEK293 片段-66bp 内标结果，其余片段无需分析内标结果。

5.3 试验成立条件

- 1) NTC 的 CT 均值大于校准品最低浓度 CT 均值；
- 2) 标准曲线线性相关性 $R^2 \geq 0.98$ ，标准曲线最低点 CT 值不高于 39；
- 3) 每组加标样本的回收率应在 50%-150%之间，RSD≤30%。

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 0.03、0.3、3、30、300（含义为每孔加入的 DNA 浓度，单位为 pg/μL），并且在相应的“样本名称”一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5；
- 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 pg/μL。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。
- 5) 以 66bp MIX 的待测样品检测值为 100%，计算 177bp MIX、200bp MIX、528bp MIX 的待测样品

百分比。

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 通道和 CY5 通道 Threshold 设置到合适高度,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 0.03、0.3、3、30、300 (含义为每孔加入的 DNA 浓度,单位为 pg/ μ L),并且在相应的 Sample 一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。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 pg/ 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。
- 5) 以 66bp MIX 的待测样品检测值为 100%,计算 177bp MIX、200bp MIX、528bp MIX 的待测样品百分比。

【注意事项】

- 1、试剂盒应在-18℃及以下保存。
- 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、无人源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。
- 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

