

E.coli 残留 DNA 检测试剂盒 (qPCR- 荧光探针法) 说明书

【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进行样品的前处理。

试剂盒配套 E.coliDNA 定量参考品为国家标准品。

检测范围： 3×10^1 fg/ μ L~ 3×10^5 fg/ μ L

【规格】

100 Reactions

【储存条件】

储存条件见下表，有效期 18 个月。

【试剂盒组成】

表 1 试剂盒组分

组分	规格	储存条件
E.coliDNA 定量参考品 (30ng/ μ L)	50 μ l×1 管	-20℃
E.coliPrimer&Probe MIX	550 μ l×1 管	
2x qPCR Reaction Buffer	1.2ml×1 管	
DNA 稀释液	1.5ml×3 管	
ROX High*	50 μ l×1 管	

苏州欣协生物科技有限公司

电话：0512-63037851

网址：www.xinbiotech.cn

邮箱：info@szxxbio.com

ROX Low*	50µl×1 管	
----------	----------	--

*请对应机型选择适配的 ROX。

通用机型（包括但不限于）

- ◆ ABI PRISM 7500
- ◆ CFX96 (Bio-Rad)
- ◆ Linegene 9600plus (博日)

配合不同机型使用时，请注意选择适配的参比染料 ROX。

仪器	ROX 参比染料
Applied Biosystems® 5700, 7000, 7300, 7700, 7900HT, StepOne™, and StepOnePlus™	ROX High
Applied Biosystems® 7500, ViiA™ 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 Illumina Eco™	No ROX

用户自备材料

- ◆ 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

【操作步骤】

一、样品前处理

详见我司样品前处理试剂盒操作说明书，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

标准品代号	稀释体积	浓度 (fg/μl)
ST0	10μL <i>E.coli</i> /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	3×10^2
ST5	10μl ST4+90μl DNA 稀释液	3×10^1

1.4 NTC 的制备：100μL 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)；

1.6 加标回收 ERC：建议 90uL 样品 +10uL ST3，也可根据实际情况按照其他方式制备。

2. qPCR 反应液的制备和加样

2.1 根据所要检测的标准曲线及待测样本数量，计算所需反应孔数，一般做 3 个重复孔/样。

反应孔数 = (5 个浓度梯度的标准曲线 + 2 个阴性对照 NTC 和 NCS + 待测样本数) × 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 为损失量)

2.3 取出各试剂置于冰上融化，轻微振荡混匀，按下表所示加样配制 qPCR MIX：

组分	单孔反应
2x qPCR Reaction Buffer	10μl
Human Primer&Probe Mix	4.6μl
ROX*	0.4μl
总体积	15μl

*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级去离子水）。

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

各反应孔加样如下表：

标准曲线	15μl qPCR MIX + 5μl ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
阴性对照	15μl qPCR MIX + 5μl DNA NTC/NCS
待测样本	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。

三、qPCR 程序参数设置

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：

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

备注：反应体积 20μL。程序中 60℃ 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。

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。并且分别在 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)。

3. 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 $R^2 \geq 0.98$ ，扩增效率 85%~110% 之间；
- ERC 回收率在 50%~150% 之间（加标回收率 = $ERC / (0.9 * \text{样品} + 0.1 * ST3)$ ）。

【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。

