

# ExCell Bio

## resiQuant *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    CRH00-1021  
                          CRH00-1022  
                          CRH00-1021S



## 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*）宿主细胞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。检测体系设置为双通道系统，组分中含有内标控制（IC），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。

本产品适用于以大肠杆菌株系（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，本试剂盒需要制备5个稀释梯度的校准品（300 pg/ $\mu$ L至30 fg/ $\mu$ L），试剂盒中包含制备校准曲线的DNA校准品*E.coli* DNA Control，溯源至大肠杆菌DNA含量测定国家标准品（中国，编号：270027）。

*E.coli*宿主细胞的残留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：确认样本基质是否存在干扰；确定合适的样本检测稀释条件；样本中是否存在反应抑制物等。针对质粒或者类似核酸样本，尤其需要考察产品适用性，确认样本干扰以及优化检测方案。

## 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/ $\mu$ L至30 fg/ $\mu$ L。

## I 产品组分及储存条件

组分	CRH00-1021 (50T)	CRH00-1022 (100T)	CRH00-1021S (50T)
<i>E.coli</i> DNA Control	20 $\mu$ L	40 $\mu$ L	20 $\mu$ L
DNA Dilution Buffer	4 mL	4 mL $\times$ 2	4 mL
2 $\times$ 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 $^{\circ}$ 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、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（含有FAM，HEX/VIC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：

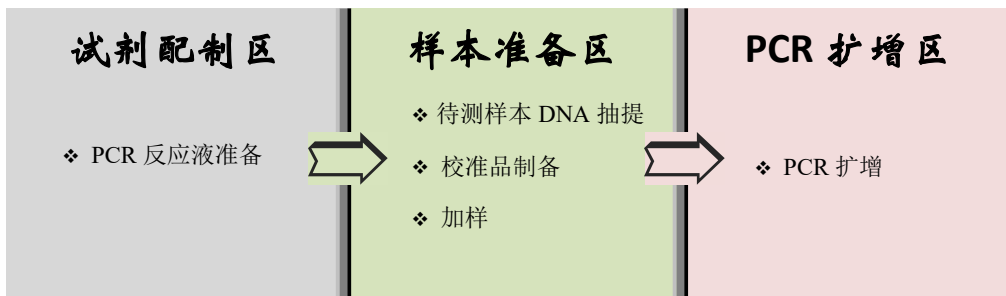
- 试剂配制区：除了模板之外的所有其他试剂的独立配制区，可为独立的物理隔离区（如超净工作台）；
- 样本准备区：准备模板的区域，包括提取和稀释样本；
- PCR扩增区：与前两区域相对独立的进行PCR扩增的区域。

## | 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=(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
- 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
6× <i>E.coli</i> Detection Mix	5 μL
2× qPCR Mix	15 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, 检测浓度, 反应抑制物等)。

*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 5 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)

反应程序设置:

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

## 定量 PCR 数据分析

在适用性研究时,可以考察仪器自动阈值线方法,或者反应结束后,手动将阈值线设为 3~15(根据实际情况,阈值线可在一定范围内变化),荧光阈值(Threshold)设定原则以阈值线刚好超过阴性对照品扩增曲线(无规则的噪音线)的最高点,且循环阈值(Cycle threshold, Ct)显示为 No Ct。根据适用性研究结果,确认合适阈值线设定方法,使用仪器配套软件分析结果。

## 质量控制

- 本试剂盒符合现行大肠杆菌 (*E.coli*) 表达产品残留 DNA 检测荧光定量 PCR 法中国国家标准 GB/T 34777-2017;
- 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 -3.8 ~ -3.1, 扩增效率(Efficiency)为 90% ~ 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

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。