# PG13 残留 DNA 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-PG001**

## 产品简介

PG13 细胞系是由小鼠胚胎成纤维细胞（NIH/3T3）整合莫洛尼氏白血病毒（MLV）表达载体和长臂猿白血病病毒（GALV）细胞膜蛋白基因改造而获得的。PG13 细胞作为一种包装细胞目前主要应用于细胞产品（如 CAR-T/TCR-T 细胞等）的开发。因此相关生物制品需要对其进行 PG13 细胞 DNA 残留的含量进行检测。

本试剂盒配套有 PG13 DNA 定量参考品可快速准确定量检测各种生物制品的中间品、半成品和成品中 PG13 残留 DNA。

配套我司样品前处理试剂盒（货号为 HG-CL500）进行样品的前处理。

检测范围：3 fg/μL ~ $3\times10^5$ fg/μL

## 规格

100 Reactions

## 试剂盒组成

表 1 试剂盒组分及储存条件

| 组 分 | 规格 | 存储条件 |
|---|---|---|
| PG13 DNA 定量参考品（30ng/μL） | 50μL×1 管 | -20°C |
| PG13 Primer&Probe Mix | 550μL×1 管 | |
| 2x qPCR Reaction Buffer | 1.6mL×1 管 | |
| DNA 稀释液 | 1.5m×3 管 | |

## 储存条件及有效期

存储条件见上表，有效期 12 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。

## 适用机型

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。

## 需要准备的耗材与设备：

实验前请准备好下列耗材与设备：

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

## 实验步骤

一、 样品前处理

详见我司样品前处理试剂盒（货号为 HG-CL500）操作说明书。

二、 qPCR 操作步骤

1. 定量参考品及 NTC/NCS 的制备

1.1 定量参考品：取出 PG13 DNA 定量参考品、DNA 稀释液置于冰上融化；待完全融化后，轻微振荡混匀，瞬时离心；

1.2 取 7 支干净的 1.5mL 离心管，分别标记为 ST0，ST1，ST2，ST3，ST4，ST5，ST6；

1.3 标准品稀释过程如下表：

表 2. 标准品稀释过程

| 标准品代号 | 稀释体积 | 浓度（fg/μL） |
|---|---|---|
| ST0 | 10μL PG13 DNA 定量参考品 + 90μL DNA 稀释液 | $3 \times 10^6$ |
| ST1 | 10μL ST0 + 90μL DNA 稀释液 | $3 \times 10^5$ |
| ST2 | 10μL ST1 + 90μL DNA 稀释液 | $3 \times 10^4$ |
| ST3 | 10μL ST2 + 90μL DNA 稀释液 | $3 \times 10^3$ |
| ST4 | 10μL ST3 + 90μL DNA 稀释液 | $3 \times 10^2$ |
| ST5 | 10μL ST4 + 90μL DNA 稀释液 | $3 \times 10^1$ |
| ST6 | 10μL ST5 + 90μL DNA 稀释液 | $3 \times 10^0$ |

1.4 NTC 的制备：100uL DNA 稀释液；

1.5 NCS 的制备：取 100μL DNA 稀释液与样品同时进行前处理，纯化洗脱后的产物即为 NCS；

2. q-PCR 反应液的制备和加样

2.1 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 +2 个阴性对照 NTC 和 NCS + 待测样品）×3

2.2 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）× 20μL（2 或 3 为操作损失量）

2.3 将所需试剂置于冰上融化，轻微振荡混匀，按表 3 所示配制 qPCR Mix。

表 3. qPCR Mix 配制表

| 组分 | 单个反应量 (μL) |
|---|---|
| 2× qPCR buffer | 15 |
| PG13 Primer&Probe Mix | 5 |
| 总体积 | 20 |

3. 将所需试剂置于冰上融化，轻微振荡混匀，按表 4 所示加样（总体积 30μL）

表 4. 各反应孔加样示例

| | |
|---|---|
| 参考品 | 20μL qPCR Mix +10μL ST1/2/3/4/5/6 |
| 阴性对照 | 20μL qPCR Mix +10μL NTC/NCS |
| 待测样品 | 20μL qPCR Mix +10μL 待测样本 |

4. 实验需使用 qPCR 实验专用的八联管或者 96 孔板进行反应，需去除反应体系中的气泡，并离心将液体离至管底准备反应。

5. 反应孔排版示例

表 5. 96 孔板排版示例

| | 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 | | | | | | | | | |
| G | | | | | NTC | NTC | NTC | | | | | |
| H | | | | | NCS | NCS | NCS | | | | | |

三、 qPCR 反应程序和参数设置

以 BIO-RAD 公司 CFX96 qPCR 仪为例。

1. 创建实验反应程序，设置两步法反应程序如下表

表 6. PCR 反应程序

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Stage1 | 预变性 | Reps:1 | 95°C | 30s |
| Stage2 | 循环反应 | Reps:40 | 95°C | 5s |
| | | | 56°C | 34s |

备注：反应体积 30μL。程序中 56°C 34s 处设置为荧光收集。其他型号的设备，如遇问题可咨询我司或仪器厂家。

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 PG13-DNA；输入每个样品的重复次数及 Sample Name。( 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。)

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 PG13-DNA；输入每个稀释梯度的重复次数及 Sample Name。分别在 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6 的 Concentration 一栏赋值为 3.00E+05、3.00E+04、3.00E+03、3.00E+02、3.00E+01、3.00E+00（单位为 fg/μL）。

4. 点击 Run 界面“Start Run”按钮进行 PCR 测定。

四、 qPCR 结果分析

以 BIO-RAD 公司 CFX96 qPCR 仪为例

1. 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）、$R^2$。

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

3. 数据可靠性评估：

- 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；
- 标准曲线线性相关系数 $R^2 \geqslant 0.98$，扩增效率 85%~110% 之间；

## 注意事项

1. 本试剂盒已通过稳定性（冻融等因素）的验证，无需分装。

2. 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。

3. 注意在不同加样步骤间及时更换吸头，避免交叉污染，避免长时开盖。

4. 试剂盒必须在有效期内使用。

5. 试剂盒内所有组分建议在低温环境融化后使用。

6. 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。

7. 尽量在当天完成样本前处理纯化后立即进行后续 qPCR 检测，以保证检测结果的准确性。

8. 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。

9. 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。

10. 本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断。

## 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。


©2024 谱新生物 Hillgene. All right reserved. Ver.3.2406
江苏谱新生物医药有限公司
A. 苏州市吴中区吴中大道 1463 号越旺智慧谷 4 号楼
T.400 900 1882 W.www.hillgene.com