



质粒 DNA 残留（qPCR）检测试剂盒

产品说明书

货号：ZL10311D-100

版本号：A/0

生效日期：2024.11.21

仅供研究使用

君研生物科技（山西）有限公司

Shanxi Junyan Bioscience Co.,Ltd

目录

1. 产品信息1

 1.1 产品背景1

 1.2 产品用途1

 1.3 产品特点1

 1.4 检测原理1

 1.5 实验室区域划分指导 2

 1.6 分析方法验证指导 2

 1.7 产品性能指标 3

 1.8 试剂盒组分 3

 1.9 储存条件与有效期 3

2. 操作方法3

 2.1 准备工作3

 2.2 操作流程4

3. 结果分析7

4. 注意事项8

5. 常见问题及分析 9

6. 关联产品 11

1. 产品信息

1.1 产品背景

近年来，随着生物医药技术的飞速发展，细胞与基因治疗（Cell and Gene Therapy, CGT）也取得了初步的成功，大量 CGT 产品已进入临床试验。质粒作为基因工程中最常见的载体，在慢病毒、腺病毒、mRNA 疫苗等的制备或生产中起着非常重要的作用。由于 DNA 的稳定性，在生产过程中容易产生残留，同时生物制品中质粒残留 DNA 不仅是生产中带来的杂质，而且存在一定的安全隐患，进入人体后可造成多种多样的后果，例如致癌性，感染性，潜在的重组风险和免疫原性增加等风险。因此，各国的监管机构都对生物制品中残余 DNA 的含量进行了严格管控。2022 年 5 月份 CDE 颁布的《体内基因治疗产品药学研究与评价技术指导原则》就明确指出 AAV 等易于将非载体 DNA 包装入病毒颗粒的病毒载体，在选择包装质粒时应考虑相关外源 DNA 包装入病毒颗粒的潜在风险。药监局规定，细胞表达产物的最终产品中 DNA 含量应尽可能低，必须采用高灵敏度的方法进行定量。《中国药典》2020 年版三部通则 3407 规定，宿主细胞 DNA 残留量检测方法为 DNA 探针杂交法、荧光染色法和定量 PCR 法。

1.2 产品用途

本试剂盒可快速准确定量检测生产过程中依赖质粒的样本残留检

测，例如慢病毒、腺病毒、mRNA 疫苗等生物制品。该试剂盒的线性范围为： $1 \times 10^6 \text{ copies}/\mu\text{L} \sim 1 \times 10^1 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 。本试剂盒与君研生物宿主细胞残留 DNA（磁珠法）样本前处理试剂盒配套使用。

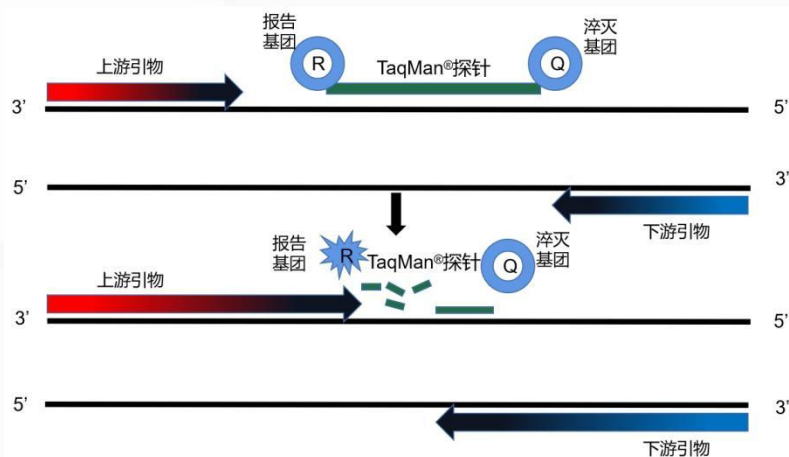
1.3 产品特色

试剂盒的线性范围为： $1 \times 10^6 \text{ copies}/\mu\text{L} \sim 1 \times 10^1 \text{ copies}/\mu\text{L}$ ，灵敏度可达 $5 \text{ copies}/\mu\text{L}$ ，满足客户对残留检测灵敏度的需求，可精准快速定量其质粒 DNA 残留量。

1.4 检测原理

依据《美国药典》<509>通则和<1130>以及《中国药典》通则<3407>中的各种检测方法以及毛细管电泳（CE）的缺陷（灵敏度低，背景高），最终选择更准确、可靠、科学的荧光探针（TaqMan®）qPCR 法作为细胞残留 DNA 片段检测的方法。TaqMan®荧光探针是一种寡核苷酸探针，其 5'末端携带荧光基团（报告基团），如 FAM、TET、VIC 等，3'端携带淬灭基团，如 TAMRA、BHQ1 等。PCR 扩增时在加入一对引物的同时加入一条特异性的荧光探针，探针完整时，荧光基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收。PCR 扩增时，Taq 酶的 5'-3'外切酶活性将探针酶切降解，使荧光基团和淬灭荧光基团分离，从而荧光监测系统（荧光定量 PCR 仪）可接收到荧光信号，即每扩增一条 DNA 链，就有一个荧光分子形成，实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步。该方法具有

特异性强、灵敏度高特点，在目前生物制药细胞核酸残留检测中被广泛使用。



1.5 实验室区域划分指导

- 样本准备区：准备模板的区域如模板的梯度稀释，包括溶解和稀释样本。
- 试剂配制区：除了模板和样本之外的所有其它试剂的独立配制区，可为独立的物理隔离区（如超净工作台），如用商用试剂盒，其除定量参考品以外其他组分的配制混合即在此区域完成。
- 加样区：在引物探针酶混合物中加模板或者样品。
- PCR 扩增区：与试剂配制区完全隔离的上机的区域。经验证后也可在此区域加 DNA 模板。
- 注：具体需依据实际情况进行调整，但需做好验证工作和定期污染

监测。

1.6 分析方法验证指导

注：君研生物可提供符合各类型客户（如：产业型客户、科研型客户等）需求的产品质检报告及性能验证报告。若客户需自行验证可参考以下指导。

- 建议所有使用该试剂盒的实验室按需可做以下验证：标准品线性、样本线性、准确度（加标回收率）、定量限、重复性（精密度）、分析特异性以及阴性参考品符合率。
- 样本线性：依据 YY/T 1182-2020 的相关要求，在线性范围内，取接近线性范围上限的高值样本按一定比例（如 5 倍或 10 倍）稀释为至少 5 种浓度，其中低值浓度样本须接近线性范围的下限，将每一浓度样本检测 1 次或多次，计算每一浓度的对数均值和稀释比例（或理论浓度）的对数值，以浓度的对数均值为 Y 稀释比例（或理论浓度）的对数值为 X 进行线性拟合，计算其线性相关系数 r。
- 分析特异性验证：验证需避免工艺杂质对检测结果的干扰，必要时可对样本进行核酸提取纯化。为避免基质干扰和保证检测有效性建议使用纯度较高的 DNA 进行相应稀释后来做验证。
- 重复性/定量限：验证时，如需同时配制标曲，需控制 CV，避免重复操作过多，CV 偏大影响标曲建立和重复性/定量限验证，具体可

参考君研生物所提供的性能验证报告或咨询相关技术支持。

- **数据分析：**由于仪器不同，数据阈值线会存在区别，故在分析数据时需依据实际情况统一阈值线。
- **样本核酸提取纯化：**可与君研生物“宿主细胞残留 DNA（磁珠法）样本前处理试剂盒”配合使用。该试剂盒主要用于生物制品样本中微量核酸的提取，可精准抽提各种生物制品中宿主细胞残留 DNA，适用于多种基质缓冲溶液，可有效提取纯化微量的 DNA。且君研生物配套有全自动核酸提取仪以供客户选择。

1.7 产品性能指标

- **线性范围：** $1 \times 10^6 \text{ copies}/\mu\text{L} \sim 1 \times 10^1 \text{ copies}/\mu\text{L}$ ；
- **标准品线性：** $R^2 \geq 0.980$ ，扩增效率 $90\% \leq \text{Eff}(\%) \leq 110\%$ ，各浓度检测值 $\text{CV} < 15\%$ 。
- **准确度（加标回收率）：**70%-130%。
- **定量限：**5 copies/ μL ， $\text{CV} \leq 20\%$ ，测量偏差不大于 $|\pm 20\%|$ 。
- **精密性（重复性）：**高、中两个浓度参考品各 10 次，变异系数 $\text{CV} < 15\%$ 。
- **分析特异性：**考察生物制品生产中常用的 DNA 对检测试剂盒的干扰，检测均值小于定量限或未检出，判定无干扰。
- **阴性参考品符合率：**NTC 为 Undetermined 或 Ct 值 > 35 。
- **适用机型（包括但不限于）：**ABI QuantStudio 5, ABI 7500 等。

- **冻融稳定性：**5 次以上。

1.8 试剂盒组分与储存条件

表 1 试剂盒组分及储存条件

编号	组成	规格	储存条件
1	质粒 Primer&Probe MIX	550 μL ×1 管	-20℃避光
2	2×qPCR Reaction MIX	1.6mL×1 管	
3	质粒线性化 DNA 定量参考品 ($1 \times 10^8 \text{ copies}/\mu\text{L}$)	50 μL ×1 管	-20℃
4	DNA 稀释液	1.5mL×3 管	

1.9 储存条件与有效期

试剂盒应在-20℃及以下条件下保存，有效期为 12 个月。开封后未使用完的试剂盒注意仍在规定储存条件下保存。

生产日期和有效期见试剂盒标签。

2. 操作方法

2.1 准备工作

2.1.1 试剂盒准备：

将试剂盒各组份置于冰上或 4℃，确保充分溶解后开始操作。

2.1.2 需自备的耗材及设备：

- 1) 荧光定量 PCR 仪、涡旋仪、离心机
- 2) 高精度移液器及一次性无菌无酶低吸附带滤芯吸头 (0.5-10 μ L、10-100 μ L、20-200 μ L、100-1000 μ L)
- 3) 1.5mL 无菌无酶低吸附离心管
- 4) 无菌无酶八联管或 96 孔 qPCR 板

2.2 操作流程

2.2.1 操作详细步骤

2.2.1.1.qPCR 反应液的制备

1) 根据所需检测的参考品和待测样品数量 (一般做 3 组复孔), 计算反应所需孔数:

反应孔数= (参考品 ST1-6+1 个无模板对照 NTC+待测样品) $\times$ 3

2) 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR MIX 总量:

qPCR MIX = (反应孔数+2 或 3) $\times$ 15 μ L (2 $\times$ qPCR Reaction MIX) + (反应孔数+2 或 3) $\times$ 5 μ L (质粒 Primer&Probe MIX) (2 或 3 为操作损失量)

3) 将所用试剂置于冰上完全溶解, 轻微振荡混匀, 瞬时离心, 按下表所示配制:

表 2 qPCR MIX 配制表

组分	单个反应量
----	-------

2 $\times$ qPCR Reaction MIX	15 μ L
质粒 Primer&Probe MIX	5 μ L
总体积	20 μ L

4) 将配制的 qPCR MIX, 轻微振荡混匀, 瞬时离心, 按 20 μ L/孔分装至八联管或者 96 孔板中。

5) 将 DNA 稀释液按 10 μ L/孔加到分装了 qPCR MIX 八联管或者 96 孔板中, 具体加样见表 4。

2.2.1.2.定量参考品的稀释:

(注: 根据试剂盒提供的标准品按照需求配制)

用试剂盒提供的 DNA 稀释液将 DNA 定量参考品 (1×10^8 copies/ μ L) 系列倍比 (稀释倍数: 10 倍) 稀释, 稀释浓度依次为 1×10^7 copies/ μ L, 1×10^6 copies/ μ L, 1×10^5 copies/ μ L, 1×10^4 copies/ μ L, 1×10^3 copies/ μ L, 1×10^2 copies/ μ L, 1×10^1 copies/ μ L。具体步骤如下:

1) 将试剂盒中的 DNA 定量参考品和 DNA 稀释液置于冰上或 2-8 $^{\circ}$ C 条件下融化。待完全溶解后, 轻微振荡混匀, 离心 3~5 s。

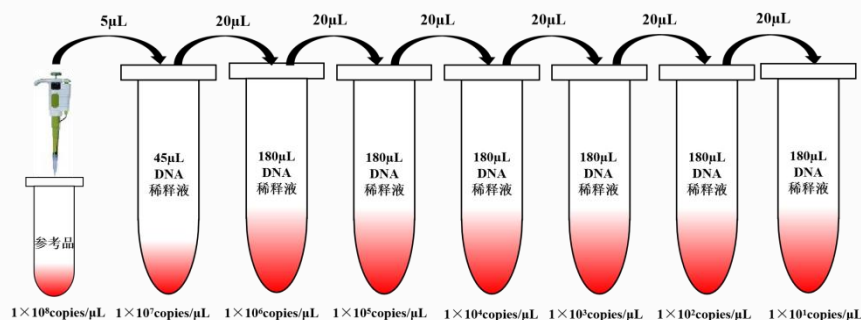
2) 取干净的 1.5 mL 离心管, 分别标记为 ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6。

3) 在 ST0 管中用 DNA 稀释液将 DNA 定量参考品 (1×10^8 copies/ μ L) 稀释至 1×10^7 copies/ μ L, 轻微振荡混匀, 离心 3~5 s。确保 DNA 定量参考品与 DNA 稀释液充分混匀, 使用时避免反复冻融。

4) 在 ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6 管中分别加入 180 μ L DNA 稀释液, 再进行梯度稀释, 稀释方法如下所示:

表 3 DNA 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	终浓度 (copies/ μ L)
ST1	20 μ L ST0+180 μ L DNA 稀释液	1×10^6
ST2	20 μ L ST1+180 μ L DNA 稀释液	1×10^5
ST3	20 μ L ST2+180 μ L DNA 稀释液	1×10^4
ST4	20 μ L ST3+180 μ L DNA 稀释液	1×10^3
ST5	20 μ L ST4+180 μ L DNA 稀释液	1×10^2
ST6	20 μ L ST5+180 μ L DNA 稀释液	1×10^1



【注】: 标准曲线浓度点可根据实际验证结果进行选择, 应至少包含 6 个浓度点。

已融化未使用的 DNA 稀释液可在 2-8 $^{\circ}$ C 短暂保存, 若长期不使用, 请储存于 -20 $^{\circ}$ C。

稀释方法可根据实验需要进行调整。

2.2.1.3.qPCR 加样:

1) 将所需试剂置于冰上操作, 轻微振荡混匀, 瞬时离心, 加样 (总体积 30 μ L) :

表 4 MIX 各反应孔加样示例

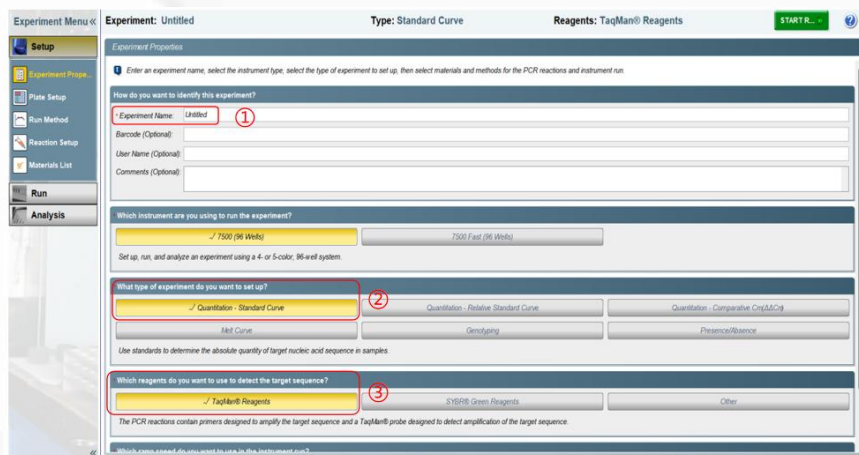
参考品	参考品 ST1-6 各 10 μ L+所需 qPCR MIX 量 20 μ L
无模板对照 NTC	DNA 稀释液各 10 μ L+所需 qPCR MIX 量 20 μ L
待测样品	待测样品各 10 μ L+所需 qPCR MIX 量 20 μ L

2) 实验可使用无菌无酶的八联管或者 96 孔板进行反应, 需去除反应体系中的气泡, 并离心至管底准备反应。

2.2.1.4.qPCR 反应程序参数设置:

以美国 ABI 7500 Real-Time PCR System、软件版本 2.06 为例。

1) 在 Experiment Properties 页面创建空白新程序如图所示:

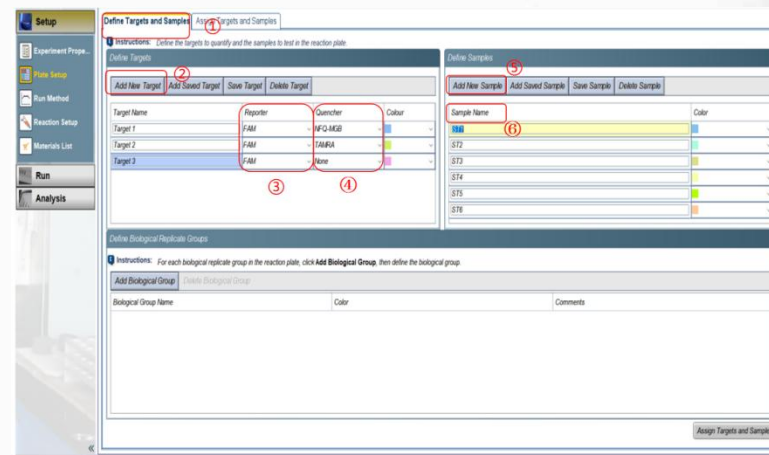


①Experiment name: 修改实验名称。

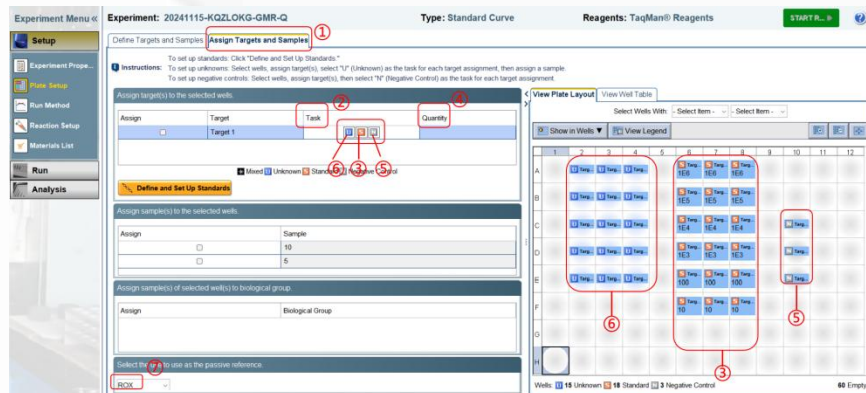
②Experiment type: 选择程序 (Quantitation-Standard Curve)。

③Reagents: 选择实验方法 (TaqMan® Reagents)。

2) 创建该产品检测探针, 选择 **Define Targets and Samples** ①界面, 点击 **Add New Target** ②创建探针, 在 Target Name 中编辑探针名称并命名, 在 Reporter ③和 Quencher ④中选择所需的荧光基团和淬灭基团。**本产品荧光基团选择 FAM, 淬灭基团选择为 None, 参比荧光为 ROX。** 点击 **Add New Sample** ⑤创建样品, 在相应的 Sample name ⑥一栏中命名样品的名称。

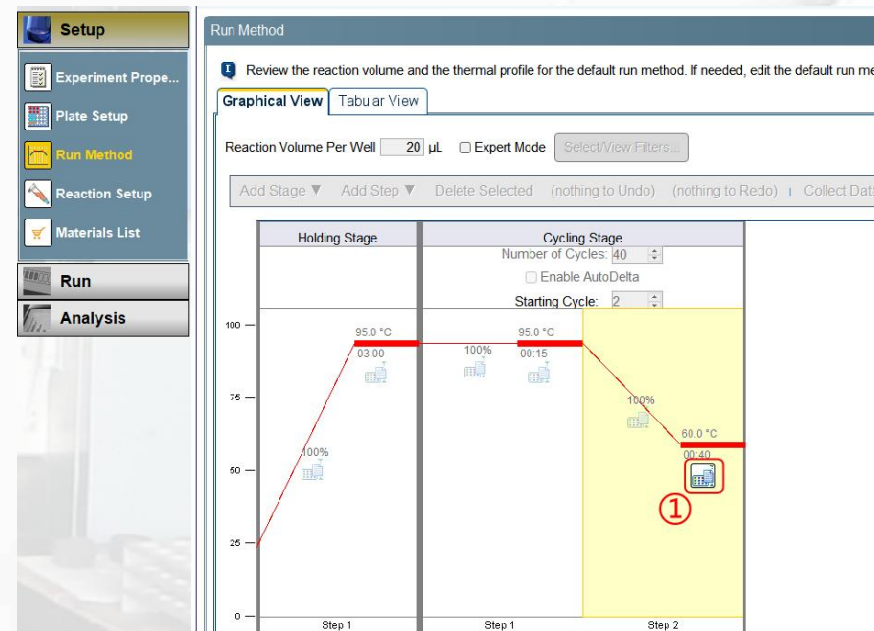


3) 在 Plate Setup **Assign Targets and Samples** ①界面, 将标准曲线孔在 Task ②一栏设置为“S”③, 并且在 Quantity ④一栏分别赋值为 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 (单位为 copies/ μ L), 并且在相应的 Sample name 一栏中命名为 ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6。在 Plate Setup **Assign Targets and Samples** ①界面中, 将无模板对照 NTC 孔在 Task ②一栏设置为“N”⑤, 将待测样本孔在 Task ②一栏设置为“U”⑥, 并且在相应的 Sample name 一栏中命名样品的名称 (图例仅供参考)。



4) 设置反应程序：

Stage1	预变性	Reps: 1	95°C	3min	程序中 <u>60°C 40 s</u>
			95°C	15s	处设置为荧光收
Stage2	循环反应	Reps: 40	60°C	40s	集①； 反应体积 30μL。

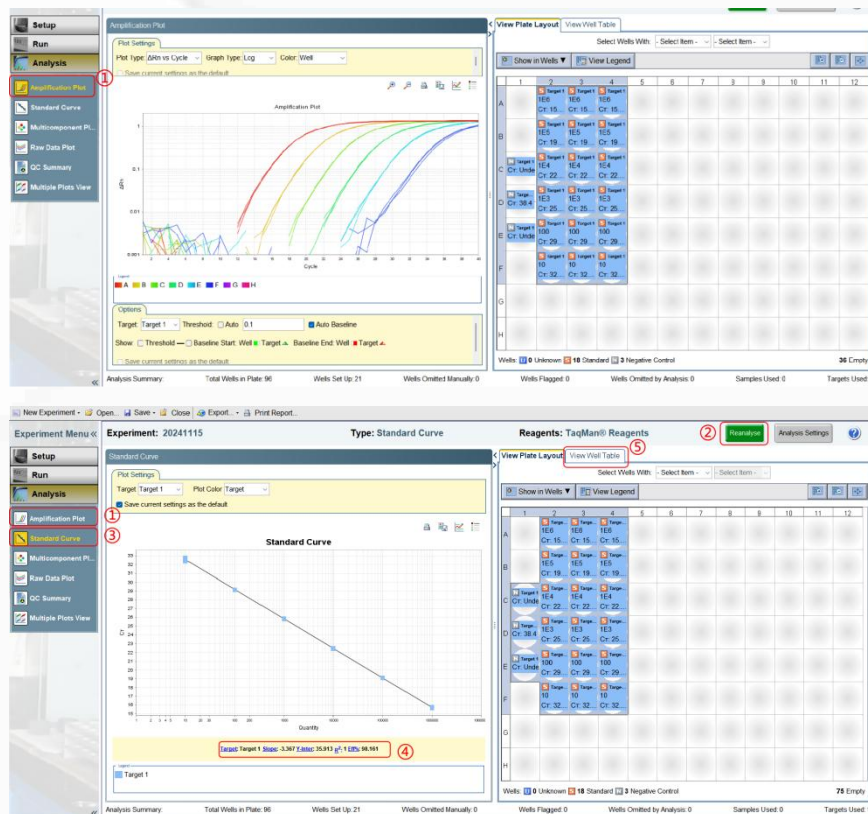


5) 点击 Run 界面的“Start Run”按钮进行 PCR 测定。

3. 结果分析

以美国 ABI 7500 Real-Time PCR System、软件版本 2.06 为例。

1) 在 Analysis 的 Amplification Plot①面板中，点击 Reanalyse②，初步查看扩增曲线的形态是否正常。在 Analysis 的 Standard Curve③面板中，可读取标准曲线的斜率（Slope）、R² 和扩增效率（Eff%）④等。在 Analysis 的 View Well Table⑤面板中，Quantity Mean 一栏可读取待测样本的检测值，单位为 copies/μL。（图例仅供参考）



2) 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。

4. 注意事项

1) 本试剂盒已通过稳定性(冻融等因素)的验证, 无需分装。

2) 阴性样品(2×qPCR Reaction MIX、Primer&Probe MIX 和 DNA 稀释液等)和阳性样品(参考品和待测样品等)的配制和加样环境需区分区

域, 不可在一个区域内操作, 配制人员需穿戴整齐, 戴好口罩、手套和穿好洁净服。

3) 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, 使用移液器移液时, 需避免液体挂壁。

4) 试剂盒必须在有效期内使用, 每次实验均需重新制备相应的标准曲线, 不建议不同标准曲线之间混用, 不建议不同批次的相关试剂混用。

5) 试剂盒内所有组分建议在低温环境融化后使用, 且需确保其充分溶解, 各组分使用前需充分混匀, 以保证试剂的均一性, 经混匀的试剂需经短暂离心, 以使管壁及盖子上的液体全部集中于管底。若发现 DNA 稀释液中有析出物, 建议于 37 °C 条件下进行孵育, 使 DNA 稀释液完全溶解。

6) 只有严格遵守说明书的操作方法, 全部使用本试剂盒配套的试剂才能保证最佳检测效果。

7) 最终的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。

8) 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到样本的可能使用量, 预留充足的样本。

9) 本试剂盒仅供研究使用, 不用于临床诊断。

5. 常见问题及分析

若实验结果有问题，联系技术支持，也可参考以下信息找出原因。

问题描述	可能原因	相应对策
无 CT 值	PCR 程序设置错误，检测荧光信号的步骤有误	程序中 60°C 40 s 处设置为荧光收集的步骤
	引物或探针降解	可通过 PAGE 电泳检测引物和探针是否降解
	模板量可能降解或上样量不足	如果发生模板降解，应考虑样本准备中杂质的引入及反复冻融的情况
数值不在标准范围内	配制反应体系时计算出现错误	体系配制计算时，多次复核计算结果
标准曲线不佳	DNA 定量参考品稀释、混匀或者加样误差，使得参考品不呈梯度	移液设备应精确，移液时液体未出现挂壁现象，液体每一步转移前应充分混匀（查看 ROX 线是否异常），稀释倍数应合理，移液时应注意液体是否有按规定体积转移
	参考品出现降解	参考品反复冻融应在指定次数内

	模板中存在抑制物	查看 ROX 线是否异常，重新稀释模板。
CT 值过晚	PCR 各种反应成分的降解或加样量的不足	查看 ROX 线是否异常，琼脂糖凝胶电泳以及 PAGE 电泳等验证反应成分是否降解，减少稀释度重复实验
	模板中存在抑制物	查看 ROX 线是否异常，重新稀释模板。
阴性对照扩增有信号	反应体系组分（如，DNA 稀释液）被污染；标本间的交叉污染或产物污染；操作环境中气溶胶造成污染；仪器或 PCR 管壁有荧光染料残留	实验过程中，更换新的 MIX 重复实验；反应体系在超净工作台内配制；对实验室进行严格的区分，减少气溶胶污染；使用带滤芯的枪头；建议对操作环境进行处理，或者更换新的环境、加样器、枪头等；清洁仪器，做背景测试和校准；更换管材，使用管材应避免荧光染料污染。
扩增曲线异常	模板的浓度太高或者降解或者体系未混匀以及充分溶解；荧光染料的降解；液体挥发	查看 ROX 线以及相应多组分图线是否异常，重新稀释，上机前确认管材是否密封，程序结束取出时注意查看液体体积是否异常；反应管内留有气

	发，耗材气密性等问 题引起液体蒸发，没 有很好地聚集在管子 里；气泡。操作问题 如移液枪加样引起的 气泡问题。仪器设置 不当引起的曲线异常	泡，由于温度升高后气泡破裂，使仪 器检测到的荧光值突然降低所致；进 行扩增反应之前要仔细检查反应管内 是否有气泡残留；基线设置不当，如 扩增曲线断裂或下滑：基线的终点值 大于 Ct 值。减小基线终点 (Ct 值- 4)，重新分析数据。
扩增效率低	荧光染料是否降解； 反应体系中有 PCR 反 应抑制物；DNA 定量 参考品稀释、混匀或 者加样误差。	查看 ROX 线以及相应多组分图线是 否异常，重新稀释；是加入模板时所 引入的，应先把模板适度稀释，再加 入反应体系，减少抑制物的影响；移 液设备应精确，移液时液体未出现挂 壁现象，液体每一步转移前应充分混 匀（查看 ROX 线是否异常），稀释 倍数应合理，移液时应注意液体是否 有按规定体积转移
扩增效率 过高	出现非特异扩增，反 应体系内模板浓度太	去除模板浓度最高的反应孔并重新分 析标准曲线，重新稀释模板

	高以及模板核酸质量 较差，可能导致出现 抑制 PCR 反应的现 象	
扩增曲线不 平滑	试剂未混匀；模板中 存在抑制物；荧光信 号相互存在一定干扰	液体每一步转移前应充分混匀（查看 ROX 线是否异常）；重新稀释模板； 查看机型是否与适用机型匹配以及试 剂盒所涉及荧光信号是否与对应机型 适配
CT 值前后 差异大	阈值线设置不一致； 仪器不一致	统一阈值线以及仪器比较数据；由于 市场上核酸检测类产品靶点以及组分 体系选择未统一，故试剂盒标准曲线 CT 值会存在差异，如有国家标准品可 用国家标准品作为内控品比较数值的 准确度

6. 关联产品

品名	货号
质粒 DNA 残留（qPCR）检测试剂盒 (庆大霉素抗性基因)	ZLG0311A-100
质粒 DNA 残留（qPCR）检测试剂盒 (卡那霉素抗性基因)	ZLK0311A-100
宿主细胞残留 DNA（磁珠法） 样本前处理试剂盒	HQ0211D/E-100
全自动核酸提取仪	N0231A-32

详情请点击[君研产品](#)查看，如需产品技术支持，请点击[技术支持](#)咨询。

君研生物科技（山西）有限公司

地 址：山西省太原市小店区唐槐路 96 号

网 址：www.junyanbios.cn

销售热线：15234188795

技术支持：18734150104/19503412257

邮 箱：sales@junyanbios.cn

