

**毕赤酵母残留 DNA 定量检测试剂盒（qPCR-荧光探针
法）说明书**

Cat.No. HG-PD001/HG-PD001-S

江苏省苏州市吴中经济开发区越溪街道吴中大道 1463 号越旺智慧谷 A4 号楼
Building 4 , Yuewang Wisdom Valley , 1463 Wuzhong Avenue, Wuzhong District,
Suzhou, China

目录

1. 产品简介.....	3
2. 应用.....	3
3. 试剂盒规格.....	3
4. 试剂盒组分.....	4
5. 储存条件及有效期.....	4
6. 适用机型（包括但不限于）.....	4
7. 定义或术语.....	5
8. 需要准备的试剂、耗材与设备.....	5
9. 注意事项.....	5
10. 实验步骤.....	6
11. qPCR 结果分析（以 BIO-RAD 公司 CFX96 qPCR 仪为例）.....	11
12. 示例图.....	12
13. 参考文献.....	13
14. 联系方式.....	13
15. 买方须知.....	13

江苏省苏州市吴中经济开发区越溪街道吴中大道 1463 号越旺智慧谷 A4 号楼
Building 4 , Yuewang Wisdom Valley , 1463 Wuzhong Avenue, Wuzhong District,
Suzhou, China

1. 产品简介

毕赤酵母残留 DNA 定量检测试剂盒（qPCR-荧光探针法）用于定量检测生物制品及药物中间品、半成品和成品中残留的毕赤酵母宿主细胞残留 DNA。

毕赤酵母残留 DNA 定量检测试剂盒（qPCR-荧光探针法）采用 Taqman 探针法，定量检测样本中毕赤酵母残留 DNA，具有速度快、特异性高、性能可靠的特点。最低检测限可达到 fg 级别。

配套我司宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒（HG-CL500）进行样本的前处理。

检测范围：3 fg/μL ~3×10⁵ fg/μL。

2. 应用

用于生物制品及药物中间品、半成品和成品中的毕赤酵母残留 DNA 定量检测使用。

3. 试剂盒规格

产品名称	产品货号	产品规格
毕赤酵母残留 DNA 定量检测试剂盒（qPCR-荧光探针法）	HG-PD001	100 Reactions/ 盒
	HG-PD001-S	50 Reactions /盒

江苏省苏州市吴中经济开发区越溪街道吴中大道 1463 号越旺智慧谷 A4 号楼
Building 4 , Yuewang Wisdom Valley , 1463 Wuzhong Avenue, Wuzhong District,
Suzhou, China

4. 试剂盒组分

试剂组分	HG-PD001	HG-PD001-S	贮存条件
Pichia DNA Quantitative Reference (30 ng/ μ L)	40 μ L \times 1 管	20 μ L \times 1 管	-20 $^{\circ}$ C
DNA Diluent	1.5 mL \times 3 管	1.5 mL \times 2 管	-20 $^{\circ}$ C
2 \times qPCR Master Mix (+UNG/ROX)	0.75 mL \times 2 管	0.75 mL \times 1 管	-20 $^{\circ}$ C
10 \times Pichia Primer&Probe Mix	0.3 mL \times 1 管	0.15 mL \times 1 管	-20 $^{\circ}$ C
RNase-Free H ₂ O	1.5mL \times 1 管	1.5mL \times 1 管	-20 $^{\circ}$ C

5. 储存条件及有效期

存储条件见上表，有效期 18 个月。开封后未使用完的试剂盒注意仍在-20 $^{\circ}$ C条件下保存。

6. 适用机型（包括但不限于）

- ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems)
- StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- Roche Light Cycler 480 (Roche)
- AriaMX (Agilent Technologies)
- CFX96(Bio-Rad)
- Archimed X4 (ROCGENE)

江苏省苏州市吴中经济开发区越溪街道吴中大道 1463 号越旺智慧谷 A4 号楼
Building 4 , Yuewang Wisdom Valley , 1463 Wuzhong Avenue, Wuzhong District,
Suzhou, China

7. 定义或术语

- 无模板空白对照(No Template Control, NTC): NTC 是指不含有模板（阳性模板或者阴性模板）的对照。目前的试剂盒的 NTC 一般都是无酶水或稀释液。
- 阴性质控 (Negative Control Sample, NCS) : 阴性质控是指在相同的处理条件下，比如一份已知的未感染样品，都进行了提取和扩增最终获得了阴性结果。阴性质控强调处理过程与样品一致，并且有明确的预期结果。

8. 需要准备的试剂、耗材与设备

- 1.5 mL 或 2 mL 无菌低吸附离心管
- 荧光定量 PCR 仪器（包括 FAM 和 VIC 荧光通道）
- 八联排管加盖或 96 孔半裙边板加封口膜
- 1000 μL ，200 μL ，10 μL 等无菌低吸附带滤芯枪头
- 各规格移液器（如 1000 μL ，200 μL ，10 μL 等）
- 离心机
- 涡旋震荡仪

9. 注意事项

- 本试剂盒已通过稳定性（冻融等因素）的验证，无需分装。
- 阴性样品和阳性样品(参考品和待测样品等)的配制环境需区分区域，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。
- 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。
- 试剂盒必须在有效期内使用。

- 试剂盒内所有组分建议在低温环境融化后使用。
- 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。
- 尽量在当天完成样本前处理纯化后立即进行后续 qPCR 检测,以保证检测结果的准确性。
- 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。
- 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。
- 本试剂盒仅供体外研究使用,不用于临床诊断。

10. 实验步骤

10.1. 检测流程图



10.2. 毕赤酵母 DNA 定量参考品稀释及标准曲线制备

10.2.1. 将试剂盒中的 Pichia DNA Quantitative Reference (毕赤酵母 DNA 定量参考品)

和 DNA Diluent (DNA 稀释液) 取出,室温融化,待完全融化后,轻微震荡混匀,简短快速离心。

10.2.2. 取 7 至 1.5 mL 干净的离心管,分别标记为 SD0, SD1, SD2, SD3, SD4, SD5, SD6。

10.2.3. SD0 管中加入 45 μ L DNA Diluent, 加入其余管中加入 180 μ L DNA Diluent。

10.2.4. 取 5 μ L Pichia DNA Quantitative Reference 加入 SD 管中,涡旋震荡 5-10s 后,

江苏省苏州市吴中经济开发区越溪街道吴中大道 1463 号越旺智慧谷 A4 号楼
Building 4 , Yuewang Wisdom Valley , 1463 Wuzhong Avenue, Wuzhong District,
Suzhou, China

短时快速离心 5s。重复涡旋震荡和快速离心各 3 次。按照表 2 稀释加样量，依次梯度稀释 SD2, SD3, SD4, SD5, SD6, 并进行涡旋震荡和快速离心，确保稀释均匀。

表 2：毕赤酵母 DNA 定量参考品稀释

稀释管	稀释体积	浓度
SD0	5 μ L Pichia DNA Quantitative Reference+45 μ L DNA Diluent	3000 pg/ μ L
SD1	20 μ L SD0+180 μ L DNA Diluent	300 pg/ μ L
SD2	20 μ L SD1+180 μ L DNA Diluent	30 pg/ μ L
SD3	20 μ L SD2+180 μ L DNA Diluent	3 pg/ μ L
SD4	20 μ L SD3+180 μ L DNA Diluent	300 fg/ μ L
SD5	20 μ L SD4+180 μ L DNA Diluent	30 fg/ μ L
SD6	20 μ L SD5+180 μ L DNA Diluent	3 fg/ μ L

10.3. 样本准备

10.3.1. 待检测样本：取 100 μ L 生物制品或者其他中间过程样本作为检测样本，使用我司宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒（HG-CL500）进行样本的前处理。

10.3.2. 阴性质控：取 100 μ L 1xPBS（或者其他缓冲液，与样本基质保持一致）作为阴性质控 NCS，与样本一起参与提取和扩增。

10.3.3. 加标样本：取 50 μ L 生物制品或者其他中间过程样本，加入 50 μ L SD2（示例）作为加标样本 ERC，使用我司宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒（HG-CL500）进行样本的前处理，其回收率计算公式为： $(ERC*100-样品*50) / (SD2*50) \times 100\%$

(备注：也可以根据实际情况，按照其他方式制备加标回收体系。加标体系中，建议标准品的总量应为样本总量的 1~10 倍最佳)。

10.3.4. 无模板对照：取 100 μL DNA Diluent 作为无模板对照 NTC。

10.4. PCR 反应液制备和加样

10.4.1. 将试剂盒各组分取出，置于室温条件下融化，待完全融化后，上下颠倒混匀 2-3 次，快速离心 5 秒。

10.4.2. 根据检测样本数量及标准曲线，计算所需反应孔数，一般建议每个样品设置 3 复孔。反应孔数=(6 个浓度梯度的定量参考品+1 个无模板对照 NTC+1 个阴性质控 NCS+待测样本+加标样本) \times 3。

10.4.3. 根据反应孔数计算本次实验所需组分的总量制备 pre-mix:

$2 \times \text{qPCR Master Mix} = (\text{反应孔数} + 2) \times 15 \mu\text{L}$ (包含 2 孔的冗余量)；

$10 \times \text{Pichia Primer\&Probe Mix} = (\text{反应孔数} + 2) \times 3 \mu\text{L}$ (包含 2 孔的冗余量)；

$\text{RNase-Free H}_2\text{O} = (\text{反应孔数} + 2) \times 2 \mu\text{L}$ (包含 2 孔的冗余量)。

表 3: 配置 pre-mix

组分	单个反应量 (μL)
$2 \times \text{qPCR Master Mix (+UNG/ROX)}$	15
$10 \times \text{Pichia Primer\&Probe Mix}$	3
RNase-Free H_2O	2
总共	20

10.4.4. 在八联管或者 96 孔板中各分装 20 μ L pre-mix，然后按照下表，分别加入定量参
考品、NTC、NCS、待测样本和 ERC 待测样本（总体积 30 μ L）。

表 4：反应孔加样示例

定量参考品	20 μ L pre-mix+10 μ L SD1/ SD2/ SD3/ SD4/ SD5/ SD6
NTC	20 μ L pre-mix+10 μ L DNA Diluent
NCS	20 μ L pre-mix+10 μ L NCS
待测样本	20 μ L pre-mix+10 μ L 待测样本
ERC 待测样本	20 μ L pre-mix+10 μ L ERC 待测样本

10.4.5. 96 孔板排版示例

表 5:96 孔板排版示例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SD1	SD1	SD1		S1	S1	S1	S1 ERC	S1 ERC	S1 ERC		
B	SD2	SD2	SD2		S2	S2	S2	S2 ERC	S2 ERC	S2 ERC		
C	SD3	SD3	SD3		S3	S3	S3	S3 ERC	S3 ERC	S3 ERC		
D	SD4	SD4	SD4									
E	SD5	SD5	SD5									
F	SD6	SD6	SD6								NTC	NCS
G											NTC	NCS
H											NTC	NCS

江苏省苏州市吴中经济开发区越溪街道吴中大道 1463 号越旺智慧谷 A4 号楼

Building 4 , Yuewang Wisdom Valley , 1463 Wuzhong Avenue, Wuzhong District,
Suzhou, China

注:该表示例设置 6 个浓度梯度定量参考品标准曲线(SD1~SD6)、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、3 个待测样本 (S1-S3)及每个样本的 ERC。每个反应设置 3 复孔。

10.5. 设置 qPCR 程序参数

以 BIO-RAD 公司 CFX96 qPCR 仪为例。

10.5.1. 创建实验反应程序，设置反应程序如下表：

表 6: qPCR 反应程序

温度	时间	循环	信号采集	反应体积
50°C	2 分钟	1	/	30 μL
95°C	10 分钟	1	/	
95°C	10 秒	40	/	
60°C	60 秒		采集荧光信号	

10.5.2. 选择荧光通道：创建实验反应板，点击 Select Fluorophores，创建新检测探针，

命名为 Pichia，选择报告荧光基团为 FAM，淬灭基团为 none(备注：如仪器要求设置猝灭基团与参比荧光：猝灭基团为 None，参比荧光为 ROX)。

10.5.3. 标准曲线设定：在在反应板图表中，选择标曲孔，在 SampleType 中下拉选择

Standard，勾选荧光 FAM，Target Name 命名为 Pichia，输入每个稀释梯度的重复次数及 Sample Name。并且分别在 SD1,SD2,SD3,SD4,SD5,SD6 的 Concentration 一栏赋值为 3E+05、3E+04、3E+03、3E+02、3E+01、3E+00(单位为 fg/uL)。

10.5.4. 样本设定：在在反应板图表中，选择样本孔，分别在 SampleType 中下拉，选择对

应的“Unknown”“NTC”等样本类型，勾选荧光 FAM，Target Name 命名为 Pichia，

输入每个样本的 Sample Name。

10.5.5. 点击 Run 界面 “Start Run” 按钮进行 PCR 测定。

11. qPCR 结果分析（以 BIO-RAD 公司 CFX96 qPCR 仪为例）

11.1. 点击 “DataAnalysis” 窗口，打开 “Quantitation” 选项卡，可读取标准曲线的斜率（Slope）、截距（Intercept）、扩增效率（Efficiency）、 R^2 值等信息，SQ Mean 一栏可读取 NTC、NCS、待测样本的检测值，单位为 fg/ uL。

11.2. 点击菜单栏 “Export” > “Custom Export”，弹出 “Custom Export” 对话框，在 “Export Format” 下拉框选择输出文件格式，勾选需要输出的数据，点击最下方 “Export” 输出数据。

11.3. 点击菜单栏 “Tools” > “Reports”，出现 “Reports” 窗口。在选项列表勾选标题、运行设置、定量数据，勾选 “Notes” 后可以输入备注信息。在选项窗格输入标题，调整字体格式，或者调用之前保存的模板，点击 “Update Report” 更新预览，确认无误后，点击 “File>Save”，将结果保存为 PDF 格式。

11.4. 数据可靠性评估

三个平行孔间 Ct 值差变异系数 $CV \leq 5\%$ ，Ct 值大于 35 的孔除外。

无模板对照 NTC 和阴性对照 NCS 的 CT 值都应大于标曲最低浓度的 CT 值，或根据实验室自身验证结果设定标准。

标准曲线线性相关系数 $R^2 \geq 0.98$ ，扩增效率（Efficiency）在 85%~110% 之间。

12. 示例图

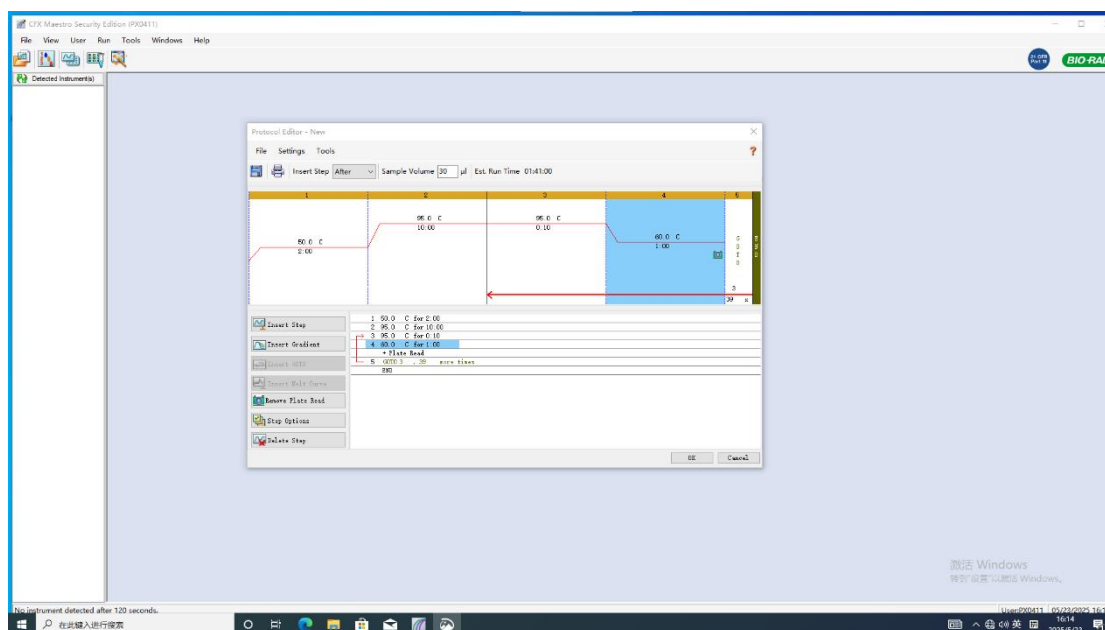


图 1: PCR 扩增程序示例图

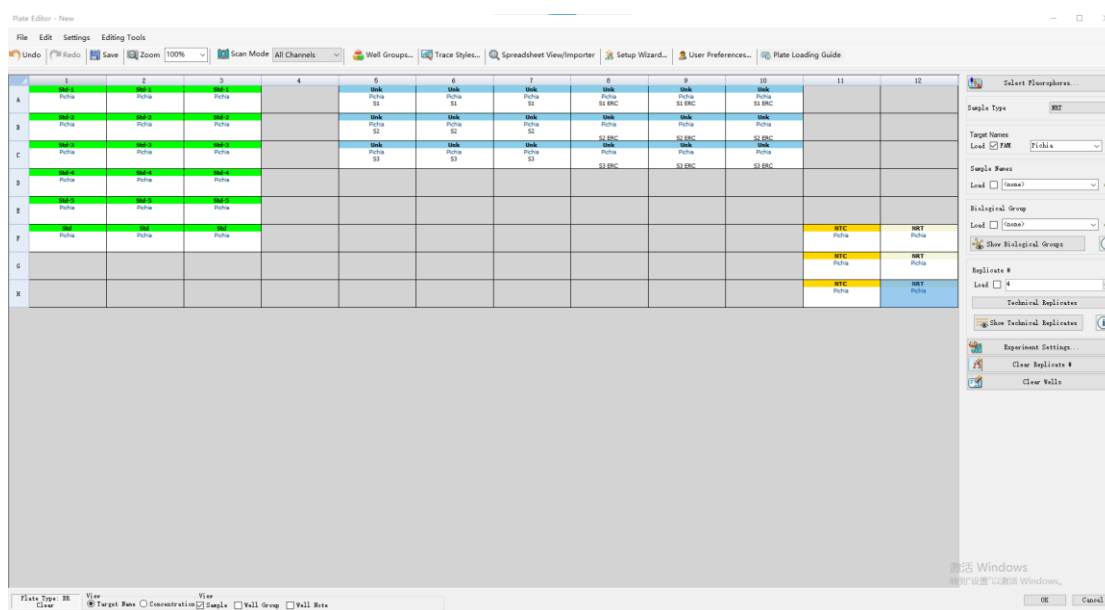


图 2: PCR 扩增板间布局示例图

江苏省苏州市吴中经济开发区越溪街道吴中大道 1463 号越旺智慧谷 A4 号楼
 Building 4 , Yuewang Wisdom Valley , 1463 Wuzhong Avenue, Wuzhong District,
 Suzhou, China

13. 参考文献

- 《中华人民共和国药典（2020 版）》
- ICH（国际人用药品注册技术协调会）指南-Q6B

14. 联系方式

- 地址：江苏省苏州市吴中经济技术开发区越溪街道吴中大道 1463 号
- 邮编 Postal code: 215104
- 联系电话 Tel: 400-900-1882
- 邮箱 E-Mail: info@hillgene.com
- 售后邮箱: technical@hillgene.com
- 网址 Website: <https://www.hillgene.com>

15. 买方须知

我们的产品仅供研究使用。它们不得用于任何其他目的，包括但不限于用于人体、治疗或诊断或任何商业用途。未经我们同意，不得将我们的产品转让给第三方、转售、为转售而修改或用于制造商业产品或向第三方提供服务。

您在使用本产品时还必须遵守 <https://www.hillgene.com> 上产品网页中描述的任何适用许可要求。您有责任查看、理解并遵守此类声明中规定的任何限制。

更多产品、知识产权和限制使用信息，请访问 <https://www.hillgene.com>。

附件 1：安全注意事项

- 一般说明

用户未按本说明书说明方式使用本产品可能会导致人身伤害或仪器或设备损坏。确保使用本

江苏省苏州市吴中经济开发区越溪街道吴中大道 1463 号越旺智慧谷 A4 号楼
Building 4 , Yuewang Wisdom Valley , 1463 Wuzhong Avenue, Wuzhong District,
Suzhou, China

产品的人员已接受实验室一般安全操作说明和本文档中提供的安全信息。

(1) 在使用仪器或设备之前，请阅读并理解仪器或设备制造商提供的用户文档中的安全信息。

(2) 在处理化学品之前，请阅读并理解所有适用的安全数据表（SDS），并使用适当的个人防护设备（手套、防护服、护目镜等）。

- 生物危险

(1) 生物样品，如人和其他动物的组织、体液、传染性病原体和血液，有传播传染病的可能。在配备适当安全设备（如生物安全柜）的设施中进行所有工作。安全设备还包括个人防护用品，如手套、外套、工作服、鞋套、靴子、呼吸器、面罩、安全眼镜或护目镜。

(2) 在使用可能具有生物危害性的材料之前，个人应根据当地的法规和公司/机构要求接受培训。

- 危险废物（来自仪器）

仪器产生的废物具有潜在危险性。请遵守前述“生物危险”警告中的指导原则。

附件 2：相关产品（更多产品可咨询谱新生物 <https://www.hillgene.com>）

类别	产品名称	产品货号
大肠杆菌	E.coli 残留 DNA 检测试剂盒（qPCR-荧光探针法）	HG-ED001
	E.coli 残留 DNA 片段分析检测试剂盒（qPCR-荧光探针法）	HG-EF001
	E.coli 残留总 RNA 样本前处理试剂盒	HG-CL300
	E.coli 残留总 RNA 检测试剂盒（RT-PCR 荧光探针法）	HG-ER001
	E.coli HCP ELISA 检测试剂盒（2G）	HG-HCP002-2G
293 细胞	293T HCP ELISA 检测试剂盒	HG-HCP001
	HEK293 细胞 残留 DNA 检测试剂盒（qPCR-荧光探针法）	HG-HD003
	HEK293 细胞 残留 DNA 片段分析检测试剂盒（qPCR-荧光探针法）	HG-HF002
	293T 细胞 残留 DNA 检测试剂盒（qPCR-荧光探针法）	HG-HD004
	293T 细胞 残留 DNA 片段分析检测试剂盒（qPCR-荧光探针法）	HG-HF003
毕赤酵母细胞	毕赤酵母残留 DNA 检测试剂盒（PCR 荧光探针法）	HG-PD001
	宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒	HG-CL500

江苏省苏州市吴中经济开发区越溪街道吴中大道 1463 号越旺智慧谷 A4 号楼
 Building 4 , Yuewang Wisdom Valley , 1463 Wuzhong Avenue, Wuzhong District,
 Suzhou, China