

质粒 DNA 残留检测试剂盒（2G） （PCR-荧光探针法） 说明书

货号：1101111

版本：A/4

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®质粒 DNA 残留检测试剂盒用于定量检测基因治疗产品中质粒 DNA 残留的专用检测试剂盒，如 CAR-T 细胞治疗中慢病毒载体制备相关的质粒 DNA。

本试剂盒利用 Taqman 探针原理，通过各质粒共有 DNA 序列，如 ColE1/pMB1/pBR322/pUC 来源的复制子，定量检测样品中质粒 DNA 的残留。客户可以事先将质粒 DNA 序列给本公司技术人员进行确认。本试剂盒检测快速，专一性强，性能可靠，最低检测限可以达到 10² copies/μL。试剂盒配套有质粒 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，可准确定量样品中残留的微量质粒 DNA。

■ 试剂盒组分

表 1.试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
Plasmid 非线性化 DNA 定量参考品	NNA017	50 μL × 1 管	-18 °C及以下
Plasmid 线性化 DNA 定量参考品	NNA016	冻干粉，1 管	-18 °C及以下
Plasmid Primer & Probe MIX	NNC031	300 μL × 1 管	-18 °C及以下，避光
qPCR Reaction Buffer	NNB001	850 μL × 2 管	-18 °C及以下，避光
DNA 稀释液	NND001	1.5 mL × 3 管	-18 °C及以下
IPC MIX	NNC066	150 μL × 1 管	-18 °C及以下，避光

■ 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
- CFX96 定量 PCR 系统
- Linegene 9600 定量 PCR 系统

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 1.5 mL 无菌离心管
- 96 孔 qPCR 板或八联管

- 1000 µL, 100 µL, 10 µL 无菌低吸附带滤芯枪头

■ 相关设备

- 荧光定量 PCR 仪
- 迷你离心机
- 漩涡振荡器
- 1000 µL, 100 µL, 10 µL 移液枪

■ 操作过程

❖ Plasmid DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

Plasmid 线性化 DNA 定量参考品: 将 Plasmid 线性化 DNA 定量参考品快速离心 15 s, 准确移取 55 µL ddH₂O 加至管底, 溶解冻干粉。

为保证冻干粉充分溶解, 轻弹数下混匀, 短时间快速离心 3-5 s, 如此重复 3 次, 再静置 10 min 后使用。

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. 将试剂盒中的定量参考品和 DNA 稀释液置于冰上或 2-8 °C 条件下。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。

 可根据自身样品结构特性选择线性化或非线性化 Plasmid DNA 定量参考品配制标曲。

2. 如使用 Plasmid 非线性化 DNA 定量参考品, 取 7 支干净的 1.5 mL 离心管, 分别标记为 ST、ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5。如使用 Plasmid 线性化 DNA 定量参考品, 则取 8 支干净的 1.5 mL 离心管, 分别标记为 ST, ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6。

3. 在 ST 管中用 DNA 稀释液将定量参考品稀释至 $4.97 \times 10^8 \text{copies}/\mu\text{L}$, 得到 ST, 振荡混匀短时间快速离心 3-5 s, 重复 3 次。再在 ST0 管中用 DNA 稀释液将 ST 稀释 10 倍, 得到 ST0, 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, ST6 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. 质粒 DNA 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度 (copies/ μ L)	
		非线性 DNA	线性 DNA
ST1	10 μ L ST0+90 μ L DNA 稀释液	2.98×10^6	4.97×10^6
ST2	10 μ L ST1+90 μ L DNA 稀释液	2.98×10^5	4.97×10^5
ST3	10 μ L ST2+90 μ L DNA 稀释液	2.98×10^4	4.97×10^4
ST4	10 μ L ST3+90 μ L DNA 稀释液	2.98×10^3	4.97×10^3
ST5	10 μ L ST4+90 μ L DNA 稀释液	2.98×10^2	4.97×10^2
ST6	10 μ L ST5+90 μ L DNA 稀释液	/	4.97×10^1

✚ 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。

❖ 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 μ L 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步骤, 制备成阴性质控 NCS 纯化液。

❖ qPCR 反应液的制备和加样

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) $\times$ 3

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 μ L

3. 各试剂置于冰上或 2-8 °C 条件下融化, 轻微振荡混匀, 按表 3 所示配制:

表 3. qPCR MIX 配制表

组分	单孔反应
qPCR Reaction Buffer	17 μL
Plasmid Primer&Probe MIX	3 μL
总体积	20 μL

4. 上述试剂混匀，按表 4 所示加样：

表 4.各反应孔加样示例

标准曲线	20 μL qPCR MIX + 10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ ST5
无模板对照 NTC	20μL qPCR MIX + 10 μL DNA 稀释液
阴性质控 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

 加样完成后每孔总体积为 30 μL。

❖ IPC 组反应液的制备和加样

NCS 和待测样品均需做 IPC 检测，根据表 5 和表 6 配制。

表 5. IPC qPCR MIX 配制表

组分	单孔反应
qPCR Reaction Buffer	15.9 μL
IPC MIX	1.3 μL
DNA 稀释液	2.8 μL
总体积	20 μL

表 6. IPC 各反应孔加样示例

NCS	20 μL IPC qPCR MIX + 10 μL NCS 纯化液
待测样品	20 μL IPC qPCR MIX + 10 μL 待测样品纯化液

 加样完成后每孔总体积为 30 μL。

表 7.96 孔板排版示例

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

该示例表示的是检测 5 个浓度梯度的质粒 DNA 标准曲线 (ST1-ST5)、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、2 个待测样品 (S1, S2)、NCS 的 IPC (IPC-NCS) 和待测样品的 IPC (IPC-S1, IPC-S2)。建议做 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。

❖ 上机

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”页面中选择质粒非线性化检测反应孔, 选择步骤 2 项目中的“**质粒非线性化残留 DNA-FAM**”程序; 或在“孔板编辑”页面中选择质粒线性化检测反应孔, 选择步骤 2 项目中的“**质粒线性化残留 DNA-FAM**”程序。选择检测荧光基团 VIC 样品反应孔, 选择步骤 2 项目中的“**质粒残留 DNA-IPC**”程序。

3. “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:

选择 FAM 通道代表 Plasmid 质粒检测信号, 选择 VIC 通道代表 IPC 检测信号。

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 plasmid-DNA, 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, 命名为 IPC, 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: **95 °C 预变性 10 min; 95 °C 15 s, 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, 如非线性 DNA 标准曲线设为 $2.98\text{e}+006$ 、 $2.98\text{e}+005$ 、 $2.98\text{e}+004$ 、 $2.98\text{e}+003$ 、 $2.98\text{e}+002$ (单位为 $\text{copies}/\mu\text{L}$), 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 $\text{copies}/\mu\text{L}$ 。

✧ 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 中, 将标准曲线孔的 Task 一栏设置为 Standard, 并且在 Quantity 一栏分别根据表 2 赋值, 非线性 DNA 标准曲线设为 $2.98\text{e}+006$ 、 $2.98\text{e}+005$ 、 $2.98\text{e}+004$ 、 $2.98\text{e}+003$ 、 $2.98\text{e}+002$ (单位为 $\text{copies}/\mu\text{L}$), 并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。线性 DNA 标准曲线则设为 $4.97\text{e}+006$ 、 $4.97\text{e}+005$ 、 $4.97\text{e}+004$ 、 $4.97\text{e}+003$ 、 $4.97\text{e}+002$ 、 $4.97\text{e}+001$ (单位为 $\text{copies}/\mu\text{L}$), 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、S, 之后点击 .

4. 在 Results 的 Standard Curve 面板中, 可读取标准曲线的斜率 (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, 单位为 $\text{copies}/\mu\text{L}$ 。

6. 样品的 Ct-IPC 值与 NCS 的 Ct-IPC 值要求在 ± 1 个 Ct 值范围内, 如样品的 Ct-IPC

值与 NCS 的 Ct-IPC 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。

7. NTC 检测均值应不超过 10.61 copies/ μ L, 或根据实验室自身验证结果设定具体标准。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。

✚ 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 04 月 19 日

生效日期: 2023 年 04 月 28 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