



resDetect™ HEK293T 残留 DNA 定量试剂盒 (qPCR)

货号：OPA-R010

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 HEK293T 宿主细胞残留 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。为了达到更好的 DNA 回收率，建议配合使用 **resDetect™ resDNA Sample Preparation Kit II (Magnetic Beads) (OPA-R024)** 进行待测样本的前处理。

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 HEK293T 残留 DNA 的含量，专一性强、灵敏度高、性能可靠。

本试剂盒的检测范围：**30 fg/μL~300 pg/μL**。Limit of detection 为 **15 fg/μL**。

【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	管盖颜色	装量	储存条件
2×qPCR Master Mix		1.0mL×2 管	-15 ~ -30℃备注： Primer & Probe Mix 需 避光保存
HEK293T Primer & Probe Mix		700μL×1 管	
HEK293T DNA 定量参考品 (HEK293T DNA Control, 3ng/μL)		100μL×1 管	
参考品稀释液 (Dilution Buffer)		1.5mL×3 管	
无核酸酶水 (DNase/RNase-Free Water)		1.0mL×1 管	

注：也可将 HEK293T DNA Control 混匀，根据每次实验用量分装小份置于 -15 ~ -30℃冻存。

【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 7500/7500 Fast Real-Time PCR System；博日 LineGene 9600 Plus 荧光定量 PCR 仪
ABI QuantStudio® 5 Real-Time PCR System；上海宏石 SLAN-96S 荧光定量 PCR 仪
Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR System；Roche Light Cycler 480 II

【检测操作步骤】

Prepare the DNA control serial dilutions for the standard curve



Preparation and extraction of NEC or ERC (Optional)



Prepare the PCR reaction mix



Create the plate document and run the plate



Analyze the results

1. HEK293T DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

使用试剂盒中参考品稀释液 (Dilution Buffer) 将 HEK293T DNA 定量参考品(DNA Control) (3ng/μL) 进行梯度稀释, 稀释浓度依次为: 300pg/μL, 30pg/μL, 3pg/μL, 300fg/μL, 30fg/μL, 依次命名为: SD1, SD2, SD3, SD4, SD5。具体操作如下:

- 将试剂盒中 HEK293T DNA 定量参考品置于冰上融化, 待完全融化后充分振荡混匀 1min 左右, 并短暂离心将溶液收集至管底, 置于冰上备用; 参考品稀释液可室温融化。
- 如图 1 所示: 在低吸附离心管中加入 90μL 参考品稀释液 (Dilution Buffer) 和 10μL HEK293T DNA 定量参考品(DNA Control)稀释至 300pg/μL, 充分振荡混匀 (建议振荡混匀 1min 左右) 后离心备用; 按此方法继续依次 10 倍倍比稀释至 30pg/μL, 3pg/μL, 300fg/μL, 30fg/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°C 短暂保存。

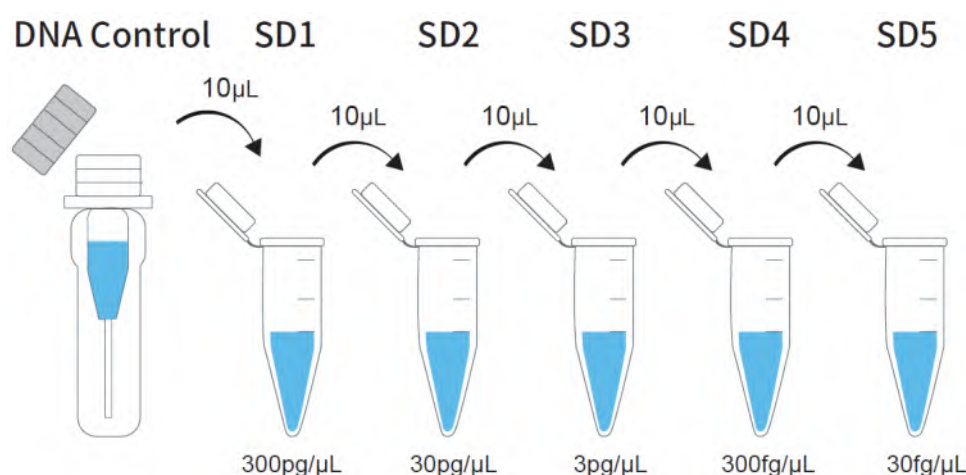


图 1: DNA 定量参考品(DNA Control)倍比稀释示意图

2. 加样回收质控 ERC 的制备(可选项)

根据实验需要, 设置 ERC(Extraction/Recovery Control)。以制备加 600pg HEK293T DNA 量的样本 ERC 为例, 具体操作如下:

- 取 100μL 待测样本加入 1.5mL 低吸附离心管中;
 - 再加入 30pg/μL 的 HEK293T DNA 定量参考品 (SD2) 20μL, 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。

3. 阴性质控 NEC 的制备 (可选项)

取 100 μ L 样本基质溶液 (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。**

4. 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

► **使用步骤 1 中制备的梯度线性化 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 HEK293T Primer & Probe Mix 配成 HEK293T qPCR Mix 预混液; 请根据实验需要计算 HEK293T qPCR Mix 预混液反应数: HEK293T 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 **HEK293T qPCR Mix 预混液** 配制, 并充分混匀, 短暂离心:

表 2. HEK293T 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
HEK293T Primer & Probe Mix	5 μ L	5 μ L \times N

- 体系配制: 吸取 **HEK293T 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	单孔总体系 30 μ L
HEK293T 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 建议使用无核酸酶水 (DNase/RNase-Free Water) 作为模板; 无核酸酶水(本试剂盒附带 1.0mL)。**

5 . 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 界面自命名 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”, 在 Quantity 栏按照浓度梯度分别设置为 300000、30000、3000、300、30 (即 DNA 浓度单位为 fg/μL) ;
- 设定靶标: 根据实验需要进行排板, **尽量将 NTC、NEC、定量参考品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) :**

表 4. 样品排板示例

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

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×	37°C	2min	否
预变性	1×	95°C	30s	否
循环反应	40×	95°C	10s	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: ABI7500 的设置阈值 (Threshold) = 0.4, 基线 (baseline) 为自动基线 (Auto Baseline); 其他机型结果分析: 参数设置需要依据具体机型及软件版本, 一般也可由仪器自动判读;
- 标准曲线判定标准: $R^2 \geq 0.98$, Eff% = 90~110%;
- NTC 的检测结果判定应为 Ct 值 > 30 或大于标准曲线中最低点 3 个 Ct 值左右;
- 根据标准曲线计算待测样本浓度 (pg/ μ L 或 fg/ 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 的检测结果计算加样回收率, 加样回收率要求在 50%~150%之间。