



## resDetect™ E1A 残留 DNA 定量试剂盒 (qPCR)

货号：OPA-R008

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 E1A 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 E1A 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： $4 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ ~ $4 \times 10^6$  copies/ $\mu\text{L}$ 。

公式:质粒拷贝数(copies/ $\mu\text{L}$ )= $6.02 \times 10^{14} \times$ 质粒浓度(ng/ $\mu\text{L}$ )/(质粒碱基数 $\times 660$ )。

## 【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°C备注： Primer & Probe Mix 需 避光保存
E1A Primer & Probe Mix	550μL×1 管	
线性化 DNA 定量参考品 (Linearize DNA Control, 4×10 <sup>8</sup> 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°C，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**

## 1. 线性化 DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

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) ( $4 \times 10^8$  copies/ $\mu\text{L}$ ) 进行梯度稀释, 稀释浓度依次为:  $4 \times 10^7$  copies/ $\mu\text{L}$ ,  $4 \times 10^6$  copies/ $\mu\text{L}$ ,  $4 \times 10^5$  copies/ $\mu\text{L}$ ,  $4 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$ ,  $4 \times 10^3$  copies/ $\mu\text{L}$ ,  $4 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ ,  $4 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ , 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, 待完全融化后充分振荡 (5-10s) 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  $\mu\text{L}$**  DNA 稀释液 (DNA Dilution Buffer) 和 **10  $\mu\text{L}$**  线性化 DNA 定量参考品 (Linearize DNA Control) 稀释至  $4 \times 10^7$  copies/ $\mu\text{L}$ , 充分振荡 (5-10 秒) 混匀后离心备用; 按此方法继续依次 10 倍倍比稀释至  $4 \times 10^6$  copies/ $\mu\text{L}$ ,  $4 \times 10^5$  copies/ $\mu\text{L}$ ,  $4 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$ ,  $4 \times 10^3$  copies/ $\mu\text{L}$ ,  $4 \times 10^2$  copies/ $\mu\text{L}$ ,  $4 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$ 。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  $4^\circ\text{C}$  保存。

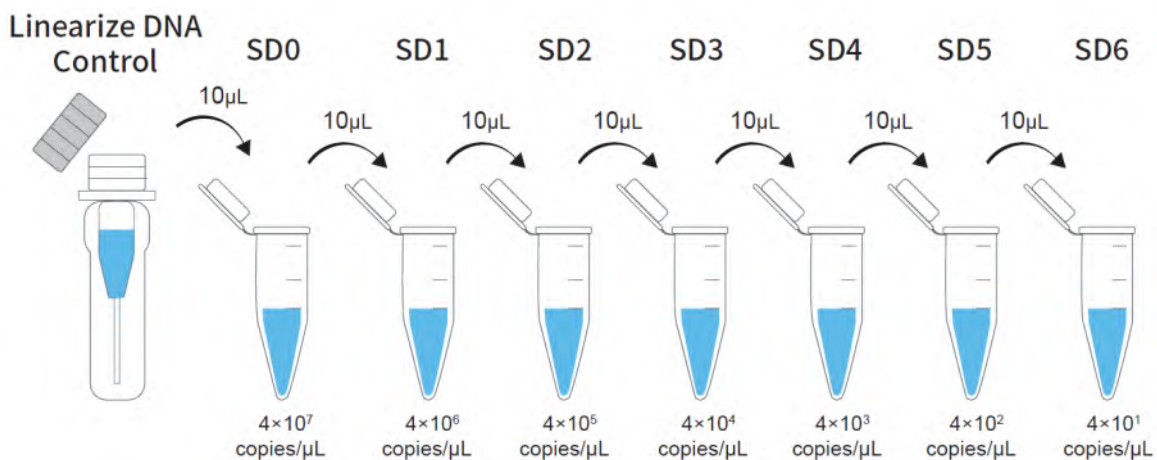


图 1: 线性化 DNA 定量参考品 (Linearize DNA Control) 倍比稀释示意图

## 2. 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)。以制备添加  $8 \times 10^4$  copies E1A DNA 加样量的 ERC 为例, 具体操作如下:

- 取  $100 \mu\text{L}$  待测样本加入  $1.5 \text{ mL}$  低吸附离心管中;
  - 再加入  $20 \mu\text{L}$  浓度为  $4 \times 10^3$  copies/ $\mu\text{L}$  的线性化 DNA 定量参考品, 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)

取 100 $\mu$ L 样本基质溶液{或 1 $\times$  PBS (pH7.4, 无 Ca<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>) 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-SD6 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 E1A Primer & Probe Mix 配成 E1A qPCR Mix 预混液; 请根据实验需要计算 E1A qPCR Mix 预混液反应数: E1A 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 **E1A qPCR Mix 预混液**配制, 并充分混匀, 短暂离心:

表 2. E1A qPCR Mix 预混液配制

组分	单孔用量	总量
2 $\times$ qPCR Master Mix	15 $\mu$ L	15 $\mu$ L $\times$ N
E1A Primer & Probe Mix	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L $\times$ N

- 体系配制: 吸取 **E1A qPCR Mix 预混液** 20 $\mu$ L 按照排板分液到每孔, 每孔加入对应样本 DNA 10 $\mu$ L:

表 3. PCR 反应体系

组分	单孔总体系 30 $\mu$ L
E1A qPCR Mix 预混液	20 $\mu$ L
样本 DNA (定量参考品/NTC/NEC/待测样本/ERC 等)	10 $\mu$ L

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

## 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  $4 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^3$ ,  $4 \times 10^2$ ,  $4 \times 10^1$  (即 DNA 浓度单位为 copies/ $\mu$ 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) :**

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 $\mu$ 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/ $\mu$ 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。