E.coli 残留 DNA 检测试剂盒 (qPCR- 荧光探针法) 说明书

本试剂盒专用于科研，而非用于诊断

Cat. No. HG-ED001

产品简介

E.coli 残留 DNA 检测试剂盒是用于定量检测各种生物制品中间品、半成品及成品中宿主细胞 DNA 的专用试剂盒，本试剂盒利用 Taqman 探针原理，定量检测样本中残留 DNA。检测快速，专一性强，性能可靠，最低检测限可达到 fg 水平。

配套我司样品前处理试剂盒（货号为 HG-CL500）进行样品的前处理。

试剂盒配套 *E.coli* DNA 定量参考品为国家标准品。

检测范围：3×10^{1} fg/μL~3×10^{5} fg/μL

规格

100 Reactions

产品组成

表 1 试剂盒组分

组 分	规格	存储条件
E.coli DNA 定量参考品（30ng/μL）	50μL×1 管	-20°C
E.coli Primer&Probe MIX	550μL×1 管	
2×qPCR Reaction Buffer	1.2mL×1 管	
DNA 稀释液	1.5mL×3 管	
ROX High	50μL×1 管	
ROX Low	50μL×1 管	

储存条件与有效期

存储条件见上表，有效期 18 个月。

适用机型

包括但不限于 ABI7500、BioRad CFX96、博日 FQD-96A、Roche Light Cycler 480 等实时定量荧光 PCR 仪器。

表 2 不同仪器适配的参比染料 ROX

仪器	ROX 参比染料
Applied Biosystems® 5700，7000，7300，7700，7900HT，StepOne™，and StepOnePlusT™	ROX High
Applied Biosystems® 7500，ViiATM 7，QuantStudio™12K Flex，Agilent Mx3000P™，Mx3005P™，and Mx4000™	ROX Low
Rotor-Gene™，DNA Engine Opticon™，Opticon™2，Chromo 4™ Real-Time Detector，Mastercycler® ep realplex，Smart Cycler®，Roche LightCycle®480，Roche LightCycler®Nano，Bio-Rad CFX96，and IIlumina Eco™	No ROX

备注：请对应机型选择适配的 ROX。如上表中未查询到对应机型可咨我司或仪器厂家。

需要准备的耗材与设备

实验前请准备好下列耗材与设备：

- 1.5mL 或 2mL 无菌低吸附离心管
- 与 PCR 仪适配的 96 孔 qPCR 板或八联排管
- 1000μL，200μL，10μL 无菌低吸附带滤芯枪头
- 荧光定量 PCR 仪
- 水浴锅 / 金属浴
- 离心机
- 震荡器
- 各规格移液器（如 1000μL，200μL，10μL，2.5μL 等）
- 磁力架

实验步骤

一、 样品前处理

详见我司样品前处理试剂盒（货号为 HG-CL500）操作说明书，样品若为质粒样品，则无需进行前处理。

二、 qPCR 操作步骤

1. 定量参考品及 NTC、NCS 制备

1.1 定量参考品：取出 *E.coli* DNA 定量参考品、DNA 稀释液置于冰上融化；待完全融化后，轻微振荡混匀，瞬时离心；

1.2 取 6 支干净的 1.5mL 离心管，分别标记为 ST0，ST1，ST2，ST3，ST4，ST5；

1.3 标准品稀释过程如下表

表 3. 标准品稀释过程

标准品代号	稀释体积	浓度（fg/μL）
ST0	10μL *E.coli* DNA 定量参考品 + 90μL DNA 稀释液	3×10^{6}
ST1	10μL ST0 + 90μL DNA 稀释液	3×10^{5}
ST2	10μL ST1 + 90μL DNA 稀释液	3×10^{4}
ST3	10μL ST2 + 90μL DNA 稀释液	3×10^{3}
ST4	10μL ST3 + 90μL DNA 稀释液	2×10^{2}
ST5	10μL ST4 + 90μL DNA 稀释液	3×10^{1}

1.4 NTC 的制备：100uL DNA 稀释液；

1.5 NCS 的制备 : 随样品取 100μL DNA 稀释液进行样品预处理（若样品为质粒样品，则无需进行 NCS 制备）；

2. q-PCR 反应液的制备和加样

2.1 根据所需检测的标准样品和待测样品数量（一般做 3 个复孔），计算所需孔数：

反应孔数 =（5 个浓度梯度的标曲 +2 个阴性对照 NTC 和 NCS + 待测样品）×3

2.2 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）× 15μL（2 或 3 为操作损失量）

2.3 将所需试剂置于冰上融化，轻微振荡混匀，按表 4 所示配制 qPCR Mix。

表 4. qPCR Mix 配制表

组分	单个反应量 (μL)
2x qPCR Reaction Buffer	10
Human Primer&Probe Mix	4.6
ROX*	0.4
总体积	15

备注：请对应机型选择适配的 ROX；若机型适配为 no ROX，请加入等体积的去离子水（要求无核酸及核酸酶污染）。

3. 将所需试剂置于冰上融化，轻微振荡混匀，按表 5 所示加样（总体积 20μL）

表 5. 各反应孔加样示例

参考品	15μL qPCR Mix +5μL ST1/2/3/4/5
阴性对照	15μL qPCR Mix +5μL NTC/NCS
待测样品	15μL qPCR Mix +5μL 待测样本

4. 实验需使用 qPCR 实验专用的八联管或者 96 孔板进行反应，需去除反应体系中的气泡，并离心将液体离至管底准备反应。

5. 反应孔排版示例

表 6. 96 孔板排版示例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ST1	ST1	ST1							S1	S1	S1
B	ST2	ST2	ST2							S2	S2	S2
C	ST3	ST3	ST3							S3	S3	S3
D	ST4	ST4	ST4									
E	ST5	ST5	ST5									
F												
G					NTC	NTC	NTC					
H					NCS	NCS	NCS					

三、 qPCR 反应程序和参数设置

以 BIO-RAD 公司 CFX96 qPCR 仪为例。

1. 创建实验反应程序，设置两步法反应程序如下表

表 7. PCR 反应程序

Stage1	预变性	Reps:1	95°C	10min
Stage2	循环反应	Reps:40	95°C	15s
			60°C	60s

备注：反应体积 20μL。程序中 60°C 60s 处设置为荧光收集。其他型号的设备，如遇问题可咨我司或仪器厂家。

2. 创建实验反应板，点击 Select Fluorophores 选择荧光 FAM；在反应板图表中，选择样品孔，在 Sample Type 中下拉选择 Unknow，勾选荧光 FAM，Target Name 命名为 E.coli-DNA；输入每个样品的重复次数及 Sample Name；

3. 在反应板图表中，选择标曲孔，在 Sample Type 中下拉选择 Standard，勾选荧光 FAM，Target Name 命名为 E.coli-DNA；输入每个稀释梯度的重复次数及 Sample Name。分别在 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5 的 Concentration 一栏赋值为 3.00E+05、3.00E+04、3.00E+03、3.00E+02、3.00E+01（单位为 fg/μL）；

4. 点击 Run 界面“Start Run”按钮进行 PCR 测定。

四、 qPCR 结果分析

以 BIO-RAD 公司 CFX96 qPCR 仪为例

1. 点击资料分析视窗 Quantitation，可读取标准曲线的斜率（Slope）、截距（Intercept）、扩增效率（Effect）、R^2。

2. 在视窗 Quantitation Data 中，SQ Mean 一栏可读取无模板对照 NTC、NCS、待测样本的检测值，单位为 fg/μL。

3. 数据可靠性评估：

- 三个平行孔间 Ct 值差应小于 1.0，Ct 值大于 35 的孔除外；
- 阴性对照 NTC 和 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 $R^2 \geqslant 0.98$，扩增效率 85%~110% 之间；

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。

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。

4. 试剂盒必须在有效期内使用。

5. 试剂盒内所有组分建议在低温环境融化后使用。

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. 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。

8. 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。

9. 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。

10. 本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断。

免责声明

在所有情况下， 本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。

©2024 谱新生物 Hillgene. All right reserved. Ver.6.2406
江苏谱新生物医药有限公司
A. 苏州市吴中区吴中大道 1463 号越旺智慧谷 4 号楼
T.400 900 1882 W.www.hillgene.com