

GNM E1B 残留DNA 检测试剂盒

说明书

货 号:

HCD0120-100(100T)

一、试剂盒简介

GNM E1B 残留DNA 检测试剂盒是一款专为定量检测HEK293 及其衍生细胞系的E1B 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E1B 残留DNA。检测快速、灵敏度高、特异性强，最低检测限可以达到 10copies/ μL 。试剂盒配套有 E1B 定量参考品，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E1B 残留DNA。

二、储存条件及有效期

1. 在避光-20 $\pm$ 5 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\pm$ 5 $^{\circ}\text{C}$ 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	HCD0120-100 (100T)	保存
E1B DNA 定量参考品 ($1 \times 10^7 \text{copies}/\mu\text{L}$)	20 μL	-20 $\pm$ 5 $^{\circ}\text{C}$
2 $\times$ EqPCR reaction buffer	800 $\mu\text{L} \times 2$	-20 $\pm$ 5 $^{\circ}\text{C}$
IC mix	150 μL	-20 $\pm$ 5 $^{\circ}\text{C}$ ，避光
E1B primer&probe mix	400 μL	-20 $\pm$ 5 $^{\circ}\text{C}$ ，避光
DNA 稀释液	1.5mL $\times$ 4	-20 $\pm$ 5 $^{\circ}\text{C}$

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、1000 μL 、100 μL 、10 μL 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. E1B 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 E1B DNA 定量参考品(1×10^7 copies/ μ L)进行梯度稀释, 稀释梯度依次为 1×10^6 copies/ μ L、 1×10^5 copies/ μ L、 1×10^4 copies/ μ L、 1×10^3 copies/ μ L、 1×10^2 copies/ μ L、 1×10^1 copies/ μ L, 依次命名为ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。具体操作如下:

- (1) 将试剂盒内的 E1B DNA 定量参考品置于冰上或 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 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 6 支干净的低吸附离心管, 分别标记为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。
- (3) 将试剂盒内的 E1B 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、ST6 管中分别加入 $90 \mu\text{L}$ DNA 稀释液, 按表 1 进行稀释操作

表 1 E1B DNA 定量参考品稀释

稀释管	稀释体积	浓度
ST1	$10 \mu\text{L}$ ST0+ $90 \mu\text{L}$ DNA 稀释液	1×10^6 copies/ μL
ST2	$10 \mu\text{L}$ ST1+ $90 \mu\text{L}$ DNA 稀释液	1×10^5 copies/ μL
ST3	$10 \mu\text{L}$ ST2+ $90 \mu\text{L}$ DNA 稀释液	1×10^4 copies/ μL
ST4	$10 \mu\text{L}$ ST3+ $90 \mu\text{L}$ DNA 稀释液	1×10^3 copies/ μL
ST5	$10 \mu\text{L}$ ST4+ $90 \mu\text{L}$ DNA 稀释液	1×10^2 copies/ μL
ST6	$10 \mu\text{L}$ ST5+ $90 \mu\text{L}$ DNA 稀释液	1×10^1 copies/ μL

注: 配制的标准品溶液 4°C 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 E1B DNA 的加样浓度(以制备加 1000 copies E1B DNA 量的样本ERC 为例), 具体操作如下:

- (1) 取 $100 \mu\text{L}$ 待测样品加入 1.5mL 低吸附离心管中。
- (2) 再加入 $10 \mu\text{L}$ 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 $100 \mu\text{L}$ 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)

- 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。

- 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
E1B 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。如未加内部质控 IC，可用稀释液或超纯水补足相应体积。

(三) 加样 (样本处理区)

- 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。
- 贴好封板膜，稍做离心。
- 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	ST6	ST6	ST6									
G						NCS	NCS	NCS	NTC	NTC	NTC	
H												

注：该示例中 ST1~ST6 表示检测的 6 个浓度的 E1B 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E1B 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 μ 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及抑制剂等影响因素，可根据实验室情况选择是否设置。
 ③靶标E1B 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：10000000、1000000、100000、10000、1000、100，单位为copies。根据标准曲线计算待测样本浓度单位为copies/10 μ L，可在检测报告中换算为copies/ μ L。
3. 查看标准曲线R² 与扩增效率是否符合标准。标准曲线判定标准为：R²≥0.98，扩增效率Eff%：90%~110%。
4. 复孔间Ct 值偏差≤0.5，相邻的DNA 标准品之间的 Δ 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 ST6）的CT 值+3。
6. 若Ct（ST6）+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。