

PerfectStart® Plasmid DNA Quantification Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号: DH171

版本号: Version 1.0

保存: -20℃保存两年。

产品说明

本产品针对各质粒中的共有序列进行设计分析, 可用于定量检测各类生物制品中质粒DNA的残留, 该试剂盒可与本公司的磁珠法残留 DNA 样本前处理试剂盒(目录号: EH201-01或EH201-11)配套使用。本产品原理为利用在PCR体系中加入荧光探针, 扩增过程中其荧光量与扩增产物量成正比, 通过荧光量的检测测定样品核酸量。本产品引入了dUTP/UDG系统, 可在反转录前降解含U的ssDNA和dsDNA, 消除由PCR产物导致的交叉污染。

特点

- 特异性高, 灵敏度高, 扩增效率高, 适用样品范围广。
- 特殊优化的qPCR反应缓冲液, 可提供更高的延伸速度、灵敏度和特异性。
- 使用UDG酶和dUTP, 有效防止PCR产物的交叉污染, 数据准确。

产品组成

组分名称	DH171-01	主要成分
2×Plasmid qPCR SuperMix	2×750 μL	PCR酶, dNTPs, Mg离子, PCR缓冲液等
6×Plasmid 引物探针混合液	500 μL	质粒DNA引物探针
Plasmid线性化DNA定量参考品(2×10^8 copies/μL)	50 μL	
Plasmid非线性化DNA定量参考品(2.5×10^8 copies/μL)	50 μL	
DNA稀释液	3×1 mL	
无核酸酶的水	1 mL	

适用仪器: 适用但不限于ABI系列、Bio-Rad CFX系列、博日LineGene 9600 Plus等荧光PCR仪。

检验方法

1、标准曲线样品准备 (在样品处理区进行)

(1) 取出试剂盒中定量参考品以及DNA稀释液, 冰上放置待完全融化后, 轻柔振荡混匀瞬时离心; 请根据样品结构特性选择线性化或非线性化定量参考品进行标曲的配制。

(2) 梯度稀释: 取干净1.5 ml离心管6支, 标为S0、S1、S2、S3、S4、S5和S6, 并在每管中加入90 μl DNA稀释液。从定量参考品中取10 μl加至S0中, 振荡混匀并瞬时离心。再从S0中取10 μl至S1中, 以此类推重复上述步骤进行梯度稀释。

参考品浓度如下:

稀释管	S0	S1	S2	S3	S4	S5	S6
线性化参考品浓度 (copies/μL)	2×10^7	2×10^6	2×10^5	2×10^4	2×10^3	2×10^2	2×10^1
非线性化参考品浓度 (copies/μL)	2.5×10^7	2.5×10^6	2.5×10^5	2.5×10^4	2.5×10^3	2.5×10^2	/

(3) 稀释得到的S1-S6作为标准曲线样品放置于冰上备用, S0留存。实验结束后剩余定量参考品以及稀释液建议保存于-20℃, 且建议在一周内使用。

2、试剂准备 (在试剂准备区进行)

(1) 取出试剂盒中的各组分以及自备试剂, 室温放置, 待温度平衡至室温, 混匀后备用;

(2) qPCR工作液配制 (整个过程中避免被光源直射)

根据所检测的样品数量按照下表配制反应液, 建议每次检测均设置阴性对照。

待检样品数为n时, 需配制反应体系数N=【待检样品数(n) + 标准曲线样品(5) + 阴性对照NTC (1)】×重复孔数+1。

组分名称	组分用量	工作浓度
2×Plasmid qPCR SuperMix	15 μl×N	1×
6× Plasmid引物探针混合液	5 μl×N	1×

(3) 将配制好的qPCR工作液充分混匀后瞬时离心, 待用。



3、加样 (在样品处理区进行)

向每个PCR管中分装加入前一步准备好的qPCR工作液20 μ l, 并在相应孔中按顺序分别添加10 μ l模板: 阴性对照 NTC、待测样品、标准曲线样品。建议以上三类样品在反应孔设计布板时分区放置, 以免互相污染, 导致测试结果不准确。盖上管盖或使用光学膜封闭后, 轻柔振荡混匀, 离心使液体全部沉于管底。

4、qPCR扩增 (在扩增与分析区进行)

将PCR反应管放入扩增仪样品槽, 按照对应顺序设置阴性对照、待测样品、标准曲线样品, 并设置样品名称。

(1) 荧光通道选择

选择FAM通道 (Reporter: FAM, Quencher: none) 检测质粒DNA;

参比荧光 (Passive Reference) 设置为none。

设置反应体系为30 μ l。

(2) qPCR扩增程序设置

温度	时间	循环数	信号采集
95℃	10 min	1	√
95℃	15 s	40	
60℃	1 min		

5、结果分析

在结果分析软件中, 将相应反应孔的样品类型分别设置为NTC (阴性对照)、Unknown (待测样品) 以及Standard (标准曲线样品), 并对Standard样品的浓度赋值。设置完成后运行分析, 软件自动生成标准曲线与扩增曲线以及相应数值。生成的标准曲线相关系数 R^2 应不低于 0.99, 斜率应 -3.1 ~ -3.6 之间, 扩增效率应在90% ~ 110% 之间。待测样品浓度根据标准曲线自动生成后, 换算出原样品中质粒DNA浓度。

标准曲线需要进行调整时, 可参照以下原则:

- 根据复孔间 Ct 值差异 ≤ 0.3 的原则, 可对 DNA Standards原始 Ct 值进行过滤。
- NTC阴性对照应比标准曲线最低浓度Ct值大或者无显示。
- 结果分析的参数设置需依据具体的机型和软件版本, 一般由仪器自动判读。但有时系统给出的阈值线离基线太近, 导致复孔之间 Ct 值相差甚远, 可手动调节阈值线至合适位置。此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常, 再进行数据分析。
- 为了确保定量准确, 请至少使用 5 个浓度梯度制作标准曲线。
- 如果标准曲线参数不佳, 超出了有效范围, 建议重新进行定量。

6、质控样品

在测试过程中, 为确保实验结果的可信度, 可增加加样回收质控ERC样品以及阴性质控NCS样品, 同步进行核酸提取、检测步骤。建议的样品配制方法如下:

- 加样回收质控ERC样品: 180 μ l待测样品中加入20 μ l S3, 混匀作为ERC;
- 阴性质控NCS样品: 200 μ l 标准品稀释液 (或生物制品基础溶液), 作为NCS。

二者的质控判断标准如下:

- 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。
- NCS的 Ct 值应大于标曲最低浓度 Ct 值。

检验方法的局限性

不合理的样品采集、转运及处理, 以及不当的实验操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。

产品性能指标

具体参考产品性能报告。

注意事项

- 本产品仅用于科研使用, 使用前请仔细阅读本说明书。
- 实验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项, 对每次实验进行质量控制。
- 实验室管理需严格遵照PCR基因扩增实验室的管理规范, 实验人员必须进行专业培训, 实验过程严格分区进行, 所有消耗品仅作一次性使用, 实验操作的每个阶段使用专用仪器和设备, 各区各阶段用品不可交叉使用。所有检测样品均视为具有传染性的物质, 实验过程中穿工作服并经常更换手套, 以避免样品间的交叉污染; 样品操作、废弃物处理应符合相关法规要求: 《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。
- 所有试剂使用前均需彻底化冻、混匀。

本产品仅供研究, 不用于临床诊断。

版本号: V1.0-202404

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

