

天
净
沙
系
列

CAT#:15-174

低温运输，-20℃保存

BINGENE

巴斯德毕赤酵母细胞基因组 DNA 残留探针法 qPCR 试剂盒

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址：www.bingene.com；电话：400-6005850；电邮：order@bingene.com

<p>产品及特点</p>	<p>巴斯德毕赤酵母细胞是生物制品生产中应用较为广泛的宿主细胞之一。理论上,存在于生物制品中的微量 DNA 杂质都可能转导异源基因到人体细胞,最后导致癌变或其他病理变化。因此,中国药典 2020 年版三部规定,以细胞基质生产的生物制剂 DNA 残留量不能超过 100pg/剂,以细菌或真菌基质生产的疫苗 DNA 残留量不能超过 10ng/剂。由于宿主细胞 DNA 残留量的控制是生物制品质量控制中非常重要的环节,因此本公司基于荧光定量 PCR 技术,开发了专门用于检测样品中巴斯德毕赤酵母细胞基因组 DNA 残留的本产品,它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 即开即用,用户只需要提供样品 DNA 模板。 2. 引物和探针经过优化,分析灵敏性高,可以达到 0.001pg/μL。 3. 提供阳性对照,便于区分假阴性样品。 4. 特异性高,引物和探针是根据巴斯德毕赤酵母细胞 DNA 高度保守区设计,不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。 5. 既可用于定性检测,又可用于定量检测。用于定量检测时线性范围至少为 5 个数量级。 6. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。 7. 本产品只能用于科研。 																												
<p>规格及成分</p>	<p>本产品采用 5 孔盒包装</p> <table border="1" data-bbox="451 1267 1437 1720"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>规格</th> <th>包装材料</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2×Probe qPCR MasterMix</td> <td>981201</td> <td>0.5 mL</td> <td>0.5 mL 本色盖</td> </tr> <tr> <td>荧光 PCR 专用模板稀释液</td> <td>180701</td> <td>1 mL</td> <td>1.5 mL 绿色盖</td> </tr> <tr> <td>超纯水</td> <td>210806</td> <td>1 mL</td> <td>1.5 mL 蓝色盖</td> </tr> <tr> <td>巴斯德毕赤酵母细胞 qPCR 引物-探针混合液</td> <td>yp15-174fn</td> <td>150 μL</td> <td>0.5 mL 棕色管</td> </tr> <tr> <td>巴斯德毕赤酵母细胞 qPCR 阳性对照(100pg/μL)</td> <td>pc15-174fn-FN392325</td> <td>50 μL</td> <td>0.5 mL 黄色盖</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>15-174sc</td> <td>1 份</td> <td>无</td> </tr> </tbody> </table>	成分	编号	规格	包装材料	2×Probe qPCR MasterMix	981201	0.5 mL	0.5 mL 本色盖	荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿色盖	超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝色盖	巴斯德毕赤酵母细胞 qPCR 引物-探针混合液	yp15-174fn	150 μ L	0.5 mL 棕色管	巴斯德毕赤酵母细胞 qPCR 阳性对照(100pg/ μ L)	pc15-174fn-FN392325	50 μ L	0.5 mL 黄色盖	使用手册	15-174sc	1 份	无
成分	编号	规格	包装材料																										
2×Probe qPCR MasterMix	981201	0.5 mL	0.5 mL 本色盖																										
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿色盖																										
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝色盖																										
巴斯德毕赤酵母细胞 qPCR 引物-探针混合液	yp15-174fn	150 μ L	0.5 mL 棕色管																										
巴斯德毕赤酵母细胞 qPCR 阳性对照(100pg/ μ L)	pc15-174fn-FN392325	50 μ L	0.5 mL 黄色盖																										
使用手册	15-174sc	1 份	无																										
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输, -20℃保存, 保存期限为 12 个月。</p>																												
<p>自备试剂</p>	<p>样品 DNA。</p>																												

使用方法

一、**稀释标准曲线样品**（以 100pg-0.001pg/ μ L 这 6 个 10 倍稀释度为例）。由于标准品浓度非常高，因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行，千万不能污染样品或本试剂盒的其他成分）。为增加产品稳定性和避免扩散传染性病原，本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供无传染性的 DNA 片段作为阳性对照。

1. 标记 6 个离心管，分别为 6, 5, 4, 3, 2, 1。
2. 用带芯枪头分别加入 45 μ L 荧光 PCR 专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同）。
3. 在 6 号管中加入 5 μ L 1 \times 100pg/ μ L 的阳性对照(试剂盒提供),充分震荡 1 分钟，得 1 \times 10pg/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μ L 1 \times 10pg/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟，得 1pg/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头，在 4 号管中加入 5 μ L 1pg/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得),充分震荡 1 分钟，得 100ng/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 重复上面的操作直到得到从 100pg/ μ L 到 1ng/ μ L 共 6 个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备

7. 如果有 N 个样品，最好设置 N+2 个提取，多出的一个是 PC（样品制备阳性对照），一个是 NC（样品制备阴性对照）。可以用 10 μ L 上步所得 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟核酸纯化试剂盒所要求的其实样本体积相同。NC 可以用水替代。本试剂盒跟市场上大多数核酸纯化试剂盒兼容，也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

三、Probe qPCR 反应（20 μ L 体系，在样品制备室进行）

8. 如果做定量分析并且只做 1 次重复，则标记 N+9 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 PCR 阴性对照（用水做模板），6 个用于标准曲线。如果做定性分析并且只做 1 次重复，则标记 N+4 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 PCR 阴性对照（用水做模板），1 个用于 PCR 阳性对照（直接用第 6 步第 4 号管的阳性对照稀释液做模板）。下面只以定量分析为例描述操作步骤。
9. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复。样品管和阴性对照设置完毕后才设置阳性对照，并且阳性对照样品要等所有管子盖上盖子储存好后最后加）：

成分	样品管	PCR 阴性	标准曲线样品管
----	-----	--------	---------

	N+2 个	对照	(1-6 管)
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
巴斯德毕赤酵母细胞 qPCR 引物-探针混合液	各 3 μL	3 μL	各 3 μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 7 μL	不加	不加
超纯水	不加	7 μL	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 7μL (2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 号管…)

10. 盖上盖子后上机, 按下面参数进行 PCR:

过程	温度	时间
预变性	95℃	10 min
PCR 反应 (45 个循环)	94℃	20 sec
	53℃	30 sec(采集 FAM 通道的荧光信号,设置 TAMRA 为淬灭基团)

四、数据处理

11. 以阳性对照浓度的 log 值为横轴, 以 Ct 值为纵轴, 绘制标准曲线。再以待测样品的 Ct 值从标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值, 再通过样品 DNA 浓度的 log 值推算出其浓度。

关联产品

巴斯德毕赤酵母细胞荧光及可视化 LAMP 检测试剂盒