

## PerfectStart<sup>®</sup> HEK293 DNA Quantification Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号: DH152

版本号: Version 1.0

保存: -20℃保存两年。

### 产品说明

本产品用于对各类生物制品中的HEK293细胞DNA进行定量检测, 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。本产品中的2×HEK293 qPCR SuperMix 含PerfectStart Taq热启动酶(利用3种单克隆抗体与Taq DNA Polymerase高效结合, 有效地封闭了DNA聚合酶活性, 阻止了低温下的非特异性扩增)、针对HEK293细胞DNA检测特殊优化的qPCR反应缓冲液、dNTPs、PCR增强剂、稳定剂。此外, 本反应液引入了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

- 3种抗体封闭, 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	DH152 -01	主要成分
2×HEK293 qPCR SuperMix	2× 750 μl	PCR酶、dNTPs、镁离子、PCR缓冲液等
6× HEK293引物探针混合液	500 μl	HEK293 细胞 DNA引物探针
HEK293 DNA标准品 (30 ng/μl)	50 μl	HEK293 细胞 DNA
标准品稀释液	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HEK293 DNA标准品以及标准品稀释液, 冰上放置待完全融化后, 轻柔振荡混匀瞬时离心;
- (2) 梯度稀释: 取干净1.5 ml离心管6支, 标为S0、S1、S2、S3、S4、S5, 并在每管中加入90 μl标准品稀释液。从HEK293 DNA标准品中取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。

标准品S0-S5浓度如下:

标准品	S0	S1	S2	S3	S4	S5
浓度	3 ng/μl	300 pg/μl	30 pg/μl	3 pg/μl	300 fg/μl	30 fg/μl

- (3) 稀释得到的S1-S5作为标准曲线样品放置于冰上备用, S0留存。实验结束后剩余标准品以及稀释液建议保存于-20℃, 且建议标准品S1-S5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×HEK293 qPCR SuperMix	15 μl×N	1×
6× HEK293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  $\mu$ l, 并在相应孔中按顺序分别添加10  $\mu$ l模板: 阴性对照 NTC、待测样品、标准曲线样品(S1-S5)。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HEK293 DNA;

参比荧光 (Passive Reference)设置为none。

设置反应体系为30  $\mu$ l。

#### (2) qPCR扩增程序设置

温度	时间	循环数	信号采集
95°C	5 min	1	
95°C	5 s	40	
60°C	30 s		√

### 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样品的浓度赋值为300、30、3、0.3、0.03 (单位为 pg/ $\mu$ l)。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HEK293细胞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 $\leq 0.3$  的原则, 可对 DNA Standards (S1-S5)原始 Ct 值进行过滤。
- NTC阴性对照应比标准曲线最低浓度Ct值大于3以上, 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  $\mu$ l待测样品中加入20  $\mu$ l S3, 混匀作为ERC;
- 阴性质控NCS样品: 200  $\mu$ 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: V1.0-202312

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

