

# **GNM Hela 残留 DNA 检测试剂盒**

## **说明书**

货 号:

**HCD0108-100(100T)**

## 一、试剂盒简介

GNM Helo 残留 DNA 检测试剂盒是一款专为定量检测各种生物制品的中间品、半成品及成品中 Helo 宿主细胞残留 DNA 而设计的专用试剂盒。

本试剂盒采用了多重 qPCR 荧光探针技术，定量检测样品中 Helo 宿主细胞残留 DNA。检测快速、灵敏度高、特异性强，最低检测限可以达到 fg 水平。试剂盒配套有 Helo 定量参考品已溯源至国家标准品，准确度高。本试剂盒包含有外源性靶标的引物、探针和模板，通过外源性靶标检测结果来监测样本提取及试剂配制过程，避免假阴性结果。

本试剂盒可与本公司的宿主细胞残留 DNA 样品前处理试剂盒(磁珠法)配套使用，准确定量样品中 Helo 残留 DNA。

## 二、储存条件及有效期

1. 在避光-20±5℃条件下储存，有效期 12 个月。
2. 泡沫盒/箱加干冰或冰盒运输，开瓶后避光-20±5℃储存。
3. 产品批号、生产日期见外包装盒。

## 三、试剂盒规格及组分

| 组分名称                    | HCD0108-100 (100T) | 保存        |
|-------------------------|--------------------|-----------|
| Helo DNA 定量参考品 (3ng/μL) | 20μL               | -20±5℃    |
| 2×qPCR reaction buffer  | 800μL×2            | -20±5℃    |
| IC mix                  | 150μL              | -20±5℃，避光 |
| Helo primer&probe mix   | 400μL              | -20±5℃，避光 |
| DNA 稀释液                 | 1.5mL×4            | -20±5℃    |

## 四、适用机型（包括但不限于）

ABI 7500 Real-Time PCR System

SLAN-96P/S 全自动医用 PCR 分析系统

## 五、相关设备耗材

一次性无尘手套、1.5ml 无菌低吸附离心管、qPCR 专用无菌无酶八联排管或 96 孔板、1000μL、100μL、10μL 移液器和无菌低吸附带滤芯枪头、荧光定量 PCR 仪、掌式离心机、涡旋混匀仪。

## 六、检测方法

### (一) 参考品与质控品制备（样本处理区）

#### 1. **Hela DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备**

用试剂盒内的DNA 稀释液将 Hela DNA 定量参考品(3ng/μL)进行梯度稀释，稀释梯度依次为 300pg/μL、30pg/μL、3pg/μL、300fg/μL、30fg/μL，依次命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。具体操作如下：

- (1) 将试剂盒内的 Hela DNA 定量参考品置于冰上或 2~8℃下融化，待完全融化后充分混匀，瞬时离心，置于冰上备用。
- (2) 取 5 支干净的低吸附离心管，分别标记为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。
- (3) 将试剂盒内的 Hela DNA 定量参考品标记为 ST0，瞬时离心，在涡旋混匀仪上振荡 10s 混合均匀后，再次瞬时离心。
- (4) 在 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5 管中分别加入 90μLDNA 稀释液，按表 1 进行稀释操作

**表 1 Hela DNA 定量参考品稀释**

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

注：配制的标准品溶液 4℃最多可存储一天。

#### 2. 加样回收质控 ERC 的制备

根据需要设置回收质控 ERC 中 Hela DNA 的加样浓度(以制备加 30pg Hela DNA 量的样本 ERC 为例)，具体操作如下：

- (1) 取 100μL 待测样品加入 1.5mL 低吸附离心管中。
- (2) 再加入 10μL ST3，混匀，标记为样本 ERC。

注：样本 ERC 和同批待测样本一起进行前处理，制备成样本 ERC 纯化液。

#### 3. 阴性质控 NCS 的制备

取 100μL DNA 稀释液加入 1.5mL 低吸附离心管中，标记为阴性质控 NCS。

注：阴性质控 NCS 和同批待测样本一起进行前处理，制备成阴性质控 NCS 纯化液。

## (二) qPCR 反应体系配置 (试剂准备区)

1. 根据所要检测的定量参考品及待测样品的数量，计算所需反应孔数，一般每个样做 3 个重复孔。

反应孔数 = (梯度定量参考品 \* 6 + 阴性质控 NCS \* 1 + 无模板对照 NTC \* 1 + 待测样品 + 回收质控 ERC) \* 3 + 2

注：推荐每个待测样品检测时都应同时做该样本 ERC，以测定该样本的回收率；移液器误差需要多计算 2 孔的损失量。

2. qPCR 体系配置：各试剂置于冰上融化，充分融化后混匀，按表 2 配置，加入到每个反应孔中。

表 2 qPCR 反应体系

| 组分                                 | 单孔体积 |
|------------------------------------|------|
| 2×qPCR reaction buffer             | 15μL |
| Hela primer&probe mix              | 3μL  |
| IC mix /DNA 稀释液                    | 2μL  |
| 样本 DNA (定量参考品/ERC /NCS /NTC /待测样品) | 10μL |

注：内对照 IC 主要监控样本中是否含有 PCR 反应抑制物，可根据需要加入。如未加 IC mix，可用稀释液或超纯水补足相应体积。

## (三) 加样 (样本处理区)

1. 在分装好 PCR 反应液的 PCR 反应管中分别加入 10μL 处理好的样本 DNA、ERC、NCS、NTC、梯度定量参考品，表 3 为样品反应板示例。
2. 贴好封板膜，稍做离心。
3. 转移到检测区，放入相应的荧光 PCR 检测仪内，记录样本摆放顺序。

表 3 样品反应版设置示例

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

注：该示例中 ST1~ST5 表示检测的 5 个浓度的 Hela DNA 标准曲线，NCS 为 1 个阴性质控，NTC 为 1 个无模板对照，S1~S3 为待测样本和每个样本的 ERC。每个检测做 3 个重复孔。

## （四）PCR 扩增（检测区）

### 1.qPCR 程序设置

以 ABI7500 为例：

- (1) 新建实验，选择“Absolute Quantification”。
- (2) 输入实验名称，选择标曲定量模式，TaqMan reagents 和 Standard 模式。
- (3) 选择 Hela 报告荧光基团为 FAM，淬灭基团为 None。
- (4) 选择 IC（可选）报告荧光基团为 VIC，淬灭基团为 None。
- (5) 参比荧光为 ROX（可选）。
- (6) 荧光 PCR 仪上，按表 4 设置如下程序，反应体积选择 30 $\mu$ L，开始运行。

表 4 qPCR 反应程序

| 阶段  | 温度              | 时间    | 循环数 |
|-----|-----------------|-------|-----|
| 预变性 | 95 $^{\circ}$ C | 10min | 1   |
| 循环  | 95 $^{\circ}$ C | 15s   | 40  |
|     | 60 $^{\circ}$ C | 1min  |     |

注：①各实验室可根据所用机型进行设置反应程序。  
 ②IC 主要监测试剂的有效性、抑制剂等影响因素，可根据实验室情况选择是否设置。  
 ③靶标 Hela 在高浓度下，由于 PCR 扩增的竞争效应，内标 IC 的 CT 值会增大，偏离正常值。

## （五）结果分析

以 ABI7500，软件版本 2.4 为例：

1. 分析设定：设置阈值(Threshold=0.2)，基线(baseline)为 3~15 循环或仪器默认基线，查看扩增曲线是否正常。
2. 在 Plate 面板将标准曲线孔设置为“S”，并在 Quantity 分别设置稀释梯度为：3000000、300000、30000、3000、300，单位为 fg。根据标准曲线计算待测样本浓度单位为 fg/10 $\mu$ L，可在检测报告中换算为 pg/ $\mu$ L，或 fg/ $\mu$ L。
3. 查看标准曲线  $R^2$  与扩增效率是否符合标准。标准曲线判定标准为： $R^2 \geq 0.98$ ，扩增效率 Eff%：90%~110%。
4. 复孔间 Ct 值偏差 $\leq 0.5$ ，相邻的 DNA 标准品之间的  $\Delta$ CT 值应在 3.1 至 3.6 的范围内。为确保准确性，可以根据 DNA 标准品的原始 CT 值进行数据过滤。
5. 对于无模板对照 NTC 和阴性质控 NCS 的检测，其 FAM 通道结果应该是未检出（Undermined）或者大于最小标准曲线（如 ST5）的 CT 值+3。
6. 若  $Ct(S5) + 3 > Ct(NTC)$ ，表明体系存在污染，需重新实验。

注：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。

## 七、注意事项

1. 本试剂盒仅供科研使用，不用于临床诊断，使用前请仔细阅读说明书并必须严格按照说明书进行操作；
2. 应由具备专业经验或经培训合格的人员进行操作；
3. 实验室应按试剂准备区、样本处理区、反应液配置区、扩增检测分析区分隔使用。工作流程：操作过程应工作服、帽、鞋、手套等穿戴齐全，各区物品均为专用，不得交叉使用，避免污染；
4. 反应液分装时应尽量避免产生气泡，并注意防止泄露，以免荧光物质污染仪器；
5. 实验过程中若出现标本及试剂污染工作台及移液器，应及时用 10%次氯酸钠或 75%酒精处理。实验结束后应立即清洁工作台，并定期对工作台及各种实验用品进行消毒；
6. 不要使用超过有效期的试剂，不同批次的产品不能混用；
7. 加样所用的加样器需要定期检测，保证加样的准确性；
8. 为了避免样本中任何潜在的生物危险，检测样本应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤和黏膜；样本的处理建议在可防止气雾外流的生物安全柜中操作，样本制备区用过的试管、吸头需打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃；样本操作和处理均需符合相关法规要求；卫生部《微生物生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。

## 八、免责声明

试剂盒仅供研究使用，不得用于临床实验或人体实验，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。严格按照说明书操作，实验者违反说明书操作，后果由实验者承担。