

质粒残留 DNA 检测试剂盒(qPCR-荧光探针法)说明书

【产品简介】

质粒残留 DNA 检测试剂盒通过对市场所用质粒共有 DNA 序列的分析,可以实现定量检测样品(如慢病毒、腺病毒等)中各类质粒 DNA 的残留。本试剂盒利用 TaqMan 荧光探针原理,专一性强,灵敏度高,性能可靠,用于检测各种生物制品的中间品、半成品和成品中质粒 DNA 残留的专用试剂盒。

试剂盒配套有质粒定量参考品。

检测范围为: 4×10^1 copies/ μ L ~ 4×10^6 copies/ μ L。

公式: 质粒拷贝数 (copies/ μ L) = $6.02 \times 10^{14} \times$ 质粒浓度 (ng/ μ L) / (质粒碱基数 $\times 660$)

【规格】

100 Reactions

【储存条件】

-20°C保存,一年有效。

【试剂盒组成】

表 1 试剂盒组分及储存条件

组分	规格	数量	储存条件
质粒 Primer&Probe MIX	550 μ L	1 管	-20°C 及以下避光保存
2 \times qPCR Reaction MIX	1.6mL/管	1 管	-20°C 及以下保存
浓度(copies/ μ L)			
组分	规格	数量	
定量参考品 1 (4×10^6)	300 μ L/管	各 1 管	
定量参考品 2 (4×10^5)	300 μ L/管	各 1 管	

苏州欣协生物科技有限公司

电话: 0512-63037851

网址: www.xinbiotech.cn

邮箱: info@szxxbio.com

定量参考品 3 (4×10^4)	300 μ L/管	各 1 管
定量参考品 4 (4×10^3)	300 μ L/管	各 1 管
定量参考品 5 (4×10^2)	300 μ L/管	各 1 管
定量参考品 6 (4×10^1)	300 μ L/管	1 管
DNA 稀释液	1mL/管	3 管

【有效期】

规定储存条件下 12 个月。

【试验所需自备器材和试剂】

荧光定量 PCR 仪	1000 μ L, 100 μ L, 10 μ L 移液枪
1.5mL 无菌离心管	1000 μ L, 100 μ L, 10 μ L 无菌低吸附带滤芯吸头
无菌无酶八联管或 96 孔 qPCR 板	

适配机型（包括但不限于）

- ◆ ABI QuantStudio 3 或 ABI QuantStudio 5 qPCR 仪
- ◆ ABI 7500 Real-Time PCR System
- ◆ 伯乐 CFX Opus96 Real-Time PCR System

【试验流程】

qPCR 反应液的制备和加样

1、根据所需检测的标准样品和待测样品数量（一般做 3 组复孔），计算反应所需孔数：

反应孔数 = (定量参考品 1~6 + 1 个无模板对照 NTC + 待测样品) \times 3

2、根据反应孔数计算本次所需的质粒 qPCR MIX 总量：

质粒 qPCR MIX = (反应孔数+2 或 3) ×20μL (2 或 3 为操作损失量)

3、将所用试剂置于冰上融化，轻微振荡混匀，按表 2 所示配制质粒 qPCR MIX。

表 2 质粒 qPCR MIX 配制表

组分	单个反应量
2×qPCR Reaction MIX	15μL
质粒 Primer&Probe MIX	5μL
总体积	20μL

4、将所需试剂置于冰上融化，轻微振荡混匀，按表 3 所示加样（总体积 30μL）：

表 3 各反应孔加样示例

参考品	定量参考品 1~6 各 10μL+所需质粒 qPCR MIX 量 20μL
无模板对照 NTC	DNA 稀释液各 10μL+所需质粒 qPCR MIX 量 20μL
待测样品	待测样品各 10μL+所需质粒 qPCR MIX 量 20μL

5、试验可使用无菌无核酸酶的八联管或者 96 孔板进行反应，需去除反应体系中的气泡，并离心至管底准备反应。

qPCR 反应程序和参数设置

以 BIO-RAD 公司 CFX96 qPCR 仪为例。

1、设置反应程序：

2、创建实验反应板，点击 Select Fluorophores 选择荧光 FAM；在反应板图表中，选择样品孔，在 Sample Type 中下拉选择 Unknow，勾选荧光 FAM，Target Name 命名为 ZL；输入每个样品的重复次数及 Sample Name。

在反应板图表中，选择标曲孔，在 Sample Type 中下拉选择 Standard，勾选荧光 FAM，Target Name 命名为 ZL；输入每个稀释梯度的重复次数及 Sample Name。并且分别在 STD1，STD2，STD3，STD4，

STD5,STD6 的 Concentration 一栏赋值为 4000000、400000、40000、4000、400、40 (单位为 copies/ μ l)。

3、点击 Run 界面的“Start Run”按钮进行 PCR 测定。

Stage1	污染消化	Reps: 1	50°C	2min
Stage2	预变性	Reps: 1	95°C	20s
Stage3	循环反应	Reps: 40	95°C	3s
			60°C	30s

程序 Stage3 中 60°C 30s 处设置为荧光收集；

反应体积为 30 μ L。

qPCR 结果分析

以 BIO-RAD 公司 CFX96 qPCR 仪为例。

- 1.点击资料分析视窗 Quantitation, 可读取标准曲线的斜率 (Slope)、截距 (Intercept)、扩增效率 (Effect)、 R^2 。
- 2.在视窗 Quantitation Data 中, SQ Mean 一栏可读取无模板对照 NTC、待测样本的 RCL 检测值, 单位为 copies/ μ l。
- 3.无模板对照 NTC 检测结果应为 N/A 或 Ct 值大于标准曲线最低浓度 Ct 均值。

【注意事项】

- 1、实验开始前, 为减少污染建议用酒精擦拭台面、移液器、枪头盒等表面。
- 2、注意在不同加样步骤间及时更换吸头, 避免交叉污染。
- 3、所有试剂需平衡至室温, 再进行实验。
- 4、在磁珠洗涤或洗脱过程中, 每次振荡混匀后, 都要短时间快速离心, 以保证没有磁珠液附着在离心管管盖和管壁上。
- 5、尽量在当天完成样本前处理纯化就立即进行后续 DNA 检测, 以保证检测结果的准确性。

6、试剂应储存于规定环境下，不同批次试剂盒试剂不建议混用。

7、最终的试验结果与试剂的有效性、操作者的操作方法及实验环境密切相关。



xinbio

苏州欣协生物科技有限公司

电话: 0512-63037851

网址: www.xinbiotech.cn

邮箱: info@szxxbio.com