

# GNM Sf9&AcNPV 残留 DNA 检测试剂盒

## (多重 qPCR-荧光探针法)

### 说明书

货 号:

**HCD0116-100(100T)**



## 一、试剂盒简介

Sf9&AcNPV 残留 DNA 检测试剂盒是一款专为定量检测昆虫细胞（Sf9）杆状病毒表达系统来源的基因工程疫苗中残留的 Sf9 细胞 DNA 和杆状病毒（AcNPV）DNA 而设计的的专用试剂盒。

本试剂盒采用了多重 qPCR 荧光探针技术，定量检测样品中 Sf9 和 AcNPV 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 Sf9&AcNPV 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。

本试剂盒可与核酸提取或纯化试剂配套使用，准确定量样品中的 Sf9&AcNPV 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                       | HCD0116-100 (100T) | 保存        |
|----------------------------|--------------------|-----------|
| Sf9&AcNPV DNA 定量参考品        | 20μL               | -20±5℃    |
| 2×qPCR reaction buffer     | 800μL×2            | -20±5℃    |
| IC mix                     | 150μL              | -20±5℃，避光 |
| Sf9&AcNPV 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. Sf9&AcNPV DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

定量参考品浓度标注于管壁标签。其中 Sf9 DNA 浓度为 3 ng/μL；AcNPV DNA 拷贝数为  $1 \times 10^8$  copies/μL。用试剂盒内的 DNA 稀释液将 Sf9&AcNPV DNA 定量参考品进行梯度稀释，依次命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。具体操作如下：

- (1) 将试剂盒内的 Sf9&AcNPV 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 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 Sf9&AcNPV 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 μL DNA 稀释液。
- (5) 按表 1 进行稀释操作

表 1 Sf9&AcNPV DNA 定量参考品稀释

| 稀释管 | 稀释体积                   | Sf9 (pg/μL) | AcNPV (copies/μL) |
|-----|------------------------|-------------|-------------------|
| ST1 | 10 μL ST0+90μL DNA 稀释液 | 300         | $1 \times 10^7$   |
| ST2 | 10 μL ST1+90μL DNA 稀释液 | 30          | $1 \times 10^6$   |
| ST3 | 10 μL ST2+90μL DNA 稀释液 | 3           | $1 \times 10^5$   |
| ST4 | 10 μL ST3+90μL DNA 稀释液 | 0.3         | $1 \times 10^4$   |
| ST5 | 10 μL ST4+90μL DNA 稀释液 | 0.03        | $1 \times 10^3$   |
| ST6 | 10 μL ST4+90μL DNA 稀释液 | 0.003       | $1 \times 10^2$   |

注：配制的标准品溶液 4℃ 最多可存储一天。

#### 2. 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)×3+2

注: 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 |
| Sf9&AcNPV primer&probe mix    | 3μL  |
| IC mix /DNA 稀释液               | 2μL  |
| 样本 DNA (定量参考品/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、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  |     |     |     |    |
| C | ST3 | ST3 | ST3 |   |   | S2  | S2  | S2  |     |     |     |    |
| D | ST4 | ST4 | ST4 |   |   | S3  | S3  | S3  |     |     |     |    |
| 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 Sf9&AcNPV 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。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 Sf9 报告荧光基团为 FAM，淬灭基团为 None。
- (4) 选择 AcNPV 报告荧光基团为 CY5，淬灭基团为 None
- (5) 选择 IC（可选）报告荧光基团为 VIC，淬灭基团为 None。
- (6) 参比荧光为 ROX（可选）。
- (7) 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 Sf9&AcNPV 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 将 Sf9 通道的标准品分别设置稀释梯度为：3000000、300000、30000、3000、300、30，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. 在 Plate 面板将标准曲线孔设置为“S”，并在 Quantity 将 AcNPV 通道的标准品分别设置稀释梯度为：100000000、10000000、1000000、100000、10000、1000，单位为 copies。根据标准曲线计算待测样本浓度单位为 copies/10  $\mu$  L，可在检测报告中换算为 copies/  $\mu$  L。
4. 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%。
5. 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。
6. 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。

7. 若  $Ct(S6) + 3 > Ct(NTC)$ ，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。

