

E.coli Host Cell DNA Residue Detection Kit (2G)

E.coli 宿主细胞 DNA 残留检测试剂盒(2G)

产品信息

产品名称	产品编号	规格
E.coli Host Cell DNA Residue Detection Kit (2G)	41308ES50	50T
E.coli 宿主细胞 DNA 残留检测试剂盒(2G)	41308ES60	100T

产品描述

E.coli 宿主细胞 DNA 残留检测试剂盒是用于定量分析检测各种生物制品的中间品、半成品和成品中的 E.coli 残留 DNA 含量的试剂盒。

本试剂盒采用探针法荧光定量 PCR 原理，可专一快速的检测 E.coli 细胞的残留 DNA，其最低检测限可以达到 fg 水平。该试剂盒可与本公司的磁珠法残留 DNA 样本前处理试剂盒(Cat#18461ES/18462ES)配套使用。

产品组分

组分编号	组分名称	产品编号/规格	
		41308ES50 (50T)	41308ES60 (100T)
41308-A	E.coli qPCR Mix	0.75 mL	1.5 mL
41308-B	E.coli Primer&Probe Mix	250 μ L	500 μ L
41308-C	DNA Dilution Buffer	2 \times 1.8 mL	4 \times 1.8 mL
41308-D	E.coli DNA Control (30 ng/ μ L)	25 μ L	50 μ L

运输和保存方法

1. 所有组分均干冰运输，-20 $^{\circ}$ C保存，有效期2年。且41308-A和41308-B均需避光保存。
2. 收到货后，请检查共4个组分是否齐全，并立即放入对应的保存温度中储存。

注意事项

1. 使用本试剂盒前请仔细阅读本说明书，实验应规范操作，包括样本处理、反应体系的配制及加样。
2. 每个组分在使用前都应充分震荡混匀，低速离心。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
4. 本产品仅作科研用途。

适用机型

包含但不限于以下仪器：

Bio-Rad: CFX96 Optic Module;

Thermo Scientific: ABI 7500, ABI Quant Studio 5, ABI Step OnePlus;

上海宏石医疗科技: SLAN-96S。

使用方法

一、E.coli DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

用试剂盒中提供的 DNA 稀释液将 DNA 定量参考品进行梯度稀释，稀释浓度依次为 300 pg/ μ L, 30 pg/ μ L, 3 pg/ μ L, 300 fg/ μ L,

30 fg/μL。

具体操作如下：

1. 将试剂盒中的 E.coli DNA Control 和 DNA Dilution Buffer 置于冰上融化，待完全融化后，轻微振荡混匀，低速离心 10 sec。
2. 取 6 支洁净的 1.5 mL 离心管，分别标记为 Std0, Std1, Std2, Std3, Std4, Std5。
3. 在标记为 Std0 的 1.5 mL 离心管中加入 90 μL DNA Dilution Buffer 和 10 μL E.coli DNA Control (30 ng/μL)，即稀释为 3 ng/μL，振荡混匀后短暂快速离心 10 sec，该浓度可分装置于 -20°C 短期保存（不超过 3 个月），使用时避免反复冻融。
4. 在 Std1, Std2, Std3, Std4, Std5 管中先分别加入 90 μL DNA Dilution Buffer，再进行梯度稀释，稀释方法如下：

稀释管	稀释比例	终浓度
Std1	10 μL Std0 + 90 μL DNA Dilution Buffer	300 pg/μL
Std2	10 μL Std1 + 90 μL DNA Dilution Buffer	30 pg/μL
Std3	10 μL Std2 + 90 μL DNA Dilution Buffer	3 pg/μL
Std4	10 μL Std3 + 90 μL DNA Dilution Buffer	300 fg/μL
Std5	10 μL Std4 + 90 μL DNA Dilution Buffer	30 fg/μL

【注】：

1. 每个浓度做 3 个复孔，该试剂可测试 30 fg/μL-300 pg/μL 线性范围。若需要，可适当扩大或缩小线性范围。
2. 为减少反复冻融次数和避免污染，建议初次使用时将 DNA 定量参考品分装储存于 -20°C。
3. 已融化未使用的 DNA Dilution Buffer 可保存于 2-8°C 7 天，若长时间不用，请放置于 -20°C。
4. 为确保模板完全混匀，每个梯度稀释时需轻微震荡混匀约 1 min。

二、样本加标回收质控 ERC 的制备

根据需要设置 ERC 中的 E.coli DNA 标准品浓度（以制备加 30 pg E.coli DNA 量的 ERC 为例），具体操作如下：

1. 取 100 μL 待测样本加入 1.5 mL 洁净的离心管中，再加入 10 μL Std3，混匀，标记为 ERC。
2. 加标回收 ERC 和同批待测样本一起进行样本前处理，制备加标回收 ERC 纯化液。

三、阴性抽提质控 NCS 的制备

根据实验设置阴性抽提质控 NCS，具体操作如下：

1. 取 100 μL 样本基质溶液（或 DNA Dilution Buffer）加入 1.5 mL 洁净的离心管中，标记为 NCS。
2. 阴性质控 NCS 和同批待测样本一起进行样本前处理，制备成阴性质控 NCS 纯化液。

四、无模板对照 NTC 的制备

根据实验设置无模板对照 NTC，具体操作如下：

1. 无模板对照 NTC 无需进行样本前处理，在 qPCR 法检测残留 DNA 含量阶段开始配置即可。
2. 每管或孔中的 NTC 样本为 20 μL Mix 混合液（即 15 μL E.coli qPCR Mix + 5 μL E.coli Primer&Probe Mix）+ 10 μL DNA Dilution Buffer，建议配置 3 个重复孔的量。

五、反应体系

组分	体积 (μL)
E.coli qPCR Mix	15
E.coli Primer&Probe Mix	5
DNA template	10
总体积	30

【注】：

1. 根据反应孔数计算本次所需的 Mix 混合液总量：**Mix 混合液 = (反应孔数+2) × (15+5) μL (含有 2 孔的损失量)**。通常，每个样本做 3 个重复孔。
2. 反应孔数 = (5 个浓度梯度的标准曲线+1 个无模板对照 NTC+1 个阴性抽提质控 NCS+待测样 TS 个数+待测样本对应加标回收 ERC 个数) × 3。

NTC (No Template Control): DNA Dilution Buffer

NCS (Negative Control Solution): 样本基质溶液或 DNA Dilution Buffer 进行样本前处理后，所得纯化液为 NCS

TS (Test Sample): 待测样本

ERC (Extraction Recovery Control): 待测样本中加入如 30 pg 标准品 DNA 后进行样本前处理, 所得纯化液为加标回收 ERC

3. 加样完成密封好管子后, 请低速离心 10 sec 将管壁的液体离心收集至管底, 再震荡混匀 5 sec 以上, 完全混匀反应液, 再低速离心 10 sec 将管壁的液体离心收集至管底, 如有气泡, 需将气泡排尽。

下图为参考板位:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC		待测样本TS1	待测样本TS1	待测样本TS1		标准曲线Std1	标准曲线Std1	标准曲线Std1			
B	NTC		待测样本TS2	待测样本TS2	待测样本TS2		标准曲线Std2	标准曲线Std2	标准曲线Std2			
C	NTC		待测样本TS3	待测样本TS3	待测样本TS3		标准曲线Std3	标准曲线Std3	标准曲线Std3			
D							标准曲线Std4	标准曲线Std4	标准曲线Std4			
E	NCS		样本加标ERC1	样本加标ERC1	样本加标ERC1		标准曲线Std5	标准曲线Std5	标准曲线Std5			
F	NCS		样本加标ERC2	样本加标ERC2	样本加标ERC2							
G	NCS		样本加标ERC3	样本加标ERC3	样本加标ERC3							
H												

该示例是对 E.coli 残留 DNA qPCR 法检测操作的展示, 检测样本包括: 5 个浓度梯度的 E.coli DNA 标准曲线、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、3 个待测样本 TS、3 个样本加标回收 ERC。建议每个样本做 3 个重复孔。

六、扩增程序参数设置 (两步法) (以 ABI 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 2.0 为例)

1. 创建空白新程序, 选择绝对定量检测模板。
2. 创建 1 个检测探针, 命名为“E.coli-DNA”, 选择报告荧光基团为“FAM”, 淬灭荧光基团为“none”, 参比荧光为“ROX” (参比荧光可根据仪器型号等情况, 选择是否需要添加)。
3. 在“Assign target (s) to the selected wells”面板中, 将标准曲线孔的“Task”一栏设置为“Standard”, 并且在“Quantity”一栏分别赋值为“300000”, “30000”, “3000”, “300”, “30” (含义为每孔的 DNA 浓度, 单位为 fg/μL), 并且在相应的“sample name”一栏中命名为“300 pg/μL”, “30 pg/μL”, “3 pg/μL”, “300 fg/μL”, “30 fg/μL”; 将无模板对照 NTC 孔的“Task”一栏设置为“NTC”; 将阴性质控 NCS 孔、待测样本 TS 孔、样本加标回收 ERC 孔的“Task”一栏设置为“Unknown”, 并且在相应的“Sample Name”一栏中分别命名为“NCS”, “TS”, “ERC”; 之后点击“Start Run”, 开始仪器运行。
4. 扩增程序设置: 设置反应体积 30 μL。

循环步骤	温度 (°C)	时间	循环数
预变性	95°C	10 min	1
变性	95°C	15 sec	40
退火/延伸 (收集荧光)	60°C	30 sec	

七、qPCR 结果分析

1. 在“Analysis”的“Amplification Plot”面板中, 系统会自动给出“Threshold”, 有时系统给出的“Threshold”离基线太近, 导致复孔之间 Ct 相差甚远, 可手动调节“Threshold”至合适位置, 点击“Analyze”。此时可在“Multicomponent Plot”初步查看扩增曲线的形态是否正常。
2. 在“Analysis”的“Standard Curve”面板中, 可读取标准曲线的 R²、扩增效率(Eff%)、斜率(Slope)、截距(Intercept)等。正常的标曲: R²>0.99, 扩增效率在 90%≤Eff%≤110%范围内, Slope 在-3.6~-3.1。
3. 在“Analysis”的“View well table”面板中, “Quantity”一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样本 TS、样本加标回收 ERC 的检测值, 单位为 fg/μL, 后续可在检测报告中将单位换算成 pg/μL 或 pg/mL。
4. 结果分析的参数设置需依据具体的机型及使用的软件版本, 一般也可由仪器自动判读。
5. 根据待测样本 TS 和样本加标回收 ERC 的检测结果计算加标回收率, 加标回收率要求在 50%~150%之间。加标回收率计算公式: 回收率(%) = {样本加标测定值(eg.pg/μL)-样本测定值(eg.pg/μL)} x 洗脱体积(μL) / DNA 加入量理论值(eg.pg) x 100%。
6. 阴性质控 NCS 的 Ct 值应大于标曲最低浓度 Ct 的均值。
7. 无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值≥35。