

牛源残留 DNA 检测试剂盒

（PCR-荧光探针法）

说明书

货号：1101112

在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意点！

版本：A/2

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®牛源残留 DNA 检测试剂盒(PCR-荧光探针法)是用于定量检测各种生物材料（如生物修复膜、生物补片、脱细胞基质等）中牛源 DNA 的专用试剂盒。

本试剂盒利用 PCR 荧光探针法原理，定量检测样品中残留的牛源 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 Bovine DNA 定量参考品。本试剂盒与动物源性生物材料残留 DNA 提取试剂盒（磁珠法）配套使用。

该试剂盒仅供研究使用，不可用于临床。

■ 试剂盒组分

表 1.试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
Bovine DNA 定量参考品	NNA032	100 μL × 1 管	-18 °C及以下
Bovine Primer&Probe MIX	NNC042	300 μL × 1 管	-18 °C及以下，避光
AT qPCR Reaction Buffer	NNB012	850 μL × 2 管	-18 °C及以下，避光
IPC MIX	NNC066	150 μL × 1 管	-18 °C及以下，避光
DNA 稀释液	NND001	1.5 mL × 3 管	-18 °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

■ 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 μL，100 μL，10 μL 无菌低吸附带滤芯枪头
- UNG 酶（确定使用前建议验证酶效果）

■ 相关设备

- 荧光定量 PCR 仪
- 1000 μL , 100 μL , 10 μL 移液枪

■ 实验操作流程

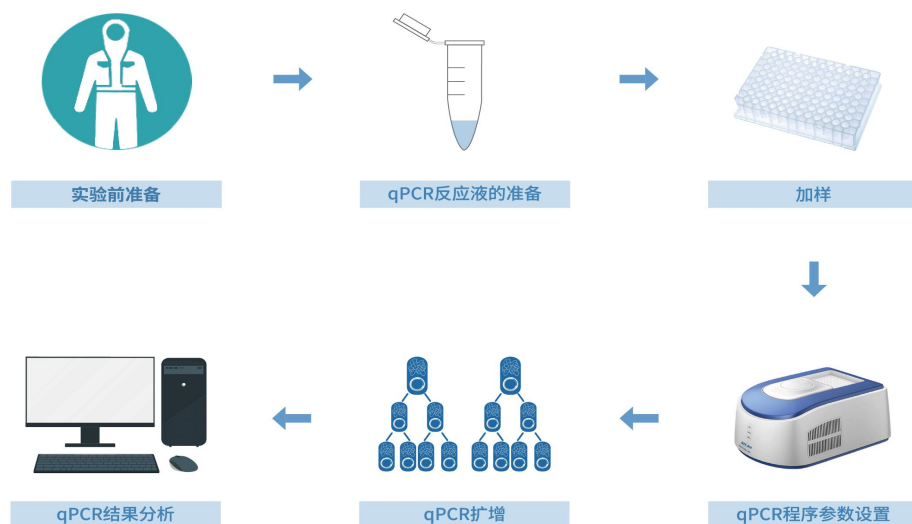


图 1 操作流程示意图

一、试剂、仪器准备

(一) 实验前准备:

1. 穿戴无 DNA 污染的工作服、一次性乳胶手套、一次性无纺布帽子。
2. 工作台面、移液枪及离心管架紫外照射 30 分钟，喷洒 75%酒精并擦干。
3. 将试剂盒从冰箱-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下区域转移至 **2-8 $^{\circ}\text{C}$ 区域或冰上融化**，涡旋振荡混匀并瞬时离心。

(二) qPCR 反应液准备:

1. 反应孔数计算：根据检测样品的数量，计算所需反应孔数，一般做 3 个重复孔/样。

反应孔数=（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 +待测样品） $\times$ 3

2. MIX 总量计算：根据反应孔数计算所需 MIX 总量。
- MIX 总量 = (反应孔数+2) × 20 μL (含有 2 孔的损失量)
3. qPCR MIX 配制：根据表 2 配制表准备各试剂 qPCR MIX 用量。

表 2. qPCR MIX 配制表

组分	单孔用量
AT qPCR Reaction Buffer	15.9 μL
Bovine primer&probe MIX	2.8 μL
IPC MIX	1.3 μL
总体积	20 μL
UNG 酶(可选)	0.1 U

二、样品准备

● Bovine DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

Bovine 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 稀释液将定量参考品进行稀释，具体操作如下：

1. 将试剂盒中的 Bovine 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 秒，如此重复 3 次。
2. 取 7 支干净的 1.5 mL 离心管，分别标记为 ST0，ST1，ST2，ST3，ST4，ST5，ST6。
3. 在 ST0 管中用 DNA 稀释液将 Bovine DNA 定量参考品稀释至 30 ng/μL，振荡混匀后短时间快速离心 3-5 秒，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，ST6 管中分别加入 90 μLDNA 稀释液。
5. 按表 3 依次进行 6 次稀释操作。

表 3. Bovine DNA 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度
ST1	10 μ L ST0 + 90 μ L DNA 稀释液	3 ng/ μ L
ST2	10 μ L ST1 + 90 μ L DNA 稀释液	300 pg/ μ L
ST3	10 μ L ST2 + 90 μ L DNA 稀释液	30 pg/ μ L
ST4	10 μ L ST3 + 90 μ L DNA 稀释液	3 pg/ μ L
ST5	10 μ L ST4 + 90 μ L DNA 稀释液	300 fg/ μ L
ST6	10 μ L ST5 + 90 μ L DNA 稀释液	30 fg/ μ L

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。

标准曲线浓度点可根据实际验证结果选择，应至少有 5 个浓度点。

● 加标回收 (ERC)

根据需要设置 ERC 中的 Bovine DNA 加样浓度（以制备加 30 ng Bovine DNA 量的样品 ERC 为例），具体操作如下：

1. 取 100 μ L 待测样品加入 1.5 mL 干净的离心管中。
2. 再加入 10 μ L ST1，混匀，标记为样品 ERC。

备注：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。

● 阴性对照 (NCS)

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

备注：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。

三、操作步骤

（一）加样

1. 各试剂置于冰上，轻微振荡混匀，按表 4 和表 5 所示加样：

表 4. 各反应孔加样示例

各样品	加样量
标准曲线	20 μL qPCR MIX + 10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ ST5/ST6
NTC	20 μL qPCR MIX + 10 μL DNA 稀释液
NCS	20 μL qPCR MIX + 10 μL 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 μL qPCR MIX + 10 μL 待测样品纯化液
样品 ERC	20 μL qPCR MIX + 10 μL 样品 ERC 纯化液

表 5. 96 孔板排版示例

S1	S1	S1	S1 ERC	S1 ERC	S1 ERC				ST1	ST1	ST1	A
S2	S2	S2	S2 ERC	S2 ERC	S2 ERC				ST2	ST2	ST2	B
S3	S3	S3	S3 ERC	S3 ERC	S3 ERC				ST3	ST3	ST3	C
S4	S4	S4	S4 ERC	S4 ERC	S4 ERC				ST4	ST4	ST4	D
S5	S5	S5	S5 ERC	S5 ERC	S5 ERC				ST5	ST5	ST5	E
									ST6	ST6	ST6	F
												G
NCS	NCS	NCS							NTC	NTC	NTC	H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

- ✧ 该示例表示的是检测各浓度梯度的 DNA 标准曲线（ST1~ST6）、1 个无模板对照 NTC、5 个待测样品（S1~S5）和每个样品的 ERC（S1 ERC~S5 ERC）、1 个阴性质控样品 NCS。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 秒后放入 qPCR 仪。

（二）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“牛源残留 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, 选择报告荧光基团为 FAM, 猝灭荧光基团为 none;
创建新检测探针, 选择报告荧光基团为 VIC, 猝灭荧光基团为 none;
检测参比荧光为 ROX (可选)。
 3. 设置两步法反应程序:
25 °C UNG 酶作用 10 分钟 (可选);
95 °C 预变性 10 分钟;
95 °C 15 秒, 63 °C 40 秒 (读取荧光), 40 个循环; 反应体积 30 μ L。
 - ✧ 各实验室可根据所用机型设置合理的反应程序。
 - ✧ 若检测体系里加入 UNG 酶, 反应程序需要设置一步 25 °C UNG 酶作用 10 分钟。

四、结果计算与判断

(一) 结果计算

- 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 3 赋值, 例如“牛源残留 DNA”设为 3000、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、ST6。
 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”页面点击 , 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/ μ L。
- 以 7500 Real-Time PCR System、软件版本 1.4 为例:
 1. 在 Results 的 Amplification Plot 面板中, 将 Threshold 设置为 0.02, 点击 Analyze, 此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常。
 2. 在 Results 的 Plate 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 3000、300、30、3、0.3、0.03 (含义

为每孔的模板浓度, 单位为 $\text{pg}/\mu\text{L}$), 并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。

3. 在 Results 的 Plate 面板中, 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, 并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 NTC、NCS、ERC、S1、S2、S3、S4、S5, 之后点击 .
4. 在 Results 的 Standard Curve 面板中, 可读取各标准曲线的斜率 (Slope)、截距 (Intercept)、 R^2 。
5. 在 Results 的 Report 面板中, 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 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 。

(二) 结果判断

1. 分析 IPC 的 Ct 值, 待测样品的 Ct-IPC 均值与 NCS 的 Ct-IPC 均值在 ± 1 个 Ct 值范围内。若样品 Ct-IPC 均值与 NCS Ct-IPC 均值相比明显增大, 则表明样品可能有抑制。如同时测试加标样品, 则优先考虑样品回收率结果, IPC 结果作为参考。
2. 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。
3. 无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值 ≥ 35 , 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, 具体需依据实验室的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 07 月 05 日

生效日期: 2023 年 07 月 14 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址: 浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话: 0572-2165910