

# ExCell Bio

## ResiQuant<sup>®</sup> 即用型 *E.coli* DNA 残留检测 试剂盒 (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    CRH00-1101S  
                             CRH00-1101  
                             CRH00-1102



## | 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系列荧光定量PCR仪或其他同类设备，起到光程校正作用。

本产品适用于以大肠杆菌菌株（如*E.coli*-K12, *E.coli*-DH5 $\alpha$ , *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5个浓度梯度（300 pg/ $\mu$ L至30 fg/ $\mu$ L）的DNA校准品用于制备校准曲线。

*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。

## | 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/ $\mu$ L至30 fg/ $\mu$ L。

## | 产品组分及储存条件

组分	CRH00-1101 (50T)	CRH00-1102 (100T)	CRH00-1101S (50T)
<i>E.coli</i> -Std1	150 $\mu$ L	250 $\mu$ L	150 $\mu$ L
<i>E.coli</i> -Std2	150 $\mu$ L	250 $\mu$ L	150 $\mu$ L
<i>E.coli</i> -Std3	150 $\mu$ L	250 $\mu$ L	150 $\mu$ L
<i>E.coli</i> -Std4	150 $\mu$ L	250 $\mu$ L	150 $\mu$ L
<i>E.coli</i> -Std5	150 $\mu$ L	250 $\mu$ L	150 $\mu$ L
DNA Dilution Buffer	4 mL	4 mL $\times$ 2	4 mL
2 $\times$ <i>E.coli</i> qPCR Mix	750 $\mu$ L	750 $\mu$ L $\times$ 2	750 $\mu$ L
6 $\times$ <i>E.coli</i> Detection Mix	250 $\mu$ L	500 $\mu$ L	250 $\mu$ L

**储存条件：** - 40 ~ - 18°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、Bio-Rad CFX96 PCR System、Agilent MxPro 3000。

## | 实验准备

### 仪器及自备试剂

- 荧光定量PCR仪（须含有FAM，HEX/VIC，如有“reference”选项，请选择“ROX”）；
- 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：

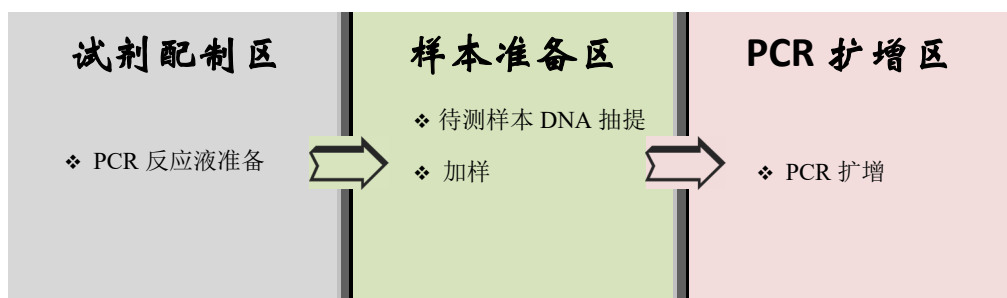
- 试剂配制区：除了模板之外的所有其他试剂的独立配制区，可为独立的物理隔离区（如超净工作台）；
- 样本准备区：准备模板的区域，包括提取和稀释样本；
- PCR扩增区：与前两区域相对独立的进行PCR扩增的区域。

## | 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, 请将各组分解冻后瞬时离心, 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 = (5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

- 在6× *E.coli* Detection Mix, 2× *E.coli* qPCR Mix完全恢复至室温后, 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× <i>E.coli</i> qPCR Mix	15 μL
6× <i>E.coli</i> Detection Mix	5 μL
<b>Total</b>	<b>20 μL</b>

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)。

**校准品准备:**

将 *E.coli*-Std1、*E.coli*-Std2、*E.coli*-Std3、*E.coli*-Std4、*E.coli*-Std5 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；

**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	Std5	Std5	Std5									
E	Std4	Std4	Std4									
F	Std3	Std3	Std3						NEG	NEG	NEG	
G	Std2	Std2	Std2									
H	Std1	Std1	Std1									

1. 向已加入 PCR 反应混合液的每个反应孔中分别加入 10  $\mu$ L 反应模板；
2. 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. 首先打开软件，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 μL，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				

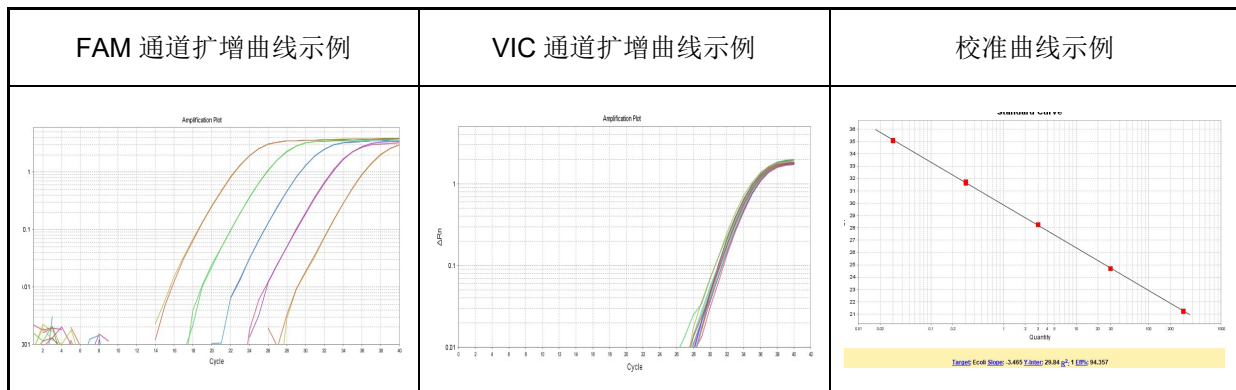
- 全部设定好后，选择界面右上角的绿色按钮“Start Run”开始检测；
- 检测完毕后做数据分析，选择最左侧的选择条“Analysis”；
- 在Amplification Plot界面查看扩增曲线的形态是否正常；
- 在Standard Curve界面，可读取校准曲线的斜率，截距和R<sup>2</sup>。

### 质量控制

- 校准品按十倍梯度稀释，判定校准曲线的 R<sup>2</sup>≥0.98, 斜率(Slope)为- 3.80 ~ - 3.10, 扩增效率(Efficiency)为 90% ~ 110%;
- 校准曲线中 IC 的 Ct 值 CV≤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≥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
$Ct < Ct_{\text{Std1}}$	/	$C_{\text{样本}} > 300 \text{ pg}/\mu\text{L}$ ，超出定量上限，需稀释到合适浓度后重新测定。	/
$Ct_{\text{Std1}} \leq Ct \leq Ct_{\text{Std5}}$	$\Delta Ct < -1$	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。	/
$Ct > Ct_{\text{Std5}}$ 或 No Ct	/	超出定量下限或未检出。	$C_{\text{样本}} < 30 \text{ fg}/\mu\text{L}$

## 操作注意细节

- 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。