



质粒残留 DNA 定量试剂盒 (qPCR)

货号: OPA-R009

规格: 100 Tests

重要提示: 在进行实验之前请仔细阅读本手册。

本试剂盒仅用于科研使用, 不可用于诊断或治疗应用。

【产品简介】

本试剂盒用于定量检测生物制品的中间品、半成品以及成品中质粒基因的残留 DNA。本试剂盒中包含残留 DNA 检测的相关试剂，并不包含样本前处理 DNA 提取的相关试剂。有关样本 DNA 提取的试剂，请参阅 ACROBiosystems 的 *残留 DNA 样本制备试剂盒（磁珠法）（OPA-R005）*。

本试剂盒是利用 TaqMan-qPCR 原理，在 qPCR 体系中加入一对引物的同时另外加入一条特异性的 TaqMan 荧光探针，该探针与模板特异性地结合，其结合位点在两条引物之间，PCR 进行时释放荧光信号，从而可准确定量样品中质粒残留 DNA 的含量，专一性强、灵敏度高、性能可靠。

本试剂盒配套有线性化 DNA 参考品及非线性化 DNA 定量参考品，可根据需求自主选择。

线性化 DNA 定量参考品的检测范围： 4×10^1 copies/ μL ~ 4×10^6 copies/ μL 。

非线性化 DNA 定量参考品检测范围为： 2×10^2 copies/ μL ~ 2×10^6 copies/ μL 。

公式:质粒拷贝数(copies/ μL)= 6.02×10^{14} ×质粒浓度(ng/ μL)/(质粒碱基数×660)。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断。
2. 试剂盒必须在有效期内使用。
3. 试剂盒内所有组分建议在低温环境融化后使用。
4. 需严格按照说明书操作方法，全部使用本试剂盒配套试剂以保证最佳检测结果。
5. 建议使用带滤芯吸头；注意加样时更换吸头，避免交叉污染，避免长时间开盖。
6. 最终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。
7. 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样本的可能使用量，合理预留。

【试剂盒组分】

表 1.试剂盒组分

组 分	装 量	储存条件
2×qPCR Master Mix	1.6mL×1 管	-15 ~ -30℃ 备注: Primer&Probe Mix 需避光保存
Plasmid Primer & Probe Mix	550μL×1 管	
线性化 DNA 定量参考品 (Linearize DNA Control, 4×10 ⁸ copies/μL)	50μL×1 管	
非线性化 DNA 定量参考品 (Circular DNA Control, 2×10 ⁸ copies/μL)	50μL×1 管	
DNA 稀释液 (DNA Dilution Buffer)	1.5mL×3 管	

【有效期】

试剂盒保存于-15 ~ -30℃，试剂盒自生产之日起有效期为 12 个月，有效期见外包装盒标签。

【试验所需自备器材】

荧光定量 PCR 仪；1.5mL 无菌低吸附离心管；qPCR 专用无菌无酶八联管或 96 孔板

1000μL, 100μL, 20μL, 10μL 移液器；1000μL, 100μL, 20μL, 10μL 无菌低吸附带滤芯枪头

【适配机型（包括但不限于）】

ABI 7500 Real-Time PCR System；博日 LineGene 9600 Plus 荧光定量 PCR 仪；

ABI QuantStudio® 5 实时荧光定量 PCR 仪

【检测操作步骤】

Prepare the DNA control serial dilutions for the standard curve.



Preparation of Negative Extraction Control (NEC) or Extraction/Recovery Control (ERC) (Optional)



Prepare the PCR reaction mix



Create the plate document and run the plate



Analyze the results

注意：根据实际检测需求，实验中的 DNA 定量参考品选择线性化或者非线性化标准品。

1. 线性化 DNA 定量参考品的稀释和标准曲线制备（如选择线性化 DNA 定量参考品）

使用试剂盒中 DNA 稀释液（DNA Dilution Buffer）将线性化 DNA 定量参考品(Linearize DNA Control) (4×10^8 copies/ μ L) 进行梯度稀释，稀释浓度依次为： 4×10^7 copies/ μ L, 4×10^6 copies/ μ L, 4×10^5 copies/ μ L, 4×10^4 copies/ μ L, 4×10^3 copies/ μ L, 4×10^2 copies/ μ L, 4×10^1 copies/ μ L, 依次命名为：SD0, SD1, SD2, SD3, SD4, SD5, SD6。具体操作如下：

- 将试剂盒中线性化 DNA 定量参考品置于冰上融化，待完全融化后充分混匀，并短暂离心将溶液收集至管底，置于冰上备用；DNA 稀释液可室温融化。
- 如图 1 所示：在低吸附离心管中加入 **90 μ L** DNA 稀释液（DNA Dilution Buffer）和 **10 μ L** 线性化 DNA 定量参考品(Linearize DNA Control)稀释至 4×10^7 copies/ μ L，充分振荡(5-10s)混匀后离心备用；按此方法继续依次 10 倍倍比稀释至 4×10^6 copies/ μ L, 4×10^5 copies/ μ L, 4×10^4 copies/ μ L, 4×10^3 copies/ μ L, 4×10^2 copies/ μ L, 4×10^1 copies/ μ L。**注意：每稀释 1 个梯度必须充分混匀后再向下稀释，保证稀释的均匀准确。**
- 稀释好的 SD0, SD1, SD2, SD3, SD4, SD5, SD6 可短暂放置于 4℃ 保存。

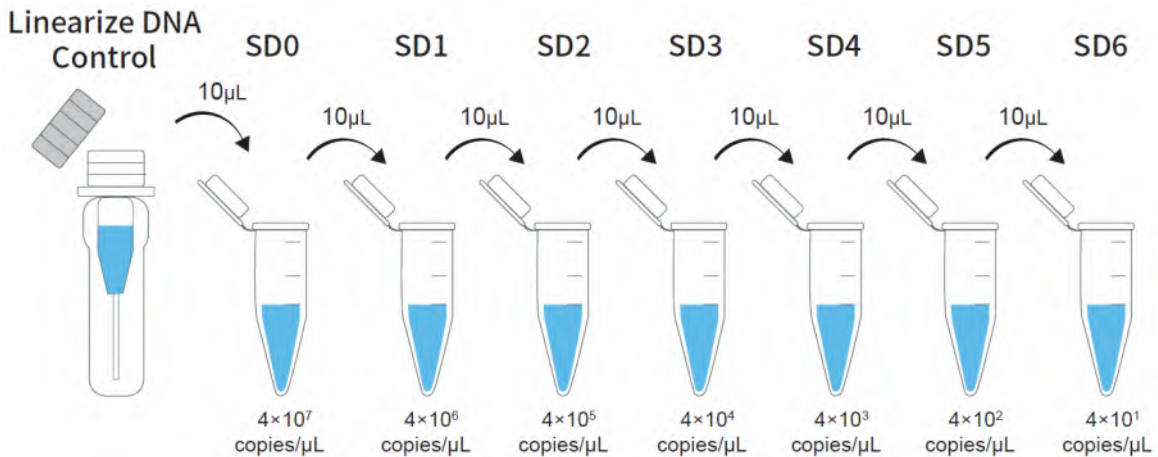


图 1: 线性化 DNA 定量参考品(Linearize DNA Control)倍比稀释示意图

2. 非线性化 DNA 定量参考品的稀释和标准曲线制备 (如选择非线性 DNA 定量参考品)

使用试剂盒中 DNA 稀释液 (DNA Dilution Buffer) 将非线性化 DNA 定量参考品(Circular DNA Control) (2×10^8 copies/ μL) 进行梯度稀释, 稀释浓度依次为: 2×10^7 copies/ μL , 2×10^6 copies/ μL , 2×10^5 copies/ μL , 2×10^4 copies/ μL , 2×10^3 copies/ μL , 2×10^2 copies/ μL , 依次命名为: SD0, SD1, SD2, SD3, SD4, SD5。具体操作如下:

- 将试剂盒中非线性化 DNA 定量参考品置于冰上融化, 待完全融化后充分混匀, 并短暂离心将溶液收集至管底, 置于冰上备用; DNA 稀释液可室温融化。
- 如图 2 所示: 在低吸附离心管中加入 90 μL DNA 稀释液 (DNA Dilution Buffer) 和 10 μL 非线性化 DNA 定量参考品(Circular DNA Control)稀释至 2×10^8 copies/ μL , 充分振荡混匀后离心备用; 按此方法继续依次 10 倍倍比稀释至 2×10^6 copies/ μL , 2×10^5 copies/ μL , 2×10^4 copies/ μL , 2×10^3 copies/ μL , 2×10^2 copies/ μL 。注意: 每稀释 1 个梯度必须充分混匀后再向下稀释, 保证稀释的均匀准确。
- 稀释好的 SD1、SD2, SD3, SD4, SD5 可置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 短暂保存。

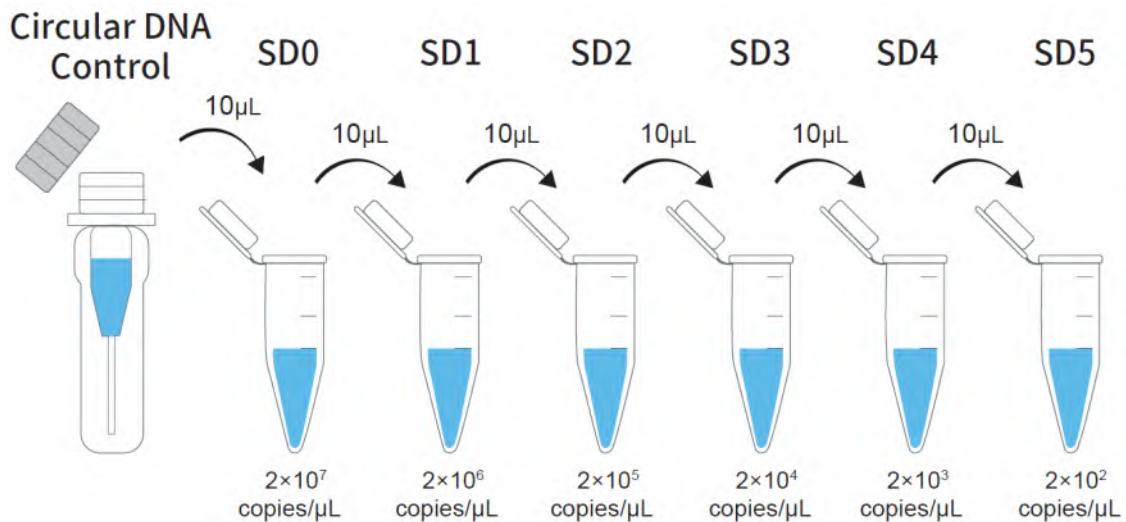


图 2: 非线性化 DNA 定量参考品(Circular DNA Control)倍比稀释示意图

3. 加样回收质控 ERC 的制备 (可选)

根据实际检测需求, 设置 ERC (Extraction/Recovery Control)。如标准曲线选择线性化 DNA 定量参考品, 以制备添加 8×10^4 copies 线性化质粒 DNA 加样量的 ERC 为例, 具体操作如下:

- 取 100 μL 待测样本加入 1.5mL 低吸附离心管中;
 - 再加入 4×10^3 copies/ μL 的线性化 DNA 定量参考品 20 μL , 混匀, 标记为样本 ERC。
- ▶ 样本 ERC 和同批待测样本一起进行提取, 制备成样本 ERC 纯化液。

4. 阴性质控 NEC 的制备 (可选)

取 100 μ L 样本基质溶液{或 1 \times PBS (pH7.4, 无 Ca²⁺和 Mg²⁺) 或 1 \times TE (pH7.0~pH8.0)}加入 1.5mL 干净的离心管中, 标记为阴性质控 NEC (Negative Extraction Control) 。

► **阴性质控 NEC 和同批待测样本一起进行提取, 制备成阴性质控 NEC 纯化液。**

5. qPCR 反应体系配制

- 反应孔数计算: 根据要检测的定量参考品及待测样本数量, 计算所需反应孔数, 需做 3 个重复孔/样; 反应孔数= (稀释后梯度定量参考品+1 个无模板对照 NTC+待测样品+ERC) \times 3;
 - 如选择线性化 DNA 参考品作为标准曲线, 则使用步骤 1 中制备的梯度线性化 DNA 定量参考品 SD1-SD6 进行加样; 如选择非线性化 DNA 参考品作为标准曲线, 则选择步骤 2 中制备的梯度非线性化 DNA 定量参考品 SD1-SD5 进行加样。
- 预混液用量计算: 为简化步骤及保证反应体系均一性, 建议先将 2 \times qPCR Master Mix 和 Plasmid Primer Probe Mix 配成 Plasmid qPCR Mix 预混液; 请根据实验需要计算 Plasmid qPCR Mix 预混液反应数: Plasmid qPCR Mix 预混液反应数 N = (反应孔数+2 或 3), 2 或 3 为预留损失量;
- 将各组分子置于冰上融化, 待完全融化后, 轻微振荡混匀后按照表 2 进行 Plasmid qPCR Mix 预混液配制, 并充分混匀, 短暂离心:

表 2. Plasmid qPCR Mix 预混液配制

组分	单孔用量	总量
2 \times qPCR Master Mix	15 μ L	15 μ L \times N
Plasmid Primer & Probe Mix	5 μ L	5 μ L \times N

- 体系配制: 吸取 Plasmid qPCR Mix 预混液 20 μ L 按照排板分液到每孔, 每孔加入对应样本 DNA 10 μ L:

表 3. PCR 反应体系

组分	单孔总体积 30 μ L
Plasmid qPCR Mix 预混液	20 μ L
样本 DNA (定量参考品/NTC/NEC/待测样本/ERC 等)	10 μ L

► **NTC (No Template Control) 建议使用无核酸酶水 (DNase/RNase-Free Water) 作为模板。**

6 . qPCR 程序设置与运行

以 ABI7500, 7500 software v2.4 为例:

- 新建实验 (New experiment) , 输入实验名称, 选择标曲定量模式 (Quantitation Standard Curve) , TaqMan reagents 和 Standard 模式;
- 在 Plate Setup 界面, 命名 Target Name, 选报告荧光基团 (Reporter) 为 FAM, 淬灭基团 (Quencher) 为 None, 参比荧光 (Passive reference dye) 选 ROX;
- 在 Plate Setup 界面, 将标准曲线孔 Task 栏设置为“S”;
如选择线性化 DNA 定量参考品, 则在 Quantity 栏按照浓度梯度分别设置为 4×10^6 , 4×10^5 , 4×10^4 , 4×10^3 , 4×10^2 , 4×10^1 (即 DNA 浓度单位为 copies/ μ L)
如选择非线性化 DNA 定量参考品, 则在则在 Quantity 栏按照浓度梯度分别设置为 2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 , 2×10^2 (即 DNA 浓度单位为 copies/ μ L)
- 设定靶标: 根据实验需要进行排板, **尽量将定量参考品和阴性及待测样品分开排布, 以防加样污染影响检测结果 (如表 4 所示, 选择非线性 DNA 定量参考品, 则没有 SD6) :**

表 4. 样品排板示例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A									SD1	SD1	SD1	
B	S1	S1	S1		S1(ERC)	S1(ERC)	S1(ERC)		SD2	SD2	SD2	
C	S2	S2	S2		S2(ERC)	S2(ERC)	S2(ERC)		SD3	SD3	SD3	
D	S3	S3	S3		S3(ERC)	S3(ERC)	S3(ERC)		SD4	SD4	SD4	
E									SD5	SD5	SD5	
F									SD6	SD6	SD6	
G	NEC	NEC	NEC									
H									NTC	NTC	NTC	

S=Sample ; NTC=No Template Control ; NEC=Negative Extraction Control ;
ERC=Extraction/Recovery Control。

- 按表 5 设置 qPCR 反应程序

表 5. 反应程序

阶段	循环	温度	时间	荧光信号采集
UDG 消化	1×	50°C	2min	否
预变性	1×	95°C	20s	否
循环反应	40×	95°C	3s	否
		60°C	30s	是

反应体积选择 30 μ L，在 Run 界面点击“Start Run”开始运行 qPCR，待运行完毕进行分析。

【结果分析】

- 分析设定：参数设置需要依据具体机型及软件版本；
- 复孔 Ct 值结果一致性：复孔间 Ct 值差异 \leq 0.5。
- 标准曲线判定标准： $R^2 \geq 0.98$ ，Eff%=90~110%；
- NTC 的检测结果显示应为 Undetermined 或 Ct 值 > 35；
- NEC Ct 值大于标曲最低浓度 Ct 值；
- 根据标准曲线计算待测样本浓度 (copies/ μ L) :待测样品的 Ct 值只根据标准曲线有效范围内可用于浓度计算。请勿使用标准曲线有效范围之外的 Ct 值计算待测样本的浓度；
- 根据待测样本和样本 ERC 的检测结果显示计算加样回收率，加样回收率要求在 50%~150%之间。