

## Plasmid DNA Residue Detection Kit

### 质粒 DNA 残留检测试剂盒

#### 产品简介

质粒 DNA 残留检测试剂盒是用于定量分析检测疫苗、基因和细胞治疗产品等生物制品中质粒 DNA 残留的试剂盒。因为这些生物制品的研发和生产过程中通常会用到病毒载体（如慢病毒、腺病毒等），而病毒载体大多采用质粒 DNA 瞬时转染包装细胞基质制备，所以为确保病毒载体纯度和安全性，这些附在病毒载体表面的质粒 DNA 在病毒纯化环节会作为杂质而去除。本试剂盒针对市场所用质粒共有 DNA 序列设计特异性引物，采用 qPCR 荧光探针原理，专一快速的检测残留的质粒 DNA，其最低检测限可以达到 1 copies/ $\mu$ L 水平，试剂盒配套有线性 Plasmid DNA Control（质粒 DNA 定量参考品）。该试剂盒可与本公司的磁珠法残留 DNA 样本前处理试剂盒(Cat#18461ES/18462ES)配套使用。

#### 产品信息

货号	41323ES50 / 41323ES60
规格	50 T / 100 T

#### 组分信息

组分编号	组分名称	41323ES50	41323ES60
41323-A	Plasmid qPCR Mix	0.75 mL	1.5 mL
41323-B	Plasmid Primer&Probe Mix	200 $\mu$ L	400 $\mu$ L
41323-C	DNA Dilution Buffer	1.8 mL $\times$ 2 管	1.8 mL $\times$ 4 管
41323-D	Linear Plasmid DNA Control ( $4 \times 10^8$ copies/ $\mu$ L)	25 $\mu$ L	50 $\mu$ L
41323-E	IC <sup>*</sup>	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L

\*IC: Internal control, 内部对照

#### 储存条件

1. 所有组分均干冰运输，-25~-15 $^{\circ}$ C保存，有效期 2 年。其中，41323-A 和 41323-B 均需避光保存。
2. 收到货后，请检查共 5 个组分是否齐全，并立即放入对应的保存温度中储存。

#### 注意事项

1. 本产品仅作科研用途。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
3. 使用本试剂前请仔细阅读说明书，实验应规范操作，包括样本处理、反应体系的配制及加样。
4. 每个组分在使用前都应充分震荡混匀，低速离心。

#### 适用机型

包含但不限于以下仪器：

Thermo Scientific: ABI 7500, ABI Quant Studio 5;

Bio-Rad: CFX96 Optic Module;

## 使用说明

### 1. Plasmid DNA Control 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

用试剂盒中提供的 DNA Dilution Buffer (DNA 稀释液) 将 Linear Plasmid DNA Control 定量参考品进行梯度稀释<sup>\*</sup>，稀释浓度依次  $4 \times 10^7$  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/ $\mu\text{L}$ 。

具体操作如下：

- 1) 将试剂盒中的 Plasmid DNA Control 定量参考品和 DNA Dilution Buffer 置于冰上融化，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 Std0、Std1、Std2、Std3、Std4、Std5、Std6。
- 3) 在标记为 Std0 的 1.5 mL 离心管中加 90  $\mu\text{L}$  DNA Dilution Buffer 和 10  $\mu\text{L}$  Plasmid DNA Control 定量参考品，Std0 即稀释为  $4 \times 10^7$  copies/ $\mu\text{L}$  的浓度，振荡混匀后低速离心 10 sec，该浓度可分装置于  $-25 \sim -15^\circ\text{C}$  短期保存（不超过 3 个月）<sup>\*\*</sup>，使用时避免反复冻融。
- 4) 在 Std1、Std2、Std3、Std4、Std5、Std6 离心管中先分别加入 90  $\mu\text{L}$  DNA Dilution Buffer<sup>\*\*\*</sup>，再进行梯度稀释<sup>\*\*\*\*</sup>，具体稀释方法如下：

稀释管	稀释比例	终浓度
Std1	10 $\mu\text{L}$ Std0 + 90 $\mu\text{L}$ DNA Dilution Buffer	$4 \times 10^6$ copies/ $\mu\text{L}$
Std2	10 $\mu\text{L}$ Std1 + 90 $\mu\text{L}$ DNA Dilution Buffer	$4 \times 10^5$ copies/ $\mu\text{L}$
Std3	10 $\mu\text{L}$ Std2 + 90 $\mu\text{L}$ DNA Dilution Buffer	$4 \times 10^4$ copies/ $\mu\text{L}$
Std4	10 $\mu\text{L}$ Std3 + 90 $\mu\text{L}$ DNA Dilution Buffer	$4 \times 10^3$ copies/ $\mu\text{L}$
Std5	10 $\mu\text{L}$ Std4 + 90 $\mu\text{L}$ DNA Dilution Buffer	$4 \times 10^2$ copies/ $\mu\text{L}$
Std6	10 $\mu\text{L}$ Std5 + 90 $\mu\text{L}$ DNA Dilution Buffer	$4 \times 10^1$ copies/ $\mu\text{L}$

表 1 标准品梯度稀释

<sup>\*</sup>每个浓度做 3 个复孔，该试剂可测试  $4 \times 10^6$  copies/ $\mu\text{L}$ ~ $4 \times 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$  线性范围。若需要，可适当扩大或缩小线性范围。

<sup>\*\*</sup>为减少反复冻融次数和避免污染，建议初次使用时将 DNA 定量参考品分装储存于  $-25 \sim -15^\circ\text{C}$ 。

<sup>\*\*\*</sup>已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于  $2 \sim 8^\circ\text{C}$  7 天，若长时间不用，请放置于  $-25 \sim -15^\circ\text{C}$ 。

<sup>\*\*\*\*</sup>为确保模板完全混匀，每个梯度稀释时需轻微震荡混匀约 1 min。

### 2. 样本加标回收质控 ERC 的制备

根据需要设置 ERC 中 Plasmid DNA 标准品浓度（以制备加  $4 \times 10^5$  copies Plasmid DNA 量的 ERC 为例），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，再加入 10  $\mu\text{L}$  Std3，混匀，标记为 ERC。
- 2) 加标回收 ERC 和同批待测样本一起进行样本前处理，制备加标回收 ERC 纯化液。

### 3. 阴性抽提质控 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. 无模板对照 NTC 的制备

根据实验设置无模板对照 NTC，具体操作如下：

- 1) 无模板对照 NTC 无需进行样本前处理，在 qPCR 法检测残留 DNA 含量阶段开始配置即可。

2) 每管或孔中 NTC 样本为 20  $\mu\text{L}$  Mix 混合液(即 15  $\mu\text{L}$  Plasmid qPCR Mix + 4  $\mu\text{L}$  Plasmid Primer&Probe Mix + 1  $\mu\text{L}$  IC) + 10  $\mu\text{L}$  DNA Dilution Buffer, 建议配置 3 个重复孔的量。

## 5. 反应体系

组分	体积( $\mu\text{L}$ )
Plasmid qPCR Mix <sup>*</sup>	15
Plasmid Primer&Probe Mix	4
IC	1
DNA Template <sup>**</sup>	10
总体积 <sup>***</sup>	30

表 2 标准品反应体系

<sup>\*</sup>根据反应孔数计算本次所需 Mix 混合液总量: Mix 混合液= (反应孔数+2)  $\times$  (15+4+1)  $\mu\text{L}$  (含有 2 孔的损失量)。通常, 每个样本做 3 个重复孔。

<sup>\*\*</sup>反应孔数= (6 个浓度梯度的标准曲线+1 个无模板对照 NTC+1 个阴性抽提质控 NCS+待测样 TS 个数+待测样本对应加标回收 ERC 个数)  $\times$  3。

NTC (No Template Control): DNA Dilution Buffer

NCS (Negative Control Solution): 样本基质溶液或 DNA Dilution Buffer 进行样本前处理后, 所得纯化液为 NCS

TS (Test Sample): 待测样本

ERC (Extraction Recovery Control): 待测样本中加入如 10  $\mu\text{L}$  的  $4 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$  标准品 DNA 后进行样本前处理, 所得纯化液为加标回收 ERC

<sup>\*\*\*</sup>加样完成密封好管子后, 请低速离心 10 sec 将管壁的液体离心收集至管底, 再震荡混匀 5 sec 以上, 完全混匀反应液, 再低速离心 10 sec 将管壁的液体离心收集至管底, 如有气泡, 需将气泡排尽。

下表为参考板位:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC		待测样本 TS1	待测样本 TS1	待测样本 TS1		标准曲线 Std1	标准曲线 Std1	标准曲线 Std1			
B	NTC		待测样本 TS2	待测样本 TS2	待测样本 TS2		标准曲线 Std2	标准曲线 Std2	标准曲线 Std2			
C	NTC		待测样本 TS3	待测样本 TS3	待测样本 TS3		标准曲线 Std3	标准曲线 Std3	标准曲线 Std3			
D							标准曲线 Std4	标准曲线 Std4	标准曲线 Std4			
E	NCS		样本加标 ERC1	样本加标 ERC1	样本加标 ERC1		标准曲线 Std5	标准曲线 Std5	标准曲线 Std5			
F	NCS		样本加标 ERC2	样本加标 ERC2	样本加标 ERC2		标准曲线 Std6	标准曲线 Std6	标准曲线 Std6			
G	NCS		样本加标 ERC3	样本加标 ERC3	样本加标 ERC3							
H												

表 3 上机参考板位

该示例是对 Plasmid 残留 DNA qPCR 法检测操作的展示, 检测样本包括: 6 个浓度梯度的 Plasmid DNA 标准曲线、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、3 个待测样本 TS、3 个加样回收 ERC。建议每个样本做 3 个重复孔。

## 6. 扩增程序参数设置 (两步法) (以 ABI 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 2.0 为例)

1) 创建空白新程序, 选择绝对定量检测模板。

2) 创建 2 个检测探针, Target 1 命名为“Plasmid-DNA”, 选择报告荧光基团为“FAM”, 猝灭荧光基团为“None”; Target 2 命名为“IC”, 选择报告荧光基团为“CY5”, 猝灭荧光基团为“None”。参比荧光为“ROX” (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“4000000”、“400000”、“40000”、“4000”、“400”、“40” (含义为每孔 DNA 浓度, 单位为 copies/ $\mu\text{L}$ ), 并且在相应的“Sample Name”一栏命名为“ $4 \times 10^6$  copies/ $\mu\text{L}$ ”、“ $4 \times 10^5$  copies/ $\mu\text{L}$ ”、“ $4 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$ ”。

μL”、“ $4 \times 10^3$  copies/μL”、“ $4 \times 10^2$  copies/μL”、“ $4 \times 10^1$  copies/μL”；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 TS 孔、样本加标回收 ERC 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”、“TS”、“ERC”，参比荧光勾选“ROX”，之后点击“Start Run”，开始仪器运行。

4) 扩增程序设置：设置三步法扩增程序，反应体积 30 μL。

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	5 min	1
变性	95°C	15 sec	45
退火/延伸（收集荧光）	60°C	30 sec	

表 4 扩增程序

## 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，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  $-3.6 \sim -3.1$ 。

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、样本加标回收 ERC 的检测值，单位为 copies/μL。

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) 根据待测样本 TS 和样本加标回收 ERC 的检测结果计算加标回收率，加标回收率要求在 50%~150% 之间。加标回收率计算公式： $\text{回收率}(\%) = \{\text{样本加标测定值}(\text{eg. copies}/\mu\text{L}) - \text{样本测定值}(\text{eg. copies}/\mu\text{L})\} \times \text{洗脱体积}(\text{eg. } \mu\text{L}) / \text{DNA 加入量理论值}(\text{eg. copies}) \times 100\%$ 。

6) 阴性质控 NCS 的 Ct 值应大于标曲最低浓度 Ct 的均值。

7) 无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值  $\geq 35$ 。

8) 待测样本的 Ct-IC 值应该与 NTC 的 Ct-IC 值一致或  $\pm 1$ ，如果待测样本的 Ct-IC 值与 NTC 的 Ct-IC 值相比明显增大，则表明样本可能存在明显抑制。如果同时测试加标样本，则优先考虑样本加标回收率结果，IC 结果作为参考。