

ExCell Bio

***E.coli* DNA 残留检测试剂盒 2G+ (荧光探针 qPCR 法) 说明书**

本品仅用于科学研究及生产，不适用于临床诊断和治疗

User Manual

Catalog Number

CRH00-1061

CRH00-1062

CRH00-1061S



I 产品概述

本试剂盒利用Taqman探针定量PCR方法，能快速检测各种生物制品及药品的中间品、半成品和成品中残留的大肠杆菌（*E.coli*）宿主菌DNA。试剂盒中引入了尿嘧啶-N-糖基化酶（uracil-N-glycosylase, UNG）防污染系统，可有效去除PCR产物的残留污染，大大降低了由于扩增产物污染而导致的假阳性。试剂组分中含有内标控制（IC）及参比染料ROX，通过IC的信号表现，监控反应过程是否正常进行，排除样本干扰；ROX适用于ABI荧光定量PCR仪或其他同类设备，起到荧光参比光程校正作用。

本产品适用于以大肠杆菌菌株（如 *E.coli*-K12, *E.coli*-DH5 α , *E.coli*-MC1061, *E.coli*-HB101, *E.coli*-AM-7, *E.coli*-XL1-Blue, *E.coli*-YK537 等）

为宿主生产的生物药原液、成品、半成品、中间品或工艺过程监控样本。为获得定量样本DNA的校准曲线，试剂盒中包含制备校准曲线的DNA校准品*E.coli* DNA Control，用于制备5个稀释梯度的校准点（300 pg/ μ L至30 fg/ μ L）。

*E.coli*宿主菌的残留DNA抽提建议使用本公司配套的通用型宿主DNA残留样本前处理试剂盒。首次使用前建议先完成产品的适用性研究：确认样本或样本基质是否存在干扰或者抑制物，以及选择合适的样本检测稀释条件等。

I 产品应用

本试剂盒适用于生物制药的中间产物到最终成品的不同样本类型，检测结果精确可靠，可定量检测*E.coli* DNA残留，定量检测范围为300 pg/ μ L至30 fg/ μ L。

I 产品组分及储存条件

组分	CRH00-1061 (50T)	CRH00-1062 (100T)	CRH00-1061S (50T)
<i>E.coli</i> DNA Control	20 μ L	40 μ L	20 μ L
DNA Dilution Buffer	4 mL	4 mL \times 2	4 mL
2 \times qPCR Mix	750 μ L	750 μ L \times 2	750 μ L
6 \times <i>E.coli</i> Detection Mix	250 μ L	500 μ L	250 μ L

储存条件： - 40 ~ - 18 $^{\circ}$ C保存。

有效期： 规定储存条件下可保存 12 个月。

运输条件： 干冰运输。

适用仪器： 已验证机型为 ABI 7500 系列。

| 实验准备

仪器及自备试剂

- 荧光定量PCR仪（含有FAM，HEX/VIC，ROX通道）；
- 专用的移液枪和对应低吸附带滤芯的枪头；
- 低吸附的1.5 mL离心管和八连管（适配定量PCR仪）；
- 洁净实验服，一次性手套、口罩等。

实验区域的划分

建议采用以下分区制度，避免造成待测样本污染：

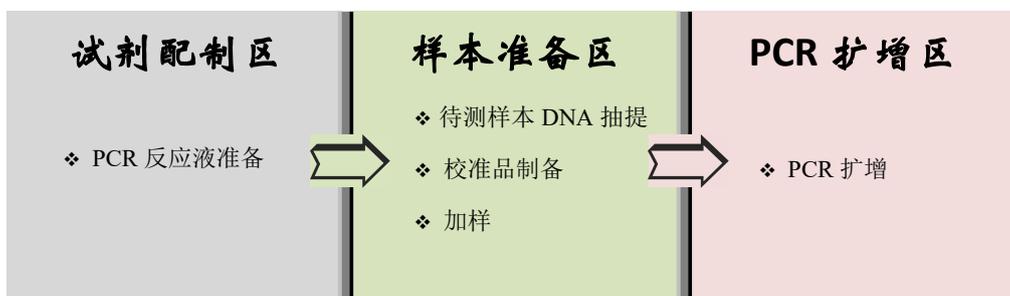
- 试剂配制区：除了模板之外的所有其他试剂的独立配制区，可为独立的物理隔离区（如超净工作台）；
- 样本准备区：准备模板的区域，包括提取和稀释样本；
- PCR扩增区：与前两区域相对独立的进行PCR扩增的区域。

| 实验流程

样本说明

英文简写	英文全称	名词解释
NTC	No Template Control	阴性对照
NEG	Negative Extraction Control	经前处理的阴性样本
TS	Test Sample	待测样本
ERC	Extraction Recovery Control	加标回收样本

实验操作流程



PCR 反应液的准备 (试剂配制区)

首次使用前, 请将各组份解冻后瞬时离心, 确保试剂收集于管底。

- 在反应前先确定要检测的样本数量和对照数量:

待检数量=(6个浓度梯度的校准曲线+1个无模板对照NTC+1个阴性质控NEG+待测样TS个数+待测样本对应加标回收ERC个数) × 3

- 将6× *E.coli* Detection Mix, 2× qPCR Mix在室温完全解冻后, 涡旋混匀并快速离心;
- 根据以下表格中的信息和所需反应数准备PCR反应混合液, 每个反应孔中分装 20 μL(反应之前放2~8°C);

试剂	1 个 30 μL 反应中所需体积
2× qPCR mix	15 μL
6× <i>E.coli</i> Detection Mix	5 μL
Total	20 μL

注: 根据待检样本数量, 适当包含合理的损耗, 计算在试剂配制总量内。

样本处理 (样本准备区)

待测样本 DNA 抽提:

建议配套使用本公司的通用型宿主 DNA 残留样本前处理试剂盒, 首次使用时, 建议先进行产品适用性研究, 确认产品适用性 (如基质干扰, 最小稀释浓度, 分析特异性等)。

E.coli DNA Control 校准品制备:

1. 取 6 个低吸附的 1.5 mL 离心管, 分别标记为 ST0、ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。ST0 为中间稀释过渡管, 其余 ST1 至 ST5 依次对应 6 个稀释梯度的校准品;
2. ST1 ~ ST5 的 5 个离心管中均加入 90 μL DNA Dilution Buffer (每加一管均需更换枪头);
3. 将 *E.coli* DNA Control 从规定的储存条件中取出, 室温解冻后, 轻微涡旋混匀后快速离心, 使管盖和管壁的液体聚集到离心管底部;

- 将 *E.coli* DNA Control 稀释至 3 ng/μL: 计算所需的 DNA Dilution Buffer 和 *E.coli* DNA Control 的量, 取一定体积的 DNA Dilution Buffer 加入 ST0 管中, 加入适量的 *E.coli* DNA Control, 充分涡旋混匀, 并快速离心, 使 *E.coli* DNA Control 的终浓度为 3 ng/μL;
- 再按以下表格依次进行 5 次 10 倍梯度稀释 (每次转移上一管的母液到新管均需更换枪头):

管号	稀释方法	浓度
ST1	10 μL ST0 + 90 μL DNA Dilution Buffer	300 pg/μL
ST2	10 μL ST1 + 90 μL DNA Dilution Buffer	30 pg/μL
ST3	10 μL ST2 + 90 μL DNA Dilution Buffer	3 pg/μL
ST4	10 μL ST3 + 90 μL DNA Dilution Buffer	300 fg/μL
ST5	10 μL ST4 + 90 μL DNA Dilution Buffer	30 fg/μL

- 将稀释好的校准品暂存在 2 ~ 8°C 供当天实验检测。

注: 解冻后未使用完的 DNA Dilution Buffer 可保存于 2 ~ 8°C 冰箱, 供 2 个月内再次实验使用; 实验间隔超过 2 个月的建议 - 40 ~ - 18°C 保存。

加样 (样本准备区)

布板示例:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	NTC	NTC		TS1	TS1	TS1		TS1 ERC	TS1 ERC	TS1 ERC	
B					TS2	TS2	TS2		TS2 ERC	TS2 ERC	TS2 ERC	
C					TS3	TS3	TS3		TS3 ERC	TS3 ERC	TS3 ERC	
D	ST5	ST5	ST5									
E	ST4	ST4	ST4									
F	ST3	ST3	ST3						NEG	NEG	NEG	
G	ST2	ST2	ST2									
H	ST1	ST1	ST1									

- 向已加入 PCR 反应混合液的每个反应孔中分别加入 10 μL 反应模板;
- 妥善盖好管盖或封好 96 孔板的封口膜, 快速离心后上机检测。

PCR 扩增 (PCR 扩增区)

以下操作步骤以 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪为例:

1. 首先 log in, 进入主界面, 选择 Set up 栏下面的 Design Wizard;
2. 然后依次输入本次实验名称, 选择机型“7500 (96 wells)”、实验类型“Quantitation”、试剂“TaqMan Reagents”、实验时长“Standard”;
3. 依次点击“Next”进入“Target”设定界面, 选择报告基团为FAM, 淬灭基团为None, 新增报告基团为VIC, 淬灭基团为None;
4. 依次点击“Next”进入“Plate Setup”设定界面, 按需求设定标准品, 样品及阴性对照的名字及在96孔板上的位置;

在“Assign Targets and Samples”选项中, 左下角的“Select the dye to use as the passive reference”下拉框选择“ROX”;

如果设定标准品的绝对量, 则先点击“Assign Targets and Samples”, (2)再点击左侧“Instruction”下面的“Define and Setup Standards”的桔红色按钮(点击后会变为蓝色), (3)在浓度设置区域里填写对标准品的赋值及稀释倍数等参数, 即完成标准品的绝对量赋值。

5. 进入“Run Method”设定界面, 依次将反应体系设置为30 μ L, 反应程序设置为两步法反应程序:

步骤		温度 (°C)	时间 (s)	循环数 (次)
1	消 化	37	300	1
2	预变性	95	300	1
3	变 性	95	15	40
	收集荧光	60	60	
<i>E.coli</i> 检测通道: FAM; IC 检测通道: HEX/VIC				

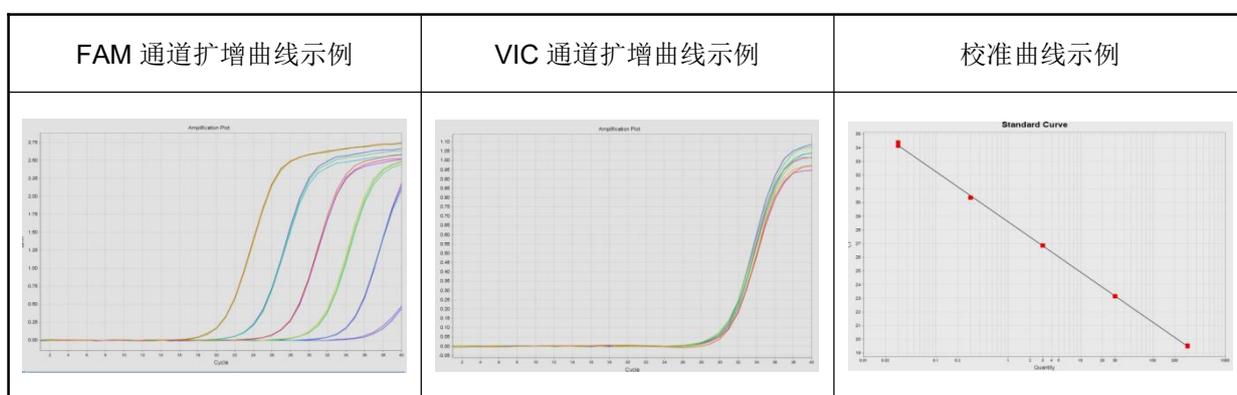
6. 全部设定好后, 选择界面右上角的绿色按钮“Start Run”开始检测;
7. 检测完毕后做数据分析, 选择最左侧的选择条“Analysis”;
8. 在Amplification Plot界面选择FAM的Threshold为Auto, 此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常;
9. 在Standard Curve界面, 可读取校准曲线的斜率, 截距和 R^2 。

质量控制

- 校准品按十倍梯度稀释, 判定校准曲线的 $R^2 \geq 0.98$, 斜率(Slope)为 - 3.80 ~ - 3.10, 扩增效率(Efficiency)为 83.3% ~ 110%;
- 校准曲线中 IC 的 Ct 值 $CV \leq 5\%$;
- 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。NTC、NEG 的检测结果应为 $Ct \geq 38$ 或 No Ct。

检验结果说明

参考示例



结果判读参考

下表中 HEX/VIC 通道的 $\Delta Ct = Ct_{\text{样本}} - \bar{Ct}_{\text{校准曲线}}$, $C_{\text{样本}}$ 代表检测样本的浓度:

FAM	HEX/VIC	结果判定	结果报告
$Ct < Ct_{ST1}$	/	$C_{\text{样本}} > 300 \text{ pg}/\mu\text{L}$, 超出定量上限, 需稀释到合适浓度后重新测定。	/
$Ct_{ST1} \leq Ct \leq Ct_{ST5}$	$\Delta Ct < -1$	反应液分液不均一或存在干扰, 建议重新测试。	/
	$-1 \leq \Delta Ct \leq 1$	样本浓度在定量范围内, 根据校准曲线回算浓度。	计算浓度
	$\Delta Ct > 1$	反应液分液不均一或存在干扰, 建议重新测试。	/
$Ct > Ct_{ST5}$ 或 No Ct	/	超出定量下限或未检出。	$C_{\text{样本}} < 30 \text{ fg}/\mu\text{L}$

操作注意事项

- 建议使用一次性手套、口罩, 洁净的实验服;

- 使用经校准的移液器；
- 建议使用带滤芯的低吸附枪头；
- 在不同的实验区域使用专用的移液枪和枪头及相关设备；
- 反应制备需要充分涡旋混匀，并瞬时离心将所有液体收集到离心管底部；
- 为避免交叉污染，请小心开合所有试剂管或反应管；
- 阴性对照、检测样品、阳性对照使用专用移液器，不得混用，避免污染；
- 建议加样顺序依次为阴性对照、校准品、待测样品、待测样品加标回收样（见布板示例）；
- 尽量避免将PCR产物带到试剂配制区及样本准备区；
- 实验台和仪器表面使用后建议用75%酒精清洁；
- 实验过程中的废弃枪头需及时浸泡在0.1%的次氯酸钠溶液中，实验结束后进行清场。

| 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。