



版本号：TRS0124-V0

农杆菌残留 DNA 检测试剂盒 (双重 qPCR-荧光探针法) 说明书

货 号：

TRS0124-100(100T)

TRS0124-050S(50T)



一、试剂盒简介

农杆菌残留 DNA 检测试剂盒是一款专为定量检测各种生物制品的中间品、半成品及成品中农杆菌宿主细胞残留 DNA 而设计的专用试剂盒。

本试剂盒采用了多重 qPCR 荧光探针技术，定量检测样品中农杆菌宿主细胞残留 DNA。检测快速、灵敏度高、特异性强，最低检测限可以达到 fg 水平。试剂盒配套有农杆菌定量参考品已溯源至国家标准品，准确度高。本试剂盒包含有外源性靶标的引物、探针和模板，通过外源性靶标检测结果来监测样本提取及试剂配制过程，避免假阴性结果。

本试剂盒可与本公司的宿主细胞残留 DNA 样品前处理试剂盒(磁珠法)配套使用，准确定量样品中农杆菌残留 DNA。

二、储存条件及有效期

1. 在避光-20±5℃条件下储存，有效期 12 个月。
2. 泡沫盒/箱加干冰或冰盒运输，开瓶后避光-20±5℃储存。
3. 产品批号、生产日期见外包装盒。

三、试剂盒规格及组分

组分名称	TRS0124-100 (100T)	TRS0124-050S (50T)	保存
农杆菌 DNA 定量参考品 (30ng/μL)	40μL	40μL	-20±5℃
2×qPCR reaction buffer	800μL×2	800μL	-20±5℃
IC mix	150μL	150μL	-20±5℃，避光
农杆菌 primer&probe mix	400μL	200μL	-20±5℃，避光
DNA 稀释液	1.5mL×4	1.5mL×2	-20±5℃

四、适用机型（包括但不限于）

ABI 7500 Real-Time PCR System

SLAN-96P/S 全自动医用 PCR 分析系统

五、相关设备耗材

一次性无尘手套、1.5ml 无菌低吸附离心管、qPCR 专用无菌无酶八联排管或 96 孔板、1000μL、100μL、10μL 移液器和无菌低吸附带滤芯枪头、荧光定量 PCR 仪、掌式离心机、涡旋混匀仪。

六、检测方法

(一) 参考品与质控品制备 (样本处理区)

1. 农杆菌 DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

用试剂盒内的 DNA 稀释液将农杆菌 DNA 定量参考品(30ng/μL)进行梯度稀释, 稀释梯度依次为 300pg/μL、30pg/μL、3pg/μL、300fg/μL、30fg/μL、3fg/μL, 依次命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。操作如下:

- (1) 将试剂盒内的农杆菌 DNA 定量参考品置于冰上或 2~8°C 下融化, 待完全融化后充分混匀, 瞬时离心, 置于冰上备用。
- (2) 取 6 支干净的低吸附离心管, 分别标记为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。
- (3) 在 ST1 管中加入 990μL DNA 稀释液, 再加入 10 μL DNA 定量参考品, 振荡混匀后短时间快速离心 3-5 秒, 重复震荡离心 3 次以确保定量参考品与 DNA 稀释液充分混匀。
- (4) 在 ST2、ST3、ST4、ST5、ST6 管中分别加入 450μL DNA 稀释液, 及相应的标准品进行稀释操作, 具体见表 1

表 1 农杆菌 DNA 定量参考品稀释

稀释管	稀释体积	浓度
ST1	10 μL DNA 定量参考品+990μL DNA 稀释液	300pg/μL
ST2	50 μL ST1+450μL DNA 稀释液	30pg/μL
ST3	50 μL ST2+450μL DNA 稀释液	3pg/μL
ST4	50 μL ST3+450μL DNA 稀释液	300fg/μL
ST5	50 μL ST4+450μL DNA 稀释液	30fg/μL
ST6	50 μL ST5+450μL DNA 稀释液	3fg/μL

注: 配制的标准品溶液-20°C最多可存储 6 个月。

2. 加样回收质控 ERC 的制备

根据需要设置回收质控 ERC 中农杆菌 DNA 的加样浓度(以制备加 30pg 农杆菌 DNA 量的样本 ERC 为例), 具体操作如下:

- (1) 取 100μL 待测样品加入 1.5mL 低吸附离心管中。
- (2) 再加入 10μL ST3, 混匀, 标记为样本 ERC。

3. 阴性质控 NCS 的制备

取 100 μ L DNA 稀释液加入 1.5mL 低吸附离心管中，标记为阴性质控 NCS。

注：样本 ERC、阴性质控 NCS 和同批待测样本一起进行前处理，制备成样本 ERC 和阴性质控 NCS 纯化液。

(二) qPCR 反应体系配置 (试剂准备区)

1. 根据所要检测的定量参考品及待测样品的数量，计算所需反应孔数，一般每个样做 3 个重复孔。

反应孔数=(梯度定量参考品*5+阴性质控 NCS*1+无模板对照 NTC*1+待测样品 +回收质控 ERC) \times 3+2

注：推荐每个待测样品检测时都应同时做该样本 ERC，以测定该样本的回收率；移液器误差需要多计算 2 孔的损失量。

2. qPCR 体系配置：各试剂置于冰上融化，充分融化后混匀，按表 2 配置，加入到每个反应孔中。

表 2 qPCR 反应体系

组分	单孔体积
2 \times qPCR reaction buffer	15 μ L
农杆菌 primer&probe mix	3 μ L
IC mix /DNA 稀释液	2 μ L
样本 DNA (定量参考品/ERC /NCS /NTC /待测样品)	10 μ L

注：内对照 IC 主要监控样本中是否含有 PCR 反应抑制物，可根据需要加入。如未加 IC mix，可用稀释液或超纯水补足相应体积。

(三) 加样 (样本处理区)

1. 在分装好 PCR 反应液的 PCR 反应管中分别加入 10 μ L 处理好的样本 DNA、ERC、NCS、NTC、梯度定量参考品，表 3 为样品反应板示例。

2. 贴好封板膜，稍做离心。

3. 转移到检测区，放入相应的荧光 PCR 检测仪内，记录样本摆放顺序。

表 3 样品反应版设置示例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ST1	ST1	ST1									
B	ST2	ST2	ST2			S1	S1	S1	S1(ERC)	S1(ERC)	S1(ERC)	
C	ST3	ST3	ST3			S2	S2	S2	S2(ERC)	S2(ERC)	S2(ERC)	
D	ST4	ST4	ST4			S3	S3	S3	S3(ERC)	S3(ERC)	S3(ERC)	
E	ST5	ST5	ST5									

F											
G						NCS	NCS	NCS	NTC	NTC	NTC
H											

注：该示例中 ST1~ST5 表示检测的 5 个浓度的农杆菌 DNA 标准曲线，NCS 为 1 个阴性质控，NTC 为 1 个无模板对照，S1~S3 为待测样本和每个样本的 ERC。每个检测做 3 个重复孔。

（四）PCR 扩增（检测区）

1.qPCR 程序设置

以 ABI7500 为例：

- 新建实验，选择“Absolute Quantification”。
- 输入实验名称，选择标曲定量模式，TaqMan reagents 和 Standard 模式。
- 选择农杆菌报告荧光基团为 CY5，淬灭基团为 None。
- 选择 IC（可选）报告荧光基团为 VIC，淬灭基团为 None。
- 参比荧光为 ROX（可选）。
- 荧光 PCR 仪上，按表 4 设置如下程序，反应体积选择 30 μ L，开始运行。

表 4 qPCR 反应程序

阶段	温度	时间	循环数
预变性	95 $^{\circ}$ C	10min	1
循环	95 $^{\circ}$ C	15s	40
	60 $^{\circ}$ C	1min	

注：①各实验室可根据所用机型进行设置反应程序。
②IC 主要监测试剂的有效性及其抑制剂等影响因素，可根据实验室情况选择是否设置。
③靶标农杆菌在高浓度下，由于 PCR 扩增的竞争效应，内标 IC 的 CT 值会增大，偏离正常值。

（五）结果分析

以 ABI7500，软件版本 2.4 为例：

- 分析设定：设置阈值(Threshold=0.2)，基线(baseline)为 3~15 循环或仪器默认基线，查看扩增曲线是否正常。
- 在 Plate 面板将标准曲线孔设置为“S”，并在 Quantity 分别设置稀释梯度为：3000000、300000、30000、3000、300、30，单位为 fg。根据标准曲线计算待测样本浓度单位为 fg/10 μ L，可在检测报告中换算为 pg/ μ L，或 fg/ μ L。
- 查看标准曲线 R² 与扩增效率是否符合标准。



4. 对于无模板对照 NTC 和阴性质控 NCS 的检测，其 CY5 通道结果应该是未检出（Undermined）或者大于最小标准曲线（如 ST6）的 CT 值。
5. 若 $Ct(ST6) + 3 > Ct(NTC)$ ，表明体系存在污染，需数据过滤或者重新实验。

注：结果分析的参数设置仅供参考，具体需依据实验室机型及使用的软件版本进行设定。



七、注意事项

1. 本试剂盒仅供科研使用，不用于临床诊断，使用前请仔细阅读说明书并必须严格按照说明书进行操作；
2. 应由具备专业经验或经培训合格的人员进行操作；
3. 实验室应按试剂准备区、样本处理区、反应液配置区、扩增检测分析区分隔使用。工作流程：操作过程应工作服、帽、鞋、手套等穿戴齐全，各区物品均为专用，不得交叉使用，避免污染；
4. 反应液分装时应尽量避免产生气泡，并注意防止泄露，以免荧光物质污染仪器；
5. 实验过程中若出现标本及试剂污染工作台及移液器，应及时用 10%次氯酸钠或 75%酒精处理。实验结束后应立即清洁工作台，并定期对工作台及各种实验用品进行消毒；
6. 不要使用超过有效期的试剂，不同批次的产品不能混用；
7. 加样所用的加样器需要定期检测，保证加样的准确性；
8. 为了避免样本中任何潜在的生物危险，检测样本应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤和黏膜；样本的处理建议在可防止气雾外流的生物安全柜中操作，样本制备区用过的试管、吸头需打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃；样本操作和处理均需符合相关法规要求；卫生部《微生物生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。

八、免责声明

试剂盒仅供研究使用，不得用于临床实验或人体实验，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。严格按照说明书操作，实验者违反说明书操作，后果由实验者承担。