

SHENTEK 常见问题集

HCD 试剂盒操作细节相关解答

1. 质控样品是否每次实验都必须做？

无模板对照 NTC 反应检测过程是否异常，阴性质控样品（NCS）实验全过程的污染情况，需要每次实验随行。

2. 标准曲线是否不必每次都做，可以用之前的数据吗？

由于定量 PCR 方法非常灵敏，每次实验标曲不可能完全一样，如果不随行标曲，可能导致结果存在偏差，按照 qPCR 实验要求和相关药典要求，每次实验必须随行标曲。

3. 样品的残留量在标曲的定量下限之外，怎么处理？

企业内部可以根据特定样品确定质量标准，如果样品中 rHCD 量低于质量标准，则以小于质量标准表示。

4. 回收率结果不稳定或样品回收异常该如何改进？

样品回收过程由于步骤较多，容易影响回收率，所以对实验人员技能要求较高，具体可以参考《宿主细胞 DNA 残留检测注意细节》（可从 www.shenkebio.com 下载），也可以使用湖州申科的 rDNApurify HCD 前处理系统，保证结果的稳定。样品回收异常，排除操作问题及加标量不合理的问题，可能样品中存在抑制 PCR 反应的物质或样品蛋白浓度高，可以尝试对样本进行稀释或增加蛋白酶 K 等方法解决。

5. 样品加标量设置在多少比较合理？

一般建议样品加标量设置在样品中 DNA 实际残留量的 2-10 倍，如果样品中 DNA 残留量低于定量限，加标量应设置到定量限之内，以保证检测结果可靠。

6. 阴性质控有污染，如何进行环境控制？

- a、实验时穿实验服并戴口罩，勤换手套；
- b、使用带滤芯移液枪头和无菌低吸附 ep 管，每次实验尽量更换新的枪头和 ep 管；
- c、分区操作：标曲配置区、样品前处理区、反应液配置区、模板加样区和 PCR 反应区，PCR 反应区需设置在单独房间内，尽量远离生产车间或 DNA 提取实验室。每个区分别配备移液枪，勿交叉使用，其中模板加样区需配备 2 把移液枪，一把用于阴性质控和无模板对照孔加样，一把用于检测样本模板加样；实验前整理操作环境，有条件的进行消毒；
- d、空调开启时，可在实验开始前先开启空调预冷实验室，待进行实验时，将空调风速调至最低；
- e、实验过程中先准备阴性对照管、样品管并盖紧管盖，最后准备阳性对照管；
- f、勿将扩增产物带至 PCR 反应液配制区；
- g、实验结束后清理桌面，可以用 DNA 清除剂清理环境。

7. 标曲扩增效率异常

- 1) 注意各试剂成份的储存温度，收到货后及时按要求进行储存；
- 2) 分析参数设置不合适，说明书中参数设置适用于 ABI 7500 qPCR 仪；若检测机型不同，应相应调整 threshold 至合适的位置；
- 3) 参考品稀释不准确，注意用枪规范和所用 EP 是否为低吸附。

8. 样品调 pH 值后出现絮状沉淀，且蛋白酶 K 消化完成后仍有沉淀，对检测结果是否有影响？

消化完成后仍有沉淀会影响后续的纯化过程，进而影响实验结果，建议将待检样品进行适当比例稀释或适当增加蛋白酶 K 后再进行纯化回收。

9. 样本有抑制的话，除了稀释还有什么办法？

增加蛋白酶 K 用量。

10. 加入结合液后，为什么有白色沉淀，有影响吗？

白色沉淀为正常现象，不影响结果。

11. 最后洗脱不干净，DNA 液里有微量磁珠，对 PCR 结果什么影响，偏高还是偏低？

DNA 纯化液中残留磁珠会抑制 PCR 反应，建议磁珠再分离一次，取出干净的 DNA 纯化液。

12. 样本有抑制，回收率低，稀释后，检测结果就低于检测限了，怎么办？

分析抑制的原因，如果是蛋白含量过高，则在保证加标量合理的情况下可尝试增加蛋白酶 K 用量。

13. 你们 human 的试剂盒是不是每次都能跑出 NTC？标准是多少？

因为 HumanDNA 样本的特殊性，所以在 HumanDNA 检测时需要特别注意。但是只要实验操作可控条件下，基本可以保证 NTC 的 ct 值大于标曲最后一个浓度，即 ST5 至少 2 以上，这也符合药典（如 USP）的要求。

14. 耐用性应该从哪些方面入手呢？

DNA 碎片化实验、不同型号仪器等。

15. 怎么判定阴性合格？

一般，阴性对照 NCS Ct 值我们要求大于标曲最低浓度 Ct 值+2，也可按照 USP 标准大于标曲最低浓度 Ct 值。

16. 标准曲线的配置时要注意哪些细节？

试剂盒中的参考品 DNA 每次使用前轻弹混匀，离心甩至管底（2~3 秒）。标曲配制过程中，ST0~ST5/ST6 管混匀离心时间不用太长，震荡 2~3 秒，离心甩下去即可（2~3 秒），整个过程重复 1~2 遍。

17. 如何保证阴性质控的控制（NCS）合格？

在前处理过程中，为了避免局部区域内气溶胶对阴性样本的影响，应先进行 NCS 的操作，再进行样本操作。（由于 qPCR 方法的灵敏度达到 fg 级别，远远高于杂交法，染料法，所以必须按照此方法操作）。

18. 请问阳性加标和样本加标有何区别？

阳性加标是在试剂盒提供的稀释液中标，样本加标是对待检样本进行加标，两者基质不同，加标量也可能有差别。

19. 实验结果中，3 复孔如果有一孔数据不正常是否可剔除？

可以，但最好在 SOP 中进行相关设定。

20. DNA 提取针对真核酵母和 E.coli 等提取方法是否有差异？是否对不同样本有不同方案？

样本中残留 DNA 提取，两者有一处不同，针对真核酵母，回收过程中不必加入酵母 tRNA，其他都一样。