

末端反向重复序列 ITR2/5 核酸定量检测试剂盒（数字 PCR 法）说明书

仅供科研使用

【产品名称】

末端反向重复序列 ITR2/5 核酸定量检测试剂盒（数字 PCR 法）

【产品货号】

YN-ITR-DNA-24/96

【包装规格】

24测试/盒、96测试/盒

【预期用途】

腺相关病毒 (AAV) 是目前基因治疗领域的「明星」载体，然而由于其自身结构的特点，使得对 AAV 载体的研究具有一定的挑战。AAV 基因组的两端包含两个 145bp 的反向末端重复序列 (ITR)，这会形成一种高度稳定的 T 型发夹结构，它在病毒的复制和包装过程中起到了关键的作用。然而这种特殊结构对于 AAV 质粒生产和 QC 过程产生了不小的挑战。

AAV 质粒的 ITR 区域表现出高度的不稳定性，在质粒扩增过程中容易缺失；ITR 缺陷或缺失会导致病毒包装效率降低；鉴于 ITR 突变的频率，在病毒包装之前，检测评估质粒中 ITR 区域的完整性就变得至关重要。

末端反向重复序列 ITR2/5 核酸定量检测试剂盒（数字 PCR 法）是永诺医疗开发的可以精准定量检测 ITR2/5 基因含量水平。尽早、经常 QC 确保 ITR 区域的完成度。本试剂盒仅供科研使用。

【检验原理】

本试剂盒选取 ITR2/5 基因中保守区基因片段设计特异性引物和探针，采用微滴式数字 PCR 法定量检测 ITR2/5。数字 PCR 法采用单分子检测技术，将一个 PCR 反应体系分成数万个微滴，每个微滴即一个独立的反应单元，PCR 扩增后对每个反应单元的荧光信号逐一检测，有荧光信号的单元判断为阳性单元，无荧光信号的单元判断为阴性单元，通过计数得出 ITR2/5 核酸的浓度。

【主要组成成分】

组成	24T/盒	96T/盒
微滴式数字 PCR 用反应预混液 (4X)	120 μ L /管 \times 1 管	480 μ L /管 \times 1 管
ITR2/5 检测混合液	15.6 μ L /管 \times 1 管	62.4 μ L /管 \times 1 管
核酸内切酶	9.6 μ L \times 1 管	38.4 μ L \times 1 管
ITR2/5 阳性对照	100 μ L /管 \times 1 管	100 μ L /管 \times 1 管
ITR2/5 阴性对照	100 μ L /管 \times 1 管	100 μ L /管 \times 1 管

注：1.不同批号试剂盒的各组分不可以互换使用。

2.需自备的试剂：样本稀释液；1 \times TE 溶液；无核酸酶水。

【储存条件及有效期】

-20 \pm 5 $^{\circ}$ C 避光储存，有效期 12 个月；开封后 -20 \pm 5 $^{\circ}$ C 保存，稳定性 2 个月。避免反复冻融，冻融次数不超过 3 次。

试剂盒在运输过程中，需要泡沫箱加冰袋密封运输，运输时间不超过 5 天。

生产日期、有效期至：见标签。

【适用仪器】

适用于广东永诺医疗科技有限公司生产的微滴式数字 PCR 系统配套使用。

【样本要求】

1. 适用样本类型：含有 ITR2/5 的溶液

3. 样本保存和运送

待测样本在室温中保存不应超过 6 小时，在 2~8℃ 保存不应超过 3 天，-20℃ 保存不应超过 6 个月，反复冻融不超过 3 次。提取后的核酸在 -20℃ 可保存 3 个月。样本检测前需要恢复至室温。

采用冰壶加冰或者泡沫箱加冰袋密封进行运输。样本应视作潜在传染源，在使用、保存及运输过程中避免外漏。

【检验方法】

1. 样本处理（样本处理区）

1) 直接稀释法

采用样本稀释液将含有 ITR2/5 基因的样本稀释到数字 PCR 检测范围内。

2) 热处理法

采用 1×TE 溶液将含有 ITR2/5 基因的样本稀释到数字 PCR 检测范围内，然后进行热变性处理（在 95℃ 下 10 分钟，然后冷却到 4℃）。

2. 反应体系配制（试剂准备区）

1) 将所有组分解冻并恢复至室温，振荡混合均匀，短暂离心后备用。

2) 确定反应数 N, $N = \text{待检样本数}(n) + \text{对照品}(2) + 1$ 。计算加到反应混合物中的各个试剂的量，计算如下：

组分	体积 (N)
微滴式数字 PCR 用反应预混液 (4X)	$5 \times N \mu\text{L}$
ITR2/5 检测混合液	$0.65 \times N \mu\text{L}$
核酸内切酶	$0.4 \times N \mu\text{L}$
无核酸酶水	$3.95 \times N \mu\text{L}$

3) 1.5mL 无核酸酶的离心管配制反应体系，试剂全部加入后震荡混匀，离心数秒。

4) 然后将上述混合液 10 μL /管分装至 0.2mL PCR 反应管中。

3. 加样（样本制备区）

取 ITR2/5 阴性对照、ITR2/5 阳性对照、临床样本核酸各 10 μL 分别加入至 0.2mL PCR 反应管中，盖紧管盖，震荡混合均匀，短暂离心将管壁上的液体全部甩至管底（避免产生气泡），室温下静置 5 分钟后备用。

4. 制备微滴（样本处理区）

取上述反应管中的 20 μL 混合液，进行微滴的生成，具体操作步骤请按照设备说明书指引进行。

5. PCR扩增（扩增检测区）

将已封膜的PCR反应板进行PCR反应扩增。打开PCR仪，程序设置如下：

步骤	温度	时间	扩增循环数	升降温速率
Step one	95°C	5min	1	1°C/sec
Step two	95°C	30sec	45	1°C/sec
	58°C	30sec		1°C/sec
Step three	98°C	10min	1	1°C/sec
Step four	Hold at 16°C			

*设置热盖温度105°C，样本体积50μL。

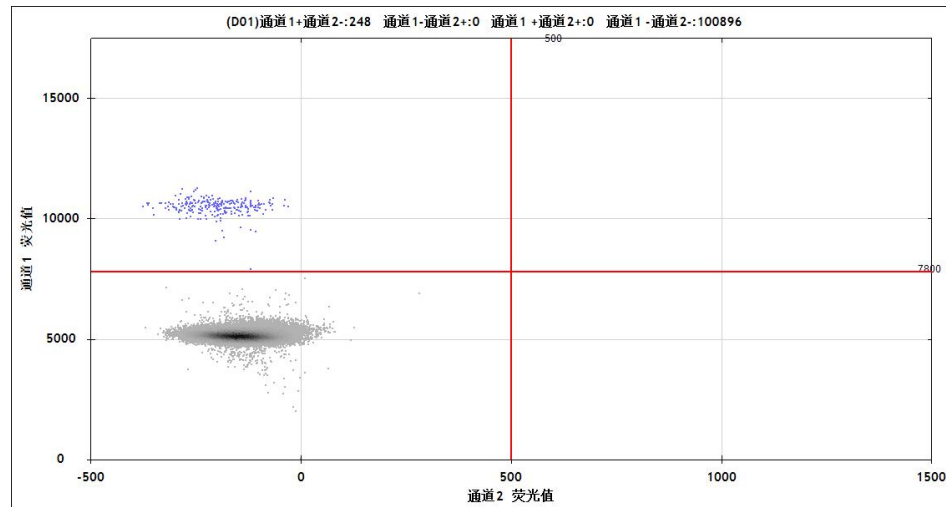
【微滴检测和结果分析】

1. PCR 扩增完成后，利用 QuantDrop 软件，实验详细步骤按照分析仪说明书指引进行。

2. 设置。单击“设置”，在“样本定义”模块为每个样本包括阴性质控品和阳性质控品分配一个名称和样品类型，“类型”选择“未知样本”。通道 1 为 FAM 通道，检测 ITR2/5 DNA；通道 2 为 VIC 通道，不使用。设置完成后单击“确定”。

3. 运行。单击“运行”，仪器自动运行并显示进度，运行完成后，形成数据文件。

4. 分析。单击“分析”，打开并分析数据，显示选定孔（样本）的实验数据，获得每个样本靶标的浓度结果。并可查看微滴荧光图，示意图如下：



二维图显示

5. 击“浓度”可显示各孔加入的核酸拷贝数，显示单位：copies/20μL。

6. 质量控制

6.1 阴性对照：通道1的检测结果显示通道1阳性微滴数 < 10个；

6.2 阳性对照：通道1的检测结果显示拷贝数 > 1×10²copies/20μL；

以上要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，实验应重新进行。

【检验结果的解释】

1. 每次实验均需将试剂盒内的阴性对照、阳性对照与待检样本一同检测，检测结果应符合上述“质量控制”的要求，否则本次实验无效。

2. 阴性结果判定标准：通道 1 的 ITR2/5 阳性微滴数 < 10 个。

3. 阳性结果判定标准：通道 1 的 ITR2/5 阳性微滴数 ≥ 10 个。

4. 若样本判定为 ITR2/5 阳性，点击“浓度”可显示该样本的 ITR2/5 核酸浓度，

单位 copies/20 μ L;

5. ITR2/5 浓度(copies/ μ L)=copies/20 μ L \div 10 μ L(上样体积)。

【检验方法的局限性】

样本检测结果与样本收集、处理、运送及保存质量有关，其中任何失误都将会导致假阴性结果。样本处理时没有控制好交叉污染，可能出现假阳性结果。本检测结果仅供临床参考，如需确诊病例请结合临床症状及其他检测手段。

【产品性能指标】

1. 最低检出限和定量限：本试剂盒的检出限和定量限均为 1.5copies/ μ L。
2. 线性范围：本试剂盒的线性范围为 $1.5\sim 1.0\times 10^5$ copies/ μ L，线性相关系数 $|r| \geq 0.98$ 。
3. 精密度：将 ITR2/5 稀释至低浓度（10copies/ μ L）进行精密度检测，浓度对数值的变异系数（CV） $\leq 10\%$ 。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于科研使用，使用前请仔细阅读本说明书。
2. 本试剂盒结果会受到样品本身的来源、样本质量、样本运输条件、样本预处理等因素影响，同时也受到核酸提取质量、操作环境以及当前分子生物学技术的局限性等限制，可能导致得出假阳性或假阴性的检测结果。使用者须了解检测过程中可能存在的潜在错误、准确性的局限性。
3. 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。
4. 本产品性能仅针对【样本要求】项下说明的样本采集和处理方法进行了验证，其他样本类型或样本采集、处理方法不能保证产品性能。
5. 临床实验室应严格按照《临床基因扩增实验室工作规范》配备设备及操作

人员，应严格按照说明书要求进行操作。

【基本信息】

生产企业名称：广东永诺医疗科技有限公司

住所：佛山市禅城区塍宝西路82号第八层

联系方式：0757-82258675

邮箱：microdrop@forevergen.cn

售后服务单位名称：广东永诺医疗科技有限公司

联系方式：0757-82258675

生产地址：佛山市禅城区塍宝西路82号第八层及第五层10室。

【说明书核准及修改日期】

2022年9月30日。