

# MDCK DNA 残留片段分析试剂盒

## (PCR-荧光探针法) 说明书

### 产品简介

MDCK DNA残留片段分析试剂盒用于定量分析检测各种生物制品的中间品、半成品和成品中MDCK宿主细胞DNA残留片段大小分布,辅助进行生物制品的核酸质控。适用的生物制品类型包括核酸、细胞、细胞培养上清、质粒收获液、蛋白制品等。

本试剂盒利用 qPCR 荧光探针法原理,设计了三种扩增片段长度不同的引物探针(84bp、204bp、300bp),用 MDCK 基因组 DNA 标准品分别对不同的扩增片段制作标准曲线来定量检测分析样品中 MDCK 残留 DNA 片段的大小分布情况。试剂盒经完整性能验证,灵敏度达到 3fg,能够专一且快速检测 MDCK 残留 DNA 片段的大小分布情况。

### 试剂盒组分

表 1 试剂盒组分

组分	3*30 反应装量	3*100 反应装量
MDCK DNA 定量标准品	10 $\mu$ L $\times$ 1 管	50 $\mu$ L $\times$ 1 管
2 $\times$ qPCR Reaction Mix	1250 $\mu$ L $\times$ 1 管	1250 $\mu$ L $\times$ 3 管
M84 Primer&Probe MIX	33 $\mu$ L $\times$ 1 管	100 $\mu$ L $\times$ 1 管
M204 Primer&Probe MIX	33 $\mu$ L $\times$ 1 管	100 $\mu$ L $\times$ 1 管
M300 Primer&Probe MIX	33 $\mu$ L $\times$ 1 管	100 $\mu$ L $\times$ 1 管
IPC MIX	100 $\mu$ L $\times$ 1 管	330 $\mu$ L $\times$ 1 管
50 $\times$ ROX Low	40 $\mu$ L $\times$ 1 管	120 $\mu$ L $\times$ 1 管
50 $\times$ ROX High	40 $\mu$ L $\times$ 1 管	120 $\mu$ L $\times$ 1 管
DNA 稀释液	1.8 mL $\times$ 1 管	1.8 mL $\times$ 4 管

\*请对应机型选择适配的 ROX。

### 包装与规格

货号 10903016 3\*30 反应/盒

货号 10903015 3\*100 反应/盒

## 储存条件及有效期

储存条件：-20°C±5°C避光保存。

有效期：12 个月。

试剂盒反复冻融5次内有效。

## 适配机型（包括但不限于）

- Thermo Scientific: ABI 7500 Real-Time PCR System (ROX Low)
- ABI Quant Studio 6 (ROX High)
- 杭州博日科技: FQD-96A (No ROX)

## 需要额外准备的耗材与设备

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
- 离心机
- 震荡器
- 各规格移液器（如 1000μl, 200μl, 10μl, 2.5μl 等）

## 实验操作流程

### 1. MDCK DNA 定量标准品稀释和标准曲线制备

使用试剂盒中的 DNA 稀释液将 MDCK DNA 定量标准品进行梯度稀释，具体操作如下：

- 1) 将试剂盒中的 MDCK DNA 和 DNA 稀释液置于冰上或 2-8°C 条件下融化，待完全融化后，轻微振荡混匀，低速离心 10 sec。
- 2) 取 7 支洁净的 1.5 mL 离心管，分别标记为 ST0、ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。
- 3) 在 ST0 管中取 6μL MDCK DNA 定量标准品加 14μL DNA 稀释液稀释至 3ng/μL，得到 ST0，振荡混匀后快速离心 3~5 sec，重复 3 次以确保定量标准品与 DNA 稀释液充分混匀。

- 4) 在 ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6 管中分别加入 180  $\mu\text{L}$  DNA 稀释液。
- 5) 按表 2 依次进行 6 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。

表 2 标准品梯度稀释

稀释管	稀释体积	终浓度 ( $\text{pg}/\mu\text{L}$ )
ST1	20 $\mu\text{L}$ ST0 + 180 $\mu\text{L}$ DNA 稀释液	300
ST2	20 $\mu\text{L}$ ST1 + 180 $\mu\text{L}$ DNA 稀释液	30
ST3	20 $\mu\text{L}$ ST2 + 180 $\mu\text{L}$ DNA 稀释液	3
ST4	20 $\mu\text{L}$ ST3 + 180 $\mu\text{L}$ DNA 稀释液	0.3
ST5	20 $\mu\text{L}$ ST4 + 180 $\mu\text{L}$ DNA 稀释液	0.03
ST6	20 $\mu\text{L}$ ST5 + 180 $\mu\text{L}$ DNA 稀释液	0.003

- ✚ 每个浓度做 3 个复孔, 标准曲线浓度梯度可根据实际验证结果选择, 应至少有 5 个连续的浓度梯度。
- ✚ 为减少反复冻融次数和避免污染, 建议初次使用时将 MDCK DNA 定量标准品分装储存于  $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 。
- ✚ 标准品的稀释应在每次实验前重新制备, 不可使用前一次或前一日制备的标准品。
- ✚ 已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于  $2-8^{\circ}\text{C}$  7 天, 若长时间不用, 请放置于  $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 。

## 2. 待测样本 S 的制备

根据实验设置待测样本 S, 具体操作如下:

- 1) 取 100  $\mu\text{L}$  待测样本加入 1.5 mL 洁净的离心管中, 标记为 S, 使用宿主残留样本前处理试剂盒进行样本前处理, 制备待测样本 S 纯化液。
  - 2) 建议设置加标样品 (ERC), 与待测样品进行同步处理, 作为回收率考察。
- ✚ 一般建议样品加标量设置为样品 MDCK DNA 实际残留量的 2-10 倍。若样品 MDCK DNA 实际残留量低于本试剂盒的定量限, 加标量应设置在定量限范围之内, 保证检测结果的准确性。

## 3. 阴性质控 NCS 的制备

根据实验设置阴性抽提质控 NCS, 具体操作如下:

- 1) 取 100  $\mu\text{L}$  样本基质溶液（或 DNA 稀释液）加入 1.5 mL 洁净的离心管中，标记为 NCS。
- 2) 阴性质控 NCS 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。

#### 4. 反应体系混合液（qPCR MIX）的准备

- 1) 根据所要检测的标准曲线及待测样品数量，计算所需反应孔数，一般做 3 个重复孔/样。

反应孔数 = (6 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 + 待测样品数)  $\times$  3

- 2) 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR 反应液总量（含有 2 孔的损失量）：

$$\text{qPCR MIX} = (\text{反应孔数} + 2) \times 15 \mu\text{L}$$

- 3) 各试剂放在冰上或 2-8 $^{\circ}\text{C}$  条件下充分融化后，轻微震荡混匀，参照表 3、表 4、表 5 所示配制反应 MIX。

表 3 片段 M84 qPCR MIX 配制表

组分	单孔反应 ( $\mu\text{L}$ )
2 $\times$ qPCR Reaction Mix	12.5
M84 Primer&Probe MIX	1
IPC MIX	1.1
ROX	0.4
总体积	15

表 4 片段 M204 qPCR MIX 配制表

组分	单孔反应 ( $\mu\text{L}$ )
2 $\times$ qPCR Reaction Mix	12.5
M204 Primer&Probe MIX	1
IPC MIX	1.1
ROX	0.4
总体积	15

表 5 片段 M300 qPCR MIX 配制表

组分	单孔反应 (μL)
2× qPCR Reaction Mix	12.5
M300 Primer&Probe MIX	1
IPC MIX	1.1
ROX	0.4
总体积	15

✚ 为满足同步进行三种扩增片段检测，DNA 模板需 $\geq 100\mu\text{l}$ ，建议每个样品同时准备 2 管进行前处理，提取完成后混匀使用。

## 5. 加样

1) 上述各试剂置于冰上融化，轻微振荡混匀，按照表 6、表 7、表 8 所示加样：

表 6 片段 M84 各反应孔加样示例

标准曲线	15 μL qPCR MIX+10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5/ST6
NTC	15 μL qPCR MIX+10 μL DNA 稀释液
NCS	15 μL qPCR MIX+10 μL NCS 纯化液
待测样品	15 μL qPCR MIX+10 μL 待测样品纯化液

表 7 片段 M204 各反应孔加样示例

标准曲线	15 μL qPCR MIX+10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5/ST6
NTC	15 μL qPCR MIX+10 μL DNA 稀释液
NCS	15 μL qPCR MIX+10 μL NCS 纯化液
待测样品	15 μL qPCR MIX+10 μL 待测样品纯化液

表 8 片段 M300 各反应孔加样示例

标准曲线	15 μL qPCR MIX+10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5/ST6
NTC	15 μL qPCR MIX+10 μL DNA 稀释液
NCS	15 μL qPCR MIX+10 μL NCS 纯化液
待测样品	15 μL qPCR MIX+10 μL 待测样品纯化液

加样完成后每孔总体积为 25 μL。

表 9-1 96 孔板排版示例（6 个浓度梯度的标准品）

	Mix-M84			Mix-M204			Mix-M300			样本		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	S1-84	S1-84	S1-84
B	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	S1-204	S1-204	S1-204
C	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	S1-300	S1-300	S1-300
D	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	S2-84	S2-84	S2-84
E	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	S2-204	S2-204	S2-204
F	ST6	ST6	ST6	ST6	ST6	ST6	ST6	ST6	ST6	S2-300	S2-300	S2-300
G	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS			
H	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC			

表 9-2 96 孔板排版示例（5 个浓度梯度的标准品）

	Mix-M84			Mix-203\4			Mix-300		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1
B	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2
C	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3
D	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4
E	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5
F	S	S	S	S	S	S	S	S	S
G	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
H	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC

表 9-1 示例表示的是 6 个浓度梯度的标准曲线（ST1~6）、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、2 个待测样品（S1、S2）。每个检测做 3 个重复孔。实际检测时可根据样品多少，参照表 9-1 示例进行 96 孔板排版加样。

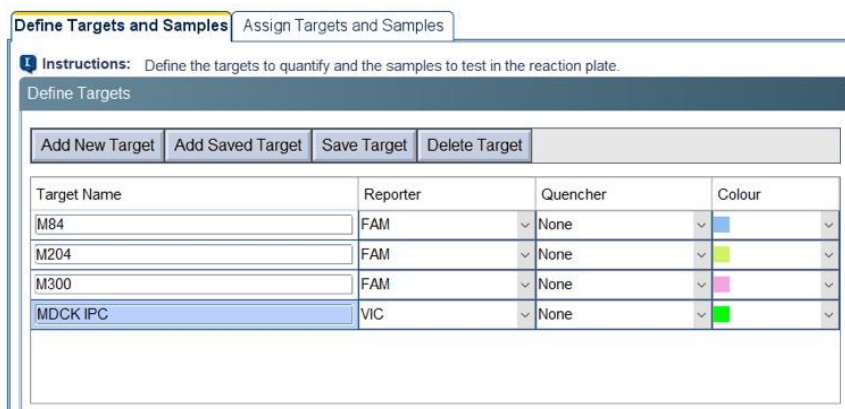
表 9-2 示例表示的是 5 个浓度梯度的标准曲线（ST1~5）、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、1 个待测样品（S）。每个检测做 3 个重复孔。实际检测时可根据样品多少，参照表 9-2 示例进行 96 孔板排版加样。

- 1) 加样完成后，将 96 孔板用光学膜封闭，轻微震荡混匀，短时间快速离心 10 sec 后放入 qPCR 仪，如有气泡，需将气泡排尽。

## 6. 扩增程序参数设置

以 ABI 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 2.3 为例

- 1) 创建空白新程序，选择绝对定量检测模板。
- 2) 创建新检测探针，命名为“M84”，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“M204”，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“M300”，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 MDCK 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（可选，参比荧光可根据仪器型号等情况，选择是否需要添加）。



- 3) 在“Assign target (s) to the selected wells”面板中，将标准曲线孔的“Task”一栏设置为“Standard”，并且在“Quantity”一栏分别赋值为“300”、“30”、“3”、“0.3”、“0.03”、“0.003”（含义为每孔的 DNA 浓度，单位为 pg/μL），并且在相应的“Sample Name”一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。
- 4) 将无模板对照 NTC 孔的“Task”一栏设置为“NTC”；将阴性质控 NCS 孔、待测样本 S 孔的“Task”一栏设置为“Unknown”，并且在相应的“Sample Name”一栏中分别命名为“NCS”、“S”。
- 5) 扩增程序设置：设置两步法扩增程序，反应体积 25 μL。

表 10 qPCR 扩增程序

循环步骤	温度 (°C)	时间	循环数
UDG 消化	37	2 min	1
预变性	95	2 min	1
变性	95	10 sec	45

退火/延伸（收集荧光）	60	30 sec（采光）	
-------------	----	------------	--

6) 之后点击“Start Run”，开始仪器运行。

## 7. qPCR 结果分析

- 1) 在“Analysis”的“Amplification Plot”面板中，系统会自动给出“Threshold”，有时系统给出的“Threshold”离基线太近，导致复孔之间 Ct 相差甚远，可手动调节“Threshold”至合适位置（ABI 7500 建议设置为 0.3），点击“Analyze”。此时可在“Multicomponent Plot”初步查看扩增曲线的形态是否正常。
- 2) 在“Analysis”的“Standard Curve”面板中，可读取标准曲线的  $R^2$ 、扩增效率（Eff%）、斜率（Slope）、截距（Intercept）等。正常的标曲： $R^2 > 0.99$ ，扩增效率在  $90\% \leq \text{Eff\%} \leq 110\%$  范围内，Slope 在 -3.8~-3.1。
- 3) 在“Analysis”的“View well table”面板中，“Quantity”一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样本 TS 的检测值，单位为  $\text{pg}/\mu\text{L}$ ，后续可在检测报告中单位换算。
- 4) 结果分析的参数设置需依据具体的机型及使用的软件版本，一般也可由仪器自动判读。
- 5) 阴性质控 NCS 的 Ct 值应大于标曲最低浓度 Ct 的均值。
- 6) 无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undetermined 或大于标准曲线最低浓度点 2 个 Ct 值以上。

## 注意事项

1. 本产品仅作科研用途，不用于临床诊断。
2. 本试剂盒需在有效期内使用。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
4. 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。
5. 使用本试剂前请仔细阅读本说明书，实验应规范操作，包括样本处理、反应体系的配制及加样。
6. 试剂盒内所有组分建议在低温环境融化后使用，且使用前每个组分请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。
7. 避免反复冻融本品，反复冻融可能使产品性能下降。



8. 本产品长期保存可置于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 避光保存。如果在短期内需要频繁使用，可在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存。

**【基本信息】**

生产企业名称：北京阅微基因技术股份有限公司

住所：北京市海淀区三里河路 17 号 10 层 1005 至 1010

售后服务单位名称：北京阅微基因技术股份有限公司

生产地址：北京市昌平区中关村科技园区白浮泉北街 1 号院 1 号楼-1 至 6 层 101 三层及六层 601