

HEK293 细胞残留 DNA 片段分析检测试剂盒 (qPCR- 荧光探针法) 说明书

本试剂盒专用于科研，而非用于诊断

Cat. No. HG-HF002

产品简介

本试剂盒是用于定量检测各种生物制品的中间品、半成品及成品中 HEK293 细胞 DNA 残留片段大小分布的专用试剂盒。

本试剂盒利用 PCR 荧光探针法原理，定量检测样本中 HEK293 细胞 DNA 残留片段大小分布，本试剂盒设计三种不同的扩增片段 (99bp、200bp、307bp)，用 HEK293 细胞 DNA 定量参考品分别对不同的扩增片段制作标曲，通过不同大小片段的比值分析样本中 HEK293 细胞残留 DNA 的片段分布情况。

规格

3 × 100 Reactions

产品组成

表 1 试剂盒组分

序号	组分	装量 / 管	数量	存储条件
1	HEK293 Primer&Probe MIX-99	300μL	1	-20°C, 避光保存
2	HEK293 Primer&Probe MIX-200	300μL	1	-20°C, 避光保存
3	HEK293 Primer&Probe MIX-307	300μL	1	-20°C, 避光保存
4	HEK293 DNA 定量参考品	60μL	1	-20°C
5	2×Probe qPCR Mix	1.25mL	4	-20°C
6	DNA 稀释液	1mL	4	-20°C
7	IPC Mix	450μL	1	-20°C, 避光保存
8	ROX High*	200μL	1	-20°C, 避光保存
9	ROX Low*	200μL	1	-20°C, 避光保存

* 请对应机型选择适配的 ROX，如上表中未查询到对应机型可咨我司或仪器厂家。

储存条件与有效期

-20°C 储存，有效期 18 个月。

适用机型 (包括但不限于)

- ◆ ABI PRISM 7500
- ◆ FQD-96A (博日)
- ◆ CFX96 (Bio-Rad)
- ◆ Roche Light Cycler 480

配合不同机型使用时，请注意选择适配的参比染料 ROX，如上表中未查询到对应机型可咨我司或仪器厂家。

仪器	ROX 参比染料
Applied Biosystems [®] 5700, 7000, 7300, 7700, 7900HT, StepOne [™] , and StepOnePlus [™]	ROX High
Applied Biosystems [®] 7500, ViiATM 7, QuantStudio [™] 12K Flex, Agilent Mx3000P [™] , Mx3005P [™] , and Mx4000 [™]	ROX Low
Rotor-Gene [™] , DNA Engine Opticon [™] , Opticon [™] 2, Chromo 4 [™] Real-Time Detector, Mastercycler [®] ep realplex, Smart Cycler [®] , Roche LightCycle [®] 480, Roche LightCycler [®] Nano, Bio-Rad CFX96, and Illumina Eco [™]	No ROX

用户自备材料

- ◆ 1.5mL 或 2mL 无菌低吸附离心管
- ◆ 离心机
- ◆ 荧光定量 PCR 仪
- ◆ 与 PCR 仪适配的 96 孔 qPCR 板或八联排管
- ◆ 震荡器
- ◆ 1000μL, 200μL, 10μL 无菌低吸附带滤芯枪头
- ◆ 各规格移液器 (如 1000μL, 200μL, 10μL, 2.5μL 等)

操作步骤

一、HEK293 DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

用试剂盒中提供的 DNA 稀释液将 HEK293 DNA 定量参考品 (浓度为 3ng/μL) 进行梯度稀释, 稀释浓度依次为 3×10^5 fg/μL、 3×10^4 fg/μL、 3×10^3 fg/μL、 3×10^2 fg/μL、 3×10^1 fg/μL。具体操作如下:

1. 将试剂盒中 HEK293 DNA 定量参考品和 DNA 稀释液置于冰上, 待完全融化后, 轻微振荡混匀, 短暂离心将液体甩至管底。
2. 取 5 支干净的 1.5mL 离心管, 分别标记为 ST1, ST2, ST3, ST4, ST5。
3. 在 ST1, ST2, ST3, ST4, ST5 管中分别加入 180μL DNA 稀释液。
4. 按表 2 依次进行 5 次稀释操作, 每次稀释后确保充分混匀后再进行下一个梯度的稀释。如先取 20μL HEK293 DNA 定量参考品加入步骤 3 准备好的 ST1 管中, 轻微振荡充分混匀, 短暂离心将液体甩至管底; 然后再取 20μL ST1 中的标准品加入步骤 3 准备好的 ST2 管中……依次稀释。

表 2. 标准品稀释过程

标准品代号	稀释体积	浓度
ST1	180μL DNA 稀释液 +20μL HEK293 DNA 定量参考品	3×10^5 fg/μL
ST2	180μL DNA 稀释液 +20μL ST1	3×10^4 fg/μL
ST3	180μL DNA 稀释液 +20μL ST2	3×10^3 fg/μL
ST4	180μL DNA 稀释液 +20μL ST3	3×10^2 fg/μL
ST5	180μL DNA 稀释液 +20μL ST4	3×10^1 fg/μL

二、阴性质控 NCS 及 NTC 的准备

取 100μL DNA 稀释液加入 1.5mL 干净的离心管中, 标记为阴性质控 NCS。

阴性质控 NCS 可和同批待测样本一起进行样本前处理, 制备成阴性质控 NCS 纯化液。

qPCR 反应加样时, 加入 10μL DNA 稀释液即为阴性对照 NTC。

注: 为了满足同步进行三个不同扩增长度的片段分析检测需求, 样本前处理中 DNA 洗脱体积需要 $\geq 100\mu\text{L}$ 。

三、加标体系制备

加标回收 ERC: 建议 90uL 样品 +10uLST3, 也可根据实际情况按照其他方式制备。

加标回收率计算: ERC 回收率在 50%~150% 之间 (加标回收率 =ERC/(0.9* 样品 +0.1*ST3))

四、qPCR 反应液的制备

1. 从冰箱里取出各试剂置于冰上。
2. 根据所要检测的标准曲线及待测样本数量，计算所需反应孔数，一般做 3 个重复孔 / 样。即反应孔数 = (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 + 待测样本数量) × 3。
3. 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR 反应液总量：qPCR 反应液 = (反应孔数 + 2) × 20μL (含有 2 孔的损失量)。
4. 待各试剂放在冰上充分融化后，参考表 3、4、5 所示并组合反应孔数准备对应扩增片段的 qPCR 反应液，并充分混匀。

表 3. 99bp qPCR 反应液配制表

组分	单孔反应
2×Probe qPCR Mix	15μL
HEK293 Primer&Probe MIX-99	3μL
IPC Mix	1.4μL
ROX*	0.6μL
总体积	20μL

表 4. 200bp qPCR 反应液配制表

组分	单孔反应
2×Probe qPCR Mix	15μL
HEK293 Primer&Probe MIX-200	3μL
IPC Mix	1.4μL
ROX*	0.6μL
总体积	20μL

表 5. 307bp qPCR 反应液配制表

组分	单孔反应
2×Probe qPCR Mix	15μL
HEK293 Primer&Probe MIX-307	3μL
IPC Mix	1.4μL
ROX*	0.6μL
总体积	20μL

* 请对应机型选择适配的 ROX；若机型适配为 no ROX，请加入等体积的去离子水（要求无核酸及核酸酶污染级去离子水）。

五、上样

1. 将配制的各 qPCR 反应液轻微振荡混匀，短暂离心将液体甩至管底。按 20μL / 孔加入排版设计（如表 9 示例或按个人设计调整）对应的孔中，选择对应扩增片段参考表 6、7、8 所示加样，加样后每孔总体积 30μL。

表 6. 99bp 各反应孔加样示例

ST-99bp	20μL 99bp qPCR 反应液 + 10μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	20μL 99bp qPCR 反应液 + 10μL DNA 稀释液
NCS	20μL 99bp qPCR 反应液 + 10μL 阴性质控 NCS 纯化液
待测样本	20μL 99bp qPCR 反应液 + 10μL 待测样本

表 7. 200bp 各反应孔加样示例

ST-200bp	20μL 200bp qPCR 反应液 + 10μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	20μL 200bp qPCR 反应液 + 10μL DNA 稀释液
NCS	20μL 200bp qPCR 反应液 + 10μL 阴性质控 NCS 纯化液
待测样本	20μL 200bp qPCR 反应液 + 10μL 待测样本

表 8. 307bp 各反应孔加样示例

ST-307bp	20μL 307bp qPCR 反应液 + 10μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	20μL 307bp qPCR 反应液 + 10μL DNA 稀释液
NCS	20μL 307bp qPCR 反应液 + 10μL 阴性质控 NCS 纯化液
待测样本	20μL 307bp qPCR 反应液 + 10μL 待测样本

表 9 96 孔板排版示例

99bp				200bp				307bp				
ST1	ST1	ST1	S2	ST1	ST1	ST1	S2	ST1	ST1	ST1	S2	A
ST2	ST2	ST2	S2	ST2	ST2	ST2	S2	ST2	ST2	ST2	S2	B
ST3	ST3	ST3	S2	ST3	ST3	ST3	S2	ST3	ST3	ST3	S2	C
ST4	ST4	ST4	S3	ST4	ST4	ST4	S3	ST4	ST4	ST4	S3	D
ST5	ST5	ST5	S3	ST5	ST5	ST5	S3	ST5	ST5	ST5	S3	E
S1	S1	S1	S3	S1	S1	S1	S3	S1	S1	S1	S3	F
NTC	NTC	NTC		NTC	NTC	NTC		NTC	NTC	NTC		G
NCS	NCS	NCS		NCS	NCS	NCS		NCS	NCS	NCS		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 DNA 标准曲线、1 个无模板对 NTC、1 个阴性质控 NCS、3 个待测样本。每个检测做 3 个重复孔。也可根据自己的使用习惯进行设计排版。

2. 将 96 孔板用光学膜封闭，轻微震荡混匀，用 96 孔板专用离心机短暂离心装液体全部甩至管底后放入 qPCR 仪中。

六、上机

以 ABI 公司 7500 qPCR 仪，软件版本 V2.0.6 为例。

1. 创建空白新程序，选择绝对定量检测模板，taqman 探针法。
2. 三组 qPCR 反应液创建新检测探针，分别命名为 99bp、200bp、307bp，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。
3. 将板上标准品对应的孔选择为 Standard，分别赋值为 3×10^5 、 3×10^4 、 3×10^3 、 3×10^2 、 3×10^1 （单位为 fg/ μ L），并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5；NTC 选择 Negative Control，NCS 和待测样品孔选择为 Unknow，并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 NTC、NCS、S1、S2、S3。
4. 设置三步法反应程序：95°C 5min；95°C 15s，58°C 30s，72°C 1 min，45 个循环；反应体积 30 μ L。
5. 运行 PCR 程序。

七、qPCR 结果分析

1. 在 Results 的 Amplification Plot 中，可初步查看扩增曲线的形态是否正常。机器通常会自动设置阈值（Threshold）和基线（Baseline），当 target 设置等不同时可能会出现多个阈值，而导致结果分析有误，此时请手动设置阈值线，但需确保设置的阈值线在指数扩增区，如通常 Threshold 设置为 0.15，选择 Auto Baseline，点击 Analyze，可看到调整后的结果。
2. 数据可靠性分析：
 - 三个平行孔间 Ct 值差应小于 1.0，Ct 值大于 35 的孔除外；
 - 阴性对照 NTC 和 NCS 的 CT 值都应大于标曲最低浓度的 CT 值或根据实验室自身验证结果设定标准；
 - 标准曲线相关系数 $R^2 \geq 0.98$ ，扩增效率 85%~110% 之间；
 - ERC 回收率在 50%~150% 之间；
3. 以 99bp 片段的待测样本检测值为 100%，计算 200bp 片段、307bp 片段的待测样本百分比。

免责声明

在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。

