

E1A&SV40LTA 残留 DNA 检测 试剂盒 (多重 qPCR 荧光探针法) 说明书

Cat.No. HG-EA003

本试剂盒专用于科研，而非用于诊断

目录 | CONTENTS

1. 产品简介	1
2. 产品应用	1
3. 产品规格	1
4. 产品组分	1
5. 储存条件及有效期	2
6. 定义或术语	2
7. 需要准备的耗材与设备	2
8. 注意事项	2
9. 实验步骤	3
10. qPCR 结果分析	6
11. 示例图（以 Bio-Rad 平台为例）	7
12. 故障排除	8
13. 联系方式	9
14. 买方须知	9



1. 产品简介

HEK293 细胞系等用于慢病毒和腺相关病毒等的生产，在病毒载体生产工艺中，不仅会不可避免的产生宿主细胞残留 DNA 和 RNA 杂质，还会产生 SV40 大 T 抗原 (LTA) 残留 DNA、E1A 和 E1B 残留 DNA 等杂质。这些杂质不仅会降低病毒载体相关药物的有效性，还可能带来传染性或致癌性等安全问题。因此，各国的监管机构都对生物制品中残余 DNA 的含量进行了严格管控。CDE (国家药品监督管理局药品审评中心) 最新颁布的 2022 年 5 月的《体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则 (试行)》和《体外基因修饰系统药学研究与评价技术指导原则 (试行)》中都提到包装病毒载体用细胞库，如 HEK293T 细胞，对其携带的具有潜在安全性风险的 Adv E1A 序列和 SV40 大 T 抗原序列，均应进行残留控制。

针对上述情况，谱新生物自主研发了 E1A&SV40LTA 残留 DNA 检测试剂盒，采用多重 qPCR 荧光探针法分别特异性扩增 E1A 序列和 SV40 LTA 序列。本试剂盒利用荧光探针原理，采用多重 qPCR 方法，检测快速，专一性强，最低检测限可以达到 40 copies/ μ L。

配套 Hillgene 的样品前处理试剂盒 (货号为 HG-CL100) 进行样品的前处理。

试剂盒配套有质粒定量参考品 (已完成标准品溯源)。

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

2. 产品应用

E1A & SV40LTA 残留 DNA 检测试剂盒能快速、特异地检测生物制品中宿主细胞来源的 E1A 和 SV40LTA 的 DNA 残留。

3. 产品规格

产品名称	产品货号	产品规格
E1A&SV40LTA 残留 DNA 检测试剂盒 (多重 qPCR 荧光探针法)	HG-EA003	100 Reactions/ 盒

4. 产品组分

组分	规格	存储条件
E1A&SV40LTA 定量参考品 (4×10^7 copies/ μ L)	50 μ L \times 1 管	-20°C
E1A&SV40LTA Primer&Probe MIX	550 μ L \times 1 管	
2 \times qPCR Reaction Buffer	1.2 mL \times 1 管	
DNA 稀释液	1.5 mL \times 3 管	
ROX High	50 μ L \times 1 管	
ROX Low	50 μ L \times 1 管	

备注: 产品适配包括但不限于 ABI7500、BioRad CFX96、博日 FQD-96A、Roche Light Cycler 480 等实时定量荧光 PCR 仪器。

5. 储存条件及有效期

存储条件见上表，有效期 18 个月。开封后未使用完的试剂盒注意仍在规定储存条件下保存。

6. 定义或术语

- ◆ 无模板空白对照 (No Template Control, NTC): NTC 是指不含有模板（阳性模板或者阴性模板）的对照。目前的试剂盒的 NTC 一般都是无酶水或稀释液。
- ◆ 阴性质控 (Negative Control Sample, NCS) : 阴性质控是指在相同的处理条件下，比如一份已知的未感染样品，都进行了提取和扩增最终获得了阴性结果。阴性质控强调处理过程与样品一致，并且有明确的预期结果。
- ◆ 加标对照 (Extraction Recovery Control, ERC) : 加标对照是样本和标准品按照一定的比例混合后，按照检测样本的方式进行提取和扩增，对最终的扩增结果中标准品的含量进行计算，用于监测整个样本检测过程的准确性。

7. 需要准备的试剂、耗材与设备

实验前请准备好下列试剂、耗材与设备：

- ◆ 无酶水
- ◆ 生物安全柜
- ◆ 与 PCR 仪适配的 96 孔 qPCR 板或八联排管
- ◆ 荧光定量 PCR 仪
- ◆ 各规格移液器（如 1000 μ L，200 μ L，10 μ L 等）
- ◆ 无水乙醇（分析纯）
- ◆ 异丙醇（分析纯）
- ◆ 磁力架
- ◆ 超净工作台
- ◆ 1.5 mL 或 2 mL 无菌低吸附离心管
- ◆ 1000 μ L，200 μ L，10 μ L 等无菌低吸附带滤芯枪头
- ◆ 离心机
- ◆ 水浴锅 / 金属浴
- ◆ 1 \times PBS 缓冲液
- ◆ 涡旋仪

8. 注意事项

- ◆ 本试剂盒已通过稳定性（冻融等因素）的验证，无需分装。
- ◆ 阴性样品和阳性样品（参考品和待测样品等）的配制环境需区分区域，不可在一个区域内操作，配制人员需穿戴整齐，戴好口罩、手套和穿好洁净服。
- ◆ 注意在不同加样步骤间及时更换吸头，避免交叉污染，避免长时间开盖。
- ◆ 试剂盒必须在有效期内使用。
- ◆ 试剂盒内所有组分建议在低温环境融化后使用。
- ◆ 只有严格遵守说明书的操作方法，全部使用本试剂盒配套的试剂才能保证最佳检测效果。
- ◆ 样本前处理实验尽量在当天完成，纯化后立即进行后续 qPCR 检测，以保证检测结果的准确性。
- ◆ 最终的试验结果与试剂的有效性、操作者的操作方法及试验环境密切相关。
- ◆ 公司只对试剂盒本身负责，不对因使用该试剂盒所造成的样本消耗负责，请使用者使用前充分考虑到样本的可能使用量，

预留充足的样本。

◆ 本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断。

9. 实验步骤

9.1. 检测流程图



9.2. 准备工作

样本前处理方法建议采用 Hillgene 的宿主细胞残留 DNA (磁珠法) 样本前处理试剂盒。(货号: HG-CL100)

9.2.1. 每次试验需要在干净的试剂瓶中使用无水乙醇和灭菌过的超纯水配制成新鲜的 80% 乙醇。

9.2.2. 取出酵母 tRNA、糖原，置于冰盒上融化；取出蛋白酶 K，室温下融化。

9.2.3. 单个样本的结合液的准备：9 μL 糖原 + 0.2 μL 酵母 tRNA (如果提取酵母 DNA，结合液中不加酵母 tRNA)。注：为了减少配制误差，建议每次最低按照 10 个样本的量进行配制，即酵母 tRNA 单次吸液量不少于 2 μL 。

9.2.4. 洗涤液准备：洗涤液使用前加 30 mL 的无水乙醇，充分混匀后使用，同时做好标记，每次使用后将瓶盖盖紧，以保持瓶中的无水乙醇含量。

9.2.5. 打开金属浴，调节温度至 65°C。

9.3. 标准品稀释

取出完全融化后的 E1A&SV40LTA 定量标准品 (4×10^7 copies/ μL)，轻弹数下混匀，在复合转子离心机上 6000 转快速离心 3 秒，如此重复 3 次。取 6 支干净的 1.5 mL 离心管，分别标记为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5 和 ST6。稀释方法如下：(标准品稀释按照吹打混匀的方式进行，即连续进行 20 次匀速吹打混匀，不要产生气泡。标准品冻融次数应不大于 5 次。)

稀释管	稀释体积	浓度 (copies/ μL)	
		SV40LTA	E1A
ST1	10 μL 定量参考品 + 90 μL DNA 稀释液	4×10^6	4×10^6
ST2	10 μL ST1 + 90 μL DNA 稀释液	4×10^5	4×10^5
ST3	10 μL ST2 + 90 μL DNA 稀释液	4×10^4	4×10^4
ST4	10 μL ST3 + 90 μL DNA 稀释液	4×10^3	4×10^3
ST5	10 μL ST4 + 90 μL DNA 稀释液	4×10^2	4×10^2
ST6	10 μL ST5 + 90 μL DNA 稀释液	4×10^1	4×10^1

9.4. 样本准备：

9.4.1. 检测样本：取 100 μL 慢病毒制剂或者其他中间过程样本作为检测样本。

9.4.2. 加标样本：取 90 μL 慢病毒制剂或者其他中间过程样本，加入 10 μL ST3 (示例) 作为加标样本 ERC。(备注：加标体系中，建议标准品的总量应为样本总量的 1~10 倍最佳)

9.4.3. 阴性质控：取 100 μL 1×PBS 作为阴性质控 NCS，参与提取和扩增。

9.4.4. 无模板对照：取 100 μL DNA 稀释液作为无模板对照 NTC。

9.5. 提取步骤：

9.5.1. 每个待处理样本振荡混匀后取 100 μL 于 1.5 mL 离心管中，待进一步提取。

9.5.2. 每个 100 μL 样本中加入 25 μL 裂解液和 10 μL 蛋白酶 K，涡旋震荡 30 秒，瞬时离心，65 °C 孵育 15 分钟。

9.5.3. 孵育完成后将离心管瞬时离心，之后依次加入 9.2 μL 结合液、50 μL 裂解液和 150 μL 异丙醇，20 μL 磁珠（磁珠使用前需充分混匀，确保每次加入的磁珠量均一致，以免造成 DNA 得率不一致），涡旋振荡 5 分钟，快速离心 10 秒。

9.5.4. 将离心管置于磁力架，轻轻地左右转动，静止 3min 待磁珠聚集于贴近磁力架的管壁后，保持离心管固定于磁力架上，用移液枪吸去上清，注意不要触碰磁珠。

9.5.5. 加入 500 μL 洗涤液（使用前请先检查是否已加入无水乙醇），涡旋振荡 30 秒，确保磁珠分散，离心管壁无聚集磁珠。快速离心 10 秒后将离心管重新置于磁力架上轻轻地左右转动，待磁珠聚集于贴近磁力架的管壁后，静置 1 分钟，用移液器小心吸去上清。

9.5.6. 加入 500 μL 新鲜配制的 80 % 乙醇，涡旋振荡 30 秒，确保磁珠分散，离心管壁无聚集磁珠。快速离心 10 秒后将离心管重新置于磁力架上轻轻地左右转动，待磁珠聚集于贴近磁力架的管壁后，静置 1 分钟，用移液器小心吸去上清。

9.5.7. 为保证尽量吸出残留乙醇，可将离心管快速离心 10 秒后，置于磁力架上静置 1min，然后用 10 μL 移液器吸出残留乙醇。

9.5.8. 打开管盖室温 (18-25°C) 干燥 3-5 分钟 (干燥时间依具体情况进行延长或缩短；肉眼随时注意观察，避免磁珠过分干燥)。

注：干燥过程中磁珠过干或有乙醇残留都会影响样本回收率。干燥也可选择鼓风干燥，一般建议鼓风干燥 2 分钟。

9.5.9. 将离心管从磁力架取下，每管加入 100 μL 已经预热至 70°C 的洗脱液，涡旋振荡 1 分钟，70°C 孵育 7 分钟，期间每 2-3 分钟涡旋混匀一次。

9.5.10. 孵育完成后，将离心管高速 12000g 离心 1 分钟，然后静置于磁力架上，静置 3min 待磁珠分离后，用移液器小心转移 90 μL 上清到新的 1.5 mL 离心管中，所得为样本纯化液。

9.6. 多重 qPCR- 荧光探针法检测

9.6.1. 取出 E1A&SV40LTA Primer&Probe MIX、2x qPCR Reaction Buffer 置于冰上融化。

9.6.2. qPCR 反应液的准备

计算所需反应孔数，根据反应孔数计算本次所需的 qPCR MIX 量，配制 qPCR MIX 根据所需检测的标准样品和待测样品数量（一般做 3 个复孔），计算所需孔数：反应孔数 = (6 个浓度梯度的标曲 + NCS + NTC + ERC + 待测样品) × 3。根据反应孔数计算本次所需的 qPCR Mix 总量：qPCR Mix = (反应孔数 + 2 或 3) × 15 μL (2 或 3 为操作损失量)

按下表所示配制 qPCR Mix。

组分	单个反应量 (μL)
2×qPCR Reaction Buffer	10
E1A&SV40LTA Primer&Probe Mix	4.6
ROX	0.4
总体积	15

备注：对于不需要添加 ROX 的仪器，可用无菌无酶水替代。请参考下表查找对应机型选择适配的 ROX，如表中未查询到对应机型可咨询我司或仪器厂家。

仪器	ROX 参比染料
ABI 5700, 7000, 7300, 7700, 7900HT Fast, StepOne, StepOne Plus	ROX High
ABI 7500, 7500 Fast, ViiA7, QuantStudio 3 and 5, QuantStudio 6,7,12k Flex. Stratagene MX3000P, MX3005P, MX4000P	ROX Low
Bio-Rad CFX96, CFX384, iCycler iQ, iQ 5, MyiQ, MiniOpticon, Opticon, Opticon 2, Chromo4. Roche Applied Science LightCycler 480, LightCycler 2.0; Lightcycler 96. Eppendorf Mastercycler ep realplex, realplex 2 s. Qiagen Corbett Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000. Thermo Scientific PikoReal Cyler. Cepheid SmartCyler. Illumina Eco qPCR	No ROX

9.6.3. qPCR 反应液的配制：

分取 5 μ L ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6、NTC、NCS、ERC 和待测样品纯化液，加入到每孔装有 15 μ L qPCR MIX 的八联管中。按下表所示加样。（总体积 20 μ L）

参考品	15 μ L qPCR Mix + 5 μ L ST1/2/3/4/5/6
对照样本	15 μ L qPCR Mix + 5 μ L NTC/NCS/ERC
待测样品	15 μ L qPCR Mix + 5 μ L 待测样本

每个样品做 3 个平行，每个样本 ERC 做 3 个平行，在复合转子离心机上 6000 转离心 10 秒，去除八联管中的气泡。

9.6.4. 反应孔排版示例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ST1	ST1	ST1							S1	S1	S1
B	ST2	ST2	ST2							S2	S2	S2
C	ST3	ST3	ST3							S3	S3	S3
D	ST4	ST4	ST4									
E	ST5	ST5	ST5									
F	ST6	ST6	ST6							ERC-S1	ERC-S1	ERC-S1
G					NTC	NTC	NTC			ERC-S2	ERC-S2	ERC-S2
H					NCS	NCS	NCS			ERC-S3	ERC-S3	ERC-S3

备注：ST 代表标准品，NTC 代表无模板对照，NCS 代表阴性质控，ERC 代表加标对照，S 代表待测样本。

9.7. qPCR 反应程序和参数设置

以 BIO-RAD 公司 CFX96 qPCR 仪为例。

9.7.1.创建实验反应程序，设置两步法反应程序如下表：

Stage1	预变性	Reps:1	95°C	3 分钟
Stage2	循环反应	Reps:40	95°C	15 秒
			60°C	60 秒

注：反应体积 20 μL。程序中 60°C 60 秒处设置为荧光收集。其他型号的设备，如遇问题可咨我司或仪器厂家。

9.7.2.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 E1A-DNA；勾选荧光 CY5，Target Name 命名为 SV40LTA-DNA；按照预先的设计编辑标准品、NTC、NCS、加标回收和待测样本等的信息。将样品板文件保存到目标文件夹。（备注：如仪器要求设置猝灭基团与参比荧光：猝灭基团为 None，参比荧光为 ROX。）

9.7.3.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 E1A-DNA；勾选荧光 CY5，Target Name 命名为 SV40LTA-DNA；输入每个稀释梯度的重复次数。分别在 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6 的 Concentration 一栏赋值为 4.00E+06、4.00E+05、4.00E+04、4.00E+03、4.00E+02、4.00E+01（单位为 copies/μL）。

9.7.4.点击 Run 界面“Start Run”按钮进行 PCR 测定。

10. qPCR 结果分析

以 BIO-RAD 公司 CFX96 qPCR 仪为例。

10.1. 数据处理：

10.1.1. 反应结束后，仪器会自动设置基线和阈值。可以根据经验调整阈值，以改善线性和扩增效率，优化三复孔的偏差。

10.1.2. 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）、R²。

10.1.3. 在视窗 Quantitation Data 中，SQ Mean 一栏可读取无模板对照 NTC、待测样本的检测值，单位为 copies/μL。

10.1.4. 点击“工具 > 报告”，或单击“数据分析”窗口中工具栏上的报告按钮，出现“报告”窗口。在选项列表勾选标题、运行设置、定量数据，勾选“Notes”后可以输入备注信息。在选项窗格输入标题，调整字体格式，或者调用之前保存的模板，点击“Update Report”更新预览，确认无误后，点击“文件 > 保存”，将结果保存为 PDF 格式。

10.1.5. 计算公式：

SV40LTA 基因残留量 (copies/mL) = SV40LTA 基因残留检测值 (copies/μL) × 稀释倍数 × 1000

E1A 基因残留量 (copies/mL) = E1A 基因残留检测值 (copies/μL) × 稀释倍数 × 1000

10.1.6. 回收率计算公式

$$\text{回收率 (\%)} = \frac{(\text{加标检测浓度} \times \text{总体积}) - (\text{供试品检测浓度} \times \text{样本体积})}{\text{加标理论浓度} \times \text{加标体积}} \times 100\%$$

10.2. 系统适应性判定

10.2.1. 三个平行孔间的 Ct 值变异系数 CV ≤ 5%，Ct 值大于 35 的孔除外；

10.2.2. R² ≥ 0.990，扩增效率 Effective: 85%~110%；

10.2.3. NTC 应无 Ct 值或 Ct 均值大于标准曲线最低浓度 2 个 Ct 均值以上；

10.2.4. NCS 的 Ct 均值应大于标准曲线最低浓度 Ct 均值；

10.2.5. ERC 加标回收率应满足 50%~150%。

11. 示例图 (以 Bio-Rad 平台为例)

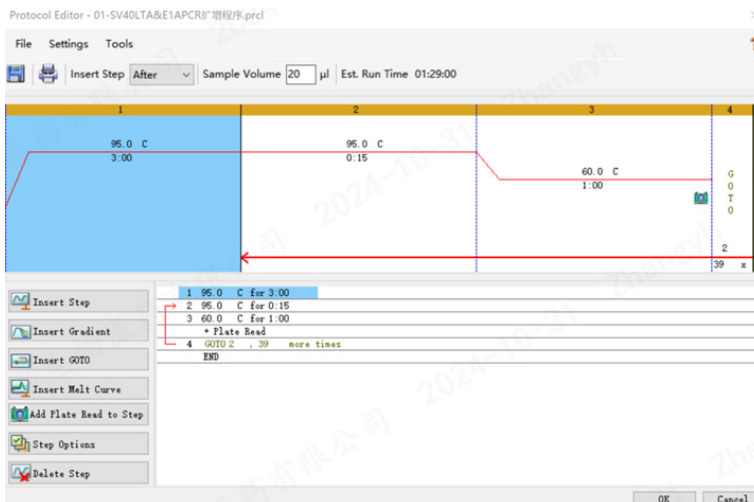


图 1: PCR 扩增程序示例图

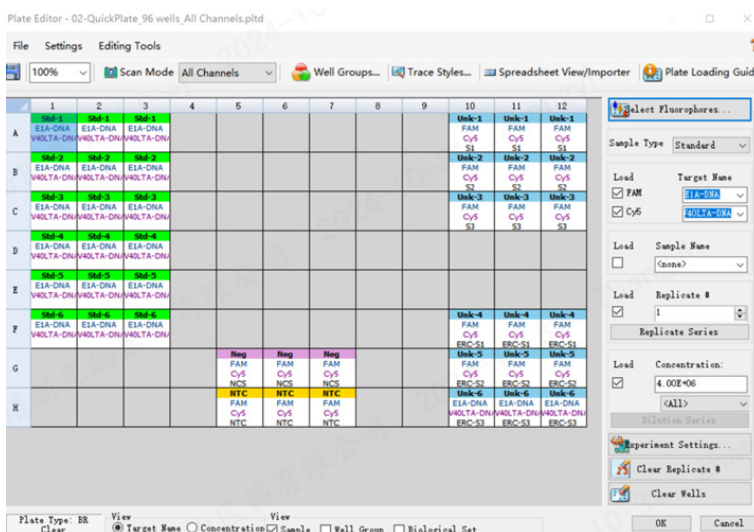


图 2: PCR 扩增板间布局示例图

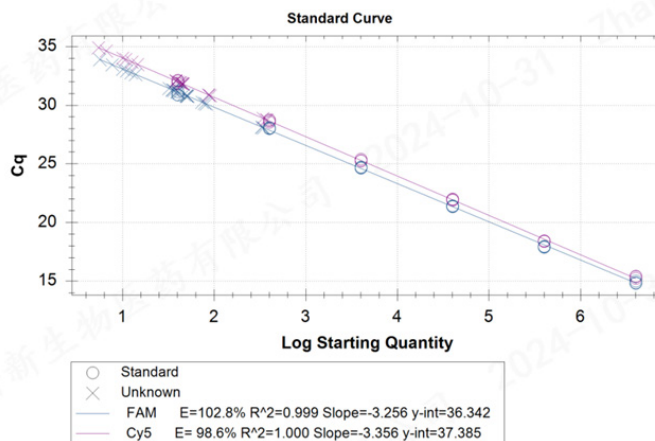


图 3: 扩增曲线示例图

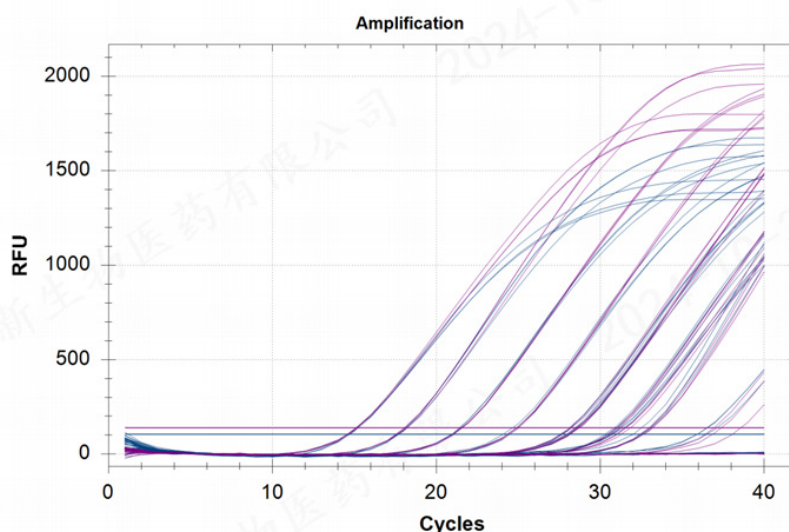


图 4：扩增曲线示例图

12. 故障排除

序号	问题描述	可能原因	相应对策
1	无 CT 值	PCR 程序设置错误，检测荧光信号的步骤有误	检查程序设置中荧光选择及收集位置是否正确
		引物或探针降解	可通过 PAGE 电泳检测引物和探针是否降解
		模板可能降解或上样量不足	如果发生模板降解，应考虑样本准备中杂质的引入及反复冻融的情况
2	数值不在标准范围内	配制反应体系时计算出现错误	体系配制计算时，多次复核计算结果
3	标准曲线不佳	DNA 定量参考品稀释、混匀或者加样误差，使得参考品不呈梯度	移液设备应精确，移液时液体未出现挂壁现象，液体每一步转移前应充分混匀（查看 ROX 线是否异常），稀释倍数应合理，移液时应注意液体是否有按规定体积转移
		参考品出现降解	参考品反复冻融应在指定次数内
		模板中存在抑制物	查看 ROX 线是否异常，重新稀释模板。
4	CT 值过晚	PCR 各种反应成分的降解或加样量的不足	查看 ROX 线是否异常，跑胶验证反应成分是否降解，减少稀释度重复实验
		模板中存在抑制物	查看 ROX 线是否异常，重新稀释模板。
5	阴性对照扩增有信号	反应体系组分（如，DNA 稀释液）被污染	实验过程中，更换新的 Mix 重复实验；反应体系在超净工作台内配制
		标本间的交叉污染或产物污染；操作环境中有气溶胶造成污染	对实验室进行严格的区分，减少气溶胶污染；使用带滤芯的枪头；建议对操作环境进行处理，或者更换新的环境、加样器、枪头等
		仪器或 PCR 管壁有荧光染料残留	清洁仪器，做背景测试和校准；更换管材，使用管材应避免荧光染料污染

6	扩增曲线异常	模板的浓度太高或者降解或者体系未混匀以及充分溶解; 荧光染料的降解;	查看 ROX 线以及相应多组分图线是否异常, 重新稀释
		液体挥发, 耗材气密性等问题引起液体蒸发, 没有很好地聚集在管底; 操作问题如移液枪加样引起的气泡问题。	上机前确认管材是否密封, 仔细检查反应管内是否有气泡残留, 程序结束取出时注意查看液体体积是否异常
		仪器设置不当引起的曲线异常	基线设置不当, 如扩增曲线断裂或下滑: 基线的终点值大于 Ct 值。减小基线终点 (Ct 值 - 4), 重新分析数据。
7	扩增效率低	荧光染料是否降解	查看 ROX 线以及相应多组分图线是否异常, 重新稀释
		反应体系中有 PCR 反应抑制物;	抑制物是加入模板时所引入的, 应先把模板适度稀释, 再加入反应体系, 减少抑制物的影响
		DNA 定量参考品稀释、混匀或者加样误差	移液设备应精确, 移液时液体未出现挂壁现象, 液体每一步转移前应充分混匀 (查看 ROX 线是否异常), 稀释倍数应合理, 移液时应注意液体是否有按规定体积转移
8	扩增效率过高	出现非特异扩增, 反应体系内模板浓度太高	去除模板浓度最高的反应孔并重新分析标准曲线; 重新稀释模板
9	扩增曲线不平滑	试剂未混匀	液体每一步转移前应充分混匀 (查看 ROX 线是否异常)
		模板中存在抑制物	重新稀释模板
		荧光信号相互存在一定干扰	查看机型是否与适用机型匹配以及试剂盒所涉及荧光信号是否与对应机型适配
10	CT 值前后差异大	阈值线设置不一致; 仪器不一致	统一阈值线以及仪器比较数据; 由于市场上核酸检测类产品靶点以及组分体系选择未统一, 故试剂盒标准曲线 CT 值会存在差异, 如有国家标准品可用国家标准品作为内控品比较数值的准确度

13. 联系方式

地址: 江苏省苏州市吴中经济技术开发区越溪街道吴中大道 1463 号

邮编 Postal code: 215104

联系电话 Tel: 400-900-1882

邮箱 E-Mail: info@hillgene.com

网址 Website: <https://www.hillgene.com>

14. 买方须知

我们的产品仅供研究使用。它们不得用于任何其他目的, 包括但不限于用于人体、治疗或诊断或任何商业用途。未经我们同意, 不得将我们的产品转让给第三方、转售、为转售而修改或用于制造商业产品或向第三方提供服务。

您在使用本产品时还必须遵守 <https://www.hillgene.com> 上产品网页中描述的任何适用许可要求。您有责任查看、理解并遵守此类声明中规定的任何限制。

更多产品、知识产权和限制使用信息, 请访问 <https://www.hillgene.com>。

让细胞药物
谱写生命新篇章

/
CELL THERAPY
INNOVATION INSPIRED

BlueKit[®]
Powered by Hillgene

欢迎订购

江苏谱新生物医药有限公司

地 址：苏州市吴中大道1463号越旺智慧谷4号楼
电 话：400-900-1882
邮 箱：info@hillgene.com
网 址：www.hillgene.com



关注公众号
获取更多咨询

经销商：