



## E. coli Residue DNA Detection Kit (qPCR)

### E. coli 残留 DNA 检测试剂盒（荧光 PCR 法）

版本号：V230901

货号	规格
A801-10	100 T

货号：A801

保存：-20℃

运输：低温

#### 【产品概述】

E. coli 残留 DNA 检测试剂盒利用 TaqMan 探针法 qPCR，检测各种生物制品及药品的中间品、半成品和成品中的 E. coli 宿主细胞残留 DNA。本试剂盒配套有 E. coli DNA 定量参考品，浓度与国家标准品一致，特异性强、灵敏度高（可检测 fg 级别）、检测快速，可用于 E. coli 宿主细胞残留 DNA 的准确检测。

#### 【产品组分】

组分货号	组分名称	A801-10
ZA801-101	E. coli qPCR Mix (with Primer&Probe)	750 μl×2
ZA801-102	E. coli DNA Control (30ng/μl)	50 μl
ZA801-103	DNA Dilution Buffer	1.5 ml×4

注：本试剂盒不含 ROX 参比染料，若使用的 Real Time PCR 扩增仪需要添加 ROX 参比染料，推荐购买本公司 High & Low ROX Reference Dye (Cat#A322)。本产品适用机型：ABI Prism7000/7300/7700/7900HT/7500 /7500 Fast, ABI Step One/Step One Plus, ABI QuantStudio 系列, Bio-Rad CFX96 系列, Roche LC96/LC 480, Agilent Mx3000P 等。包含但不限于以上机型。

#### 【保存条件】

-20℃保存，避光，保质期 24 个月，避免反复冻融。

#### 【操作步骤】

##### 一、标曲和对照的制备

##### 1. E. coli DNA Control 稀释和标准曲线的制备

用试剂盒中提供的 DNA Dilution Buffer，将 E. coli DNA Control (30ng/μl) 进行 10 倍梯度稀释，稀释浓度依次为 3 ng/μl、300 pg/μl、30 pg/μl、3 pg/μl、300 fg/μl、30 fg/μl。具体操作如下：

- 1) 将试剂盒中的 E. coli DNA Control (30ng/μl) 和 DNA Dilution Buffer 置于冰上，待完全融化后，轻微振荡混匀，瞬时离心 10s。
- 2) 取 6 个干净的 1.5 ml 离心管，分别标记为 ST0、ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。
- 3) 在标记为 ST0 的 1.5 ml 离心管中加入 90 μl DNA Dilution Buffer 和 10 μl E. coli DNA Control (30ng/μl)，即稀释为 3 ng/μl，振荡混匀后瞬时离心 10 s。

注：该浓度稀释液可分装置于-80℃短期保存（≤3 个月），避免反复冻融。

- 4) 在标记为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5 管中分别加入 90 μl DNA Dilution Buffer，按照下表进行梯度稀释：

稀释管编号	稀释比例	终浓度
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

注 1：每个浓度做 3 个复孔，该试剂可测试 30 fg/μl-300 pg/μl 线性范围。如有需要，可适当扩大或缩小线性范围。

注 2：为减少反复冻融次数和避免污染，建议初次使用时将 DNA 定量参考品分装储存于-80℃。

注 3：已融化未使用的 DNA Dilution Buffer 可在 2-8℃下保存 7 天，若长时间不用，请放置于-20℃。



注 4: 为确保模板完全混匀, 每个梯度稀释时需轻微震荡混匀约 15 s。

## 2. 样本加标回收质控 ERC 的制备

根据需要设置 ERC 中的 E.coli DNA 加标浓度(建议加标浓度设置为其样本检测浓度的 2-30 倍), 以制备加 30 pg E.coli DNA 量的样本 ERC 为例, 具体操作如下:

- 1) 取 100  $\mu$ l 待测样本加入 1.5 ml 干净的离心管中, 加入 10  $\mu$ l ST3, 混匀, 标记为样本 ERC。
- 2) 样本 ERC 和同批待测样本一起进行样本前处理, 制备成样本 ERC 纯化液。

## 3. 阴性质控 NCS 的制备

根据实验设置阴性质控, 具体操作如下:

- 1) 取 100  $\mu$ l DNA Dilution Buffer 加入 1.5 ml 干净的离心管中, 标记为阴性质控 NCS。
- 2) 阴性质控 NCS 和同批待测样本一起进行样本前处理, 制备成阴性质控 NCS 纯化液。

## 4. 无模板对照 NTC 的制备

根据实验设置无模板对照 NTC, 具体操作如下:

- 1) 无模板对照 NTC 无需进行样本前处理, 在 qPCR 法检测 DNA 残留量阶段开始配置即可。
- 2) 每管或孔中的 NTC 样本为 15  $\mu$ l E.coli qPCR Mix+5  $\mu$ l DNA Dilution Buffer, 建议配置 3 个重复孔的量。

## 二、qPCR 实验

### 1. qPCR 反应体系的配制

- 1) 根据所要检测的标准曲线及待测样本数量, 计算所需反应孔数, 一般做 3 个重复孔/样:  
反应孔数  $N = (5 \text{ 个浓度梯度的标准曲线} + 1 \text{ 个无模板对照 NTC} + 1 \text{ 个阴性质控 NCS} + \text{待测样本} \times 2) \times 3$   
注: 推荐每个待测样本检测时都应同时做样本 ERC, 因此待测样本  $\times 2$ 。
- 2) 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR Mix 总量:  
E.coli qPCR Mix = (反应孔数 + 2)  $\times$  15  $\mu$ l。(含有 2 孔的损失量)  
注: 反应孔数 + 2 为多配置 2 孔的损失量。
- 3) 各试剂置于冰上融化, 轻微振荡混匀, 然后按下表加样:

反应孔类型	加样示例
标准曲线	15 $\mu$ l E.coli qPCR Mix (with Primer&Probe) + 5 $\mu$ l ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
无模板对照 NTC	15 $\mu$ l E.coli qPCR Mix (with Primer&Probe) + 5 $\mu$ l DNA Dilution Buffer
阴性质控 NCS	15 $\mu$ l E.coli qPCR Mix (with Primer&Probe) + 5 $\mu$ l 阴性质控 NCS 纯化液
待测样本	15 $\mu$ l E.coli qPCR Mix (with Primer&Probe) + 5 $\mu$ l 待测样本纯化液
样本 ERC	15 $\mu$ l E.coli qPCR Mix (with Primer&Probe) + 5 $\mu$ l 样本 ERC 纯化液

注: 加样完成后每孔总体积为 20  $\mu$ l。

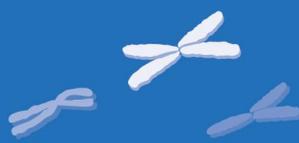
### 2. qPCR 加样 (在样品处理区进行)

- 1) qPCR 96 孔参考板位如下:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC		S1	S1	S1	S1+ERC	S1+ERC	S1+ERC		ST1	ST1	ST1
B	NTC		S2	S2	S2	S2+ERC	S2+ERC	S2+ERC		ST2	ST2	ST2
C	NTC		S3	S3	S3	S3+ERC	S3+ERC	S3+ERC		ST3	ST3	ST3
D			S4	S4	S4	S4+ERC	S4+ERC	S4+ERC		ST4	ST4	ST4
E	NCS		S5	S5	S5	S5+ERC	S5+ERC	S5+ERC		ST5	ST5	ST5
F	NCS											
G	NCS											
H												

注: 上述按照 96 孔板, 检测 5 个浓度梯度 E.coli DNA 标准曲线 (ST1-ST5)、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、5 个待测样本 (S1-S5) 和每个样本的 ERC (S1+ERC-S5+ERC)。每个检测做 3 个重复孔。可根据本身实验需求做调整。

- 2) 将 96 孔板用光学膜进行封板, 轻微振荡混匀, 瞬时离心 10 s 进行 qPCR 上机检测。



### 3. qPCR 扩增（在扩增与分析区进行）

扩增程序参数设置（以 ABI 7500 qPCR 仪、软件版本 2.0 为例）

- 1) 创建空白程序，选择绝对定量检测模板。
- 2) 创建 1 个检测探针，命名为“E.coli-DNA”，选择报告荧光基团为“FAM”，猝灭荧光基为“none”，检测参比荧光为“none”。
- 3) 在“Assign target (s) to the selected wells”面板中，将标准曲线孔的“Task”一栏设置为“Standard”，并且在“Quantity”一栏分别赋值为“300000”、“30000”、“3000”、“300”、“30”（含义为每孔的 DNA 浓度，单位为 fg/μl），并且在相应的“sample name”一栏中命名为“300 pg/μl”、“30 pg/μl”、“3 pg/μl”、“300 fg/μl”、“30 fg/μl”。
- 4) 将无模板对照 NTC 孔的“Task”一栏设置为“NTC”。
- 5) 将阴性质控 NCS 孔、待测样本孔、样本加标回收 ERC 孔的“Task”一栏设置为“Unknown”，并且在相应的“Sample Name”一栏中分别命名为“NCS”、“S”、“ERC”，之后点击“Start Run”，开始仪器运行。
- 6) 设置两步法反应程序，设置反应体系 20 μl。

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	2min	1
变性	95°C	15s	40
退火延伸（收集荧光）	60°C	40s	

## 三：结果分析

### 1. qPCR 结果分析

- 1) 在“Analysis”的“Amplification Plot”面板中，系统会自动给出 Threshold（阈值），有时系统给出的 Threshold 离基线太近，导致复孔之间 Ct 值相差甚远，可手动调节 Threshold 至合适位置，点击“Analyze”。此时可在“Multicomponent Plot”初步查看扩增曲线的形态是否正常。
- 2) 在“Analysis”的“View well table”面板中，可读取标准曲线的 R<sup>2</sup>、扩增效率（Eff%）、斜率（Slope）、截距（Intercept）等。正常的标曲：R<sup>2</sup>>0.99；扩增效率在 85%≤Eff%≤115% 范围内；Slope 在 3.4 左右。
- 3) 在“Analysis”的“View well table”面板中，“Quantity”一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样本 S、样本 ERC 的检测值，单位为 fg/μl，后续可在检测报告中将单位换算成 pg/μl。
- 4) 阴性质控 NCS 的 Ct 值应大于标曲最低浓度 Ct 值，无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undermined 或 Ct 值>36。

### 2. 测试样品结果计算

#### 1) 加标样本回收率计算

加标样本经过与待测样本同法处理后，根据 PCR 的标准曲线方程及加标样本的 Ct 值，计算加标样本的 DNA 含量，根据加标量，计算加标回收率，加标样本回收率要求在 50%-150% 之间。

$$\text{加标样本回收率}\% = \frac{(\text{样本 ERC 浓度 pg}/\mu\text{l} - \text{样本浓度 pg}/\mu\text{l}) \times \text{洗脱体积}\mu\text{l}}{\text{加标量 pg}} \%$$

#### 2) 样本 DNA 残留量计算

$$\text{外源性 DNA 残留量 (pg/mg)} = \frac{\text{稀释倍数} \times \text{检测样本浓度 pg}/\mu\text{l} \times \text{样本前处理洗脱体积}\mu\text{l}}{\text{样本蛋白浓度 mg/ml} \times \text{样本前处理加样体积 ml}}$$

#### 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任，仅限于此产品的价值本身。

北京康润诚业生物科技有限公司 北京市昌平区中关村生命科学园生命园路8号院一区9号楼A座5层 102206