

**BHK 残留 DNA 检测试剂盒**  
**(PCR-荧光探针法)**  
**说明书**

货号：1101116

版本：A/0

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

## ■ 试剂盒简介

SHENTEK® BHK 残留 DNA 检测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 BHK 宿主细胞 DNA 的专用试剂盒。

本试剂盒利用 PCR 荧光探针法原理，定量检测样品中 BHK 残留 DNA。检测快速，专一性强，性能可靠，最低检测限可以达到 fg 水平。试剂盒配套有 BHK DNA 定量参考品。本试剂盒与 SHENTEK® 宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒配套使用，可准确定量样品中 BHK 残留 DNA。

## ■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
BHK DNA 定量参考品	NNA029	50 $\mu$ L $\times$ 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下
qPCR Reaction Buffer	NNB001	850 $\mu$ L $\times$ 2 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下，避光
BHK Primer & Probe MIX	NNC076	300 $\mu$ L $\times$ 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下，避光
DNA 稀释液	NND001	1.5 mL $\times$ 3 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下

## ■ 规格

100 Reactions。

## ■ 有效期

规定储存条件下 24 个月，具体详见试剂盒标签。

## ■ 适用机型（包括但不限于）

- SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统
- 7500 Real-Time PCR System
- LightCycler 480 II

## ■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 1.5 mL 无菌离心管
- PCR 八联管或 96 孔 qPCR 板
- 1000  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 10  $\mu$ L 无菌低吸附带滤芯枪头

## ■ 相关设备

- 荧光定量 PCR 仪
- 1000  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 10  $\mu$ L 移液枪

## ■ 操作过程

- ❖ BHK DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

**BHK DNA 定量参考品浓度标注于管壁标签上, 请确认浓度后再进行稀释。**

用试剂盒中提供的 DNA 稀释液将 BHK DNA 定量参考品进行梯度稀释, 稀释浓度依次为 3 ng/μL、300 pg/μL、30 pg/μL、3 pg/μL、300 fg/μL, 30 fg/μL。具体操作如下:

1. 将试剂盒中的 BHK DNA 定量参考品和 DNA 稀释液置于冰上或 2-8 °C 条件下融化。待完全融化后, 轻弹数下混匀, 短时间快速离心 3-5 s, 如此重复 3 次。
2. 取 6 支干净的 1.5 mL 离心管, 分别标记为 ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5。
3. 在 ST0 管中用 DNA 稀释液将 BHK DNA 定量参考品稀释至 3 ng/μL, 振荡混匀后短时间快速离心 3-5 s, 重复 3 次以确保定量参考品与 DNA 稀释液充分混匀。
4. 在 ST1, ST2, ST3, ST4, ST5 管中分别加入 90 μL DNA 稀释液。
5. 按表 2 依次进行 5 次稀释操作。

表 2. BHK DNA 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度
ST1	10 μL ST0+90 μL DNA 稀释液	300 pg/μL
ST2	10 μL ST1+90 μL DNA 稀释液	30 pg/μL
ST3	10 μL ST2+90 μL DNA 稀释液	3 pg/μL
ST4	10 μL ST3+90 μL DNA 稀释液	300 fg/μL
ST5	10 μL ST4+90 μL DNA 稀释液	30 fg/μL

✚ 已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于 2-8 °C。

✚ 若 DNA 稀释液中有析出, 建议于 37 °C 条件下进行孵育。

#### ❖ 加标回收质控 ERC 的制备

根据需要设置 ERC 中的 BHK DNA 加标浓度 (以制备加 30 pg BHK DNA 量的样品 ERC 为例), 具体操作如下:

1. 取 100 μL 待测样品加入 1.5 mL 干净的离心管中。
2. 再加入 10 μL ST3, 混匀, 标记为样品 ERC。

✚ 样品 ERC 和同批待测样品一起进行样品前处理, 制备成样品 ERC 纯化液。

#### ❖ 阴性质控 NCS 的制备

根据实验设置阴性质控, 具体操作如下:

1. 取 100 μL DNA 稀释液加入 1.5 mL 干净的离心管中, 标记为阴性质控 NCS。

✚ 阴性质控 NCS 和同批待测样品一起进行样品前处理, 制备成阴性质控 NCS 纯化液。

### ❖ qPCR 反应液 (qPCR MIX) 的准备

1. 根据所要检测的标准曲线及待测样品数量, 计算所需反应孔数, 一般做 3 个重复孔/样。

反应孔数 = (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 + 待测样品 × 2) × 3

✚ 待测样品 × 2 是因为我们推荐每个待测样品检测时都应同时做样品 ERC。

2. 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR MIX 总量 (含有 2 孔的损失量):

✚  $qPCR\ MIX = (反应孔数 + 2) \times 20\ \mu L$

3. 各试剂放在冰上或 2-8 °C 条件下融化, 并参考表 3 所示准备 qPCR MIX:

表 3. qPCR MIX 配制表

组分	单孔反应
qPCR Reaction Buffer	17 $\mu L$
BHK Primer & Probe MIX	3 $\mu L$
总体积	20 $\mu L$

### ❖ 加样

1. 各试剂置于冰上, 轻微振荡混匀按表 4 所示加样:

表 4. 各反应孔加样示例

标准曲线	20 $\mu L$ qPCR MIX + 10 $\mu L$ ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
无模板对照 NTC	20 $\mu L$ qPCR MIX + 10 $\mu L$ DNA 稀释液
阴性质控 NCS	20 $\mu L$ qPCR MIX + 10 $\mu L$ 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 $\mu L$ qPCR MIX + 10 $\mu L$ 待测样品纯化液
样品 ERC	20 $\mu L$ qPCR MIX + 10 $\mu L$ 待测样品 ERC 纯化液

✚ 加样完成后每孔总体积为 30  $\mu L$ 。

表 5. 96 孔板排版示例

ST5	ST5	ST5		S1	S1	S1	S1 ERC	S1 ERC	S1 ERC		NCS	A
ST4	ST4	ST4		S2	S2	S2	S2 ERC	S2 ERC	S2 ERC		NCS	B
ST3	ST3	ST3		S3	S3	S3	S3 ERC	S3 ERC	S3 ERC		NCS	C
ST2	ST2	ST2		S4	S4	S4	S4 ERC	S4 ERC	S4 ERC			D
ST1	ST1	ST1		S5	S5	S5	S5 ERC	S5 ERC	S5 ERC		NTC	E
											NTC	F
											NTC	G
												H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

该示例表示的是检测 5 个浓度梯度的 BHK 标准曲线、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控样品 NCS、5 个待测样品 (S1-S5) 及其对应的 ERC 样品 (S1 ERC-S5 ERC)。每个检测做 3 个重复孔。

实际检测时可根据样品多少, 参照此示例进行 96 孔板排版加样。

2. 将 96 孔板用光学膜封闭, 轻微震荡混匀, 短时间快速离心 10 s 后放入 qPCR 仪。

### ❖ qPCR 程序设置

◇ SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例。

1. 点击“实验向导”。
2. “孔板编辑”页面中选择步骤 1: 选择反应孔。
3. 选择步骤 2: 选择项目中的“BHK 残留 DNA”程序。
4. “实验运行”页面中点击“开始”运行程序。

◇ 其他定量 PCR 系统程序设置如下:

1. 创建空白新程序, 选择绝对定量检测模板。
2. 创建新检测探针, 命名为 BHK-DNA, 选择报告荧光基团为 FAM, 淬灭荧光基团为 none, 检测参比荧光为 ROX (可选)。
3. 设置两步法反应程序: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 15s, 60 °C 1 min (读取荧光), 40 个循环; 反应体积 30 μL。

## ❖ qPCR 结果分析

✧ 以 SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例。

1. “孔板编辑”页面中步骤 3: 定义反应孔, 将标准曲线孔的选择样品类型设置为标准品, 并在标品赋值中分别根据表 2 赋值, 例如“BHK 残留 DNA”设为 300、30、3、0.3、0.03, 并且在相应的“样本名称”中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。

2. 待测样品将样品类型设置为待测样品, NTC 将样品类型设置为无模板对照。

3. 在“实验分析”页面点 , 可读取标准曲线的斜率、截距、相关系数、扩增效率。

4. 在“反应孔信息表中”可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品的检测值, 单位为 pg/μL。

✧ 以 7500 Real-Time PCR System、软件版本 2.4 为例。

1. 在 Setup 的 Plate Setup 面板的 Assign Targets and Samples 模块中, 编辑孔板信息。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 300、30、3、0.3、0.03 (含义为每孔的模板浓度, 单位为 pg/μL); 将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC, 将阴性质控 NCS 孔、待测样品孔的 Task 一栏设置为 Unknown。

2. 在 Analysis 的 Amplification Plot 面板中, 将 FAM 信号的 Threshold 设置为 0.02, 两种信号均为 Auto Baseline, 点击 Analyze, 此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常。在 View Well Table 中, Mean Quantity 一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品的检测值, 单位为 pg/μL。

3. 在 Analysis 的 Standard Curve 面板中, 可读取各标准曲线的斜率 (Slope)、截距 (Inter)、R<sup>2</sup> 和扩增效率 (Eff%)。

4. 根据待测样品和样品 ERC 的检测结果计算加标回收率, 加标回收率要求在 50%-150%之间。

5. 阴性质控 NCS 的 Ct 均值应大于标曲最低浓度 Ct 均值, 若经验证的定量限浓度低于标曲最低浓度, 则 NCS 的检测值应小于定量限浓度。

6. 无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值≥35.00, 或根据实验室自身验证结果设定具体标准。

 上述示例结果分析的参数设置仅供参考, 具体需依据实验室机型及使用的软件版本进行设定, 一般也可由仪器自动判读。

修订日期: 2023 年 01 月 31 日

生效日期: 2023 年 01 月 31 日

## 服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

[www.shenkebio.com](http://www.shenkebio.com)

地址: 浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: [Info@shenkebio.com](mailto:Info@shenkebio.com)

电话: 0572-2165910