

天
净
沙
系
列

CAT#:15-175
低温运输, -20℃保存

BINGENE

大肠杆菌基因组 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: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点	大肠杆菌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 10 ng/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大肠杆菌基因组 DNA 残留的本产品，它具有下列特点： 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，引物和探针是根据大肠杆菌 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。			
规格及成分		成分	编号	五孔盒包装
		2×Probe qPCR MagicMix	190303	0.5 mL（本色盖）
		荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL（绿盖管）
		超纯水（PCR 级）	210806-1	1 mL（蓝盖管）
		大肠杆菌 qPCR 引物-探针混合液	yp15-175	150 μL（棕盖管）
		大肠杆菌 qPCR 阳性对照 (100pg/μL)	pd175-HJB	50 μL（黄盖管）
		使用手册	15-175sc	1 份
运输及保存	低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。			
自备试剂	样品 DNA。			
使用方法	一、稀释标准曲线样品（以 100pg-0.001pg/μL 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 μL 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 μL $1 \times 100\text{pg}/\mu\text{L}$ 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 $1 \times 10\text{pg}/\mu\text{L}$ 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头, 在 5 号管中加入 5 μL $1 \times 10\text{pg}/\mu\text{L}$ 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 $1\text{pg}/\mu\text{L}$ 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头, 在 4 号管中加入 5 μL $1\text{pg}/\mu\text{L}$ 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 $100\text{ng}/\mu\text{L}$ 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 $100\text{pg}/\mu\text{L}$ 到 $1\text{ng}/\mu\text{L}$ 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 $10\mu\text{L}$ 上步所得 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样, 以此作为 PC。另外用水作为 NC。
8. 用自选方法纯化样品的 DNA, 本试剂盒跟市场上大多数样品 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

三、Probe qPCR 反应 ($20\mu\text{L}$ 体系, 在样品制备室进行)

9. 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。
10. 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 N+2 个	PCR 阴性 对照	标准曲线样品管 (1-6 管)
$2 \times \text{Probe qPCR MagicMix}$	各 $10 \mu\text{L}$	$10 \mu\text{L}$	各 $10 \mu\text{L}$
大肠杆菌菌 qPCR 引物-探针混合液	各 $3 \mu\text{L}$	$3 \mu\text{L}$	各 $3 \mu\text{L}$
N+2 个待测 DNA 样本	各 $7 \mu\text{L}$	不加	不加
超纯水	不加	$7 \mu\text{L}$	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…)											
	11. 盖上盖子后上机, 按下面参数进行 PCR:														
	<table><tr><td>过程</td><td>温度</td><td>时间</td></tr><tr><td>预变性</td><td>95℃</td><td>10 min</td></tr><tr><td rowspan="2">PCR 反应 (45 个循环)</td><td>94℃</td><td>20 sec</td></tr><tr><td>53℃</td><td>30 sec (采集 FAM 通道的荧光信号)</td></tr></table>				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)
	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)													
五、数据处理															
12. 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	大肠杆菌菌荧光及可视化 LAMP 检测试剂盒														