

# *E.coli* DNA 残留片段分析试剂盒 (PCR-荧光探针法) 说明书

## 产品简介

*E.coli* DNA残留片段分析试剂盒采用qPCR荧光探针法原理，用于定量检测生物制品中残留的大肠杆菌DNA。适用的生物制品类型包括核酸、细胞、细胞培养上清、质粒收获液、蛋白制品等。

本试剂盒通过对目标物种设计特异性引物和探针，结合荧光探针 qPCR 检测技术，实现定量检测。试剂盒经完整性能验证，达到专一且快速检测 *E.coli* 残留 DNA 片段分析的目的。

## 试剂盒组分

表 1 试剂盒组分

| 组分                              | 3*30 反应装量                 | 3*100 反应装量                |
|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| E.coli DNA 定量标准品                | 10 $\mu$ L $\times$ 1 管   | 50 $\mu$ L $\times$ 1 管   |
| qPCR Reaction Mix               | 1125 $\mu$ L $\times$ 1 管 | 1250 $\mu$ L $\times$ 3 管 |
| E.coli DNA Primer&Probe MIX-103 | 30 $\mu$ L $\times$ 1 管   | 100 $\mu$ L $\times$ 1 管  |
| E.coli DNA Primer&Probe MIX-203 | 30 $\mu$ L $\times$ 1 管   | 100 $\mu$ L $\times$ 1 管  |
| E.coli DNA Primer&Probe MIX-343 | 30 $\mu$ L $\times$ 1 管   | 100 $\mu$ L $\times$ 1 管  |
| D-IPC Mix                       | 90 $\mu$ L $\times$ 1 管   | 300 $\mu$ L $\times$ 1 管  |
| 50 $\times$ ROX Low             | 45 $\mu$ L $\times$ 1 管   | 150 $\mu$ L $\times$ 1 管  |
| 50 $\times$ ROX High            | 45 $\mu$ L $\times$ 1 管   | 150 $\mu$ L $\times$ 1 管  |
| DNA 稀释液                         | 1800 $\mu$ L $\times$ 1 管 | 1800 $\mu$ L $\times$ 4 管 |

## 包装与规格

货号 10903010 3\*30 反应/盒

货号 10903009 3\*100 反应/盒

## 储存条件及有效期

储存条件：-20°C±5°C避光保存。

有效期：12 个月。

试剂盒反复冻融5次内有效。

## 适配机型（包括但不限于）

- Thermo Scientific: ABI 7500 Real-Time PCR System (ROX Low)
- ABI Quant Studio 6 (ROX High)
- 杭州博日科技: FQD-96A (No ROX)

## 需要额外准备的耗材与设备

实验前请准备好下列耗材与设备：

- 1.5ml 或 2mL 无菌低吸附离心管
- 与 PCR 仪适配的 96 孔 qPCR 板或八联排管
- 1000µl, 200µl, 10µl 无菌低吸附带滤芯枪头
- 荧光定量 PCR 仪
- 离心机
- 震荡器
- 各规格移液器（如 1000µl, 200µl, 10µl, 2.5µl 等）

## 实验操作流程

### 1. *E.coli* DNA 定量标准品稀释和标准曲线制备

使用试剂盒中的 DNA 稀释液将 *E.coli* DNA 定量标准品进行梯度稀释，具体操作如下：

- 1) 将试剂盒中的 *E.coli* DNA 和 DNA 稀释液置于冰上或 2-8°C 条件下融化，待完全融化后，轻微振荡混匀，快速离心 10 sec。
- 2) 取 6 支洁净的 1.5 mL 离心管，分别标记为 ST0、ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。

- 3) 在 ST0 管中取 6 $\mu$ L *E.coli* DNA 定量标准品加 14 $\mu$ L DNA 稀释液稀释至 3ng/ $\mu$ L, 得到 ST0, 振荡混匀后快速离心 3~5 sec, 重复 3 次以确保定量标准品与 DNA 稀释液充分混匀。
- 4) 在 ST1, ST2, ST3, ST4, ST5 管中分别加入 180  $\mu$ L DNA 稀释液。
- 5) 按表 2 依次进行 5 次稀释操作, 每次稀释后重复震荡离心 3 次, 确保充分混匀后再进行下一个梯度的稀释。

表 2 标准品梯度稀释

| 稀释管 | 稀释体积                                 | 终浓度 (pg/ $\mu$ L) |
|-----|--------------------------------------|-------------------|
| ST1 | 20 $\mu$ L ST0 + 180 $\mu$ L DNA 稀释液 | 300               |
| ST2 | 20 $\mu$ L ST1 + 180 $\mu$ L DNA 稀释液 | 30                |
| ST3 | 20 $\mu$ L ST2 + 180 $\mu$ L DNA 稀释液 | 3                 |
| ST4 | 20 $\mu$ L ST3 + 180 $\mu$ L DNA 稀释液 | 0.3               |
| ST5 | 20 $\mu$ L ST4 + 180 $\mu$ L DNA 稀释液 | 0.03              |

- ✚ 每个浓度做 3 个复孔, 标准曲线浓度梯度可根据实际验证结果选择, 应至少有 5 个浓度梯度。
- ✚ 为减少反复冻融次数和避免污染, 建议初次使用时将 *E.coli* DNA 定量标准品分装储存于 -20 $^{\circ}$ C $\pm$ 5 $^{\circ}$ C。
- ✚ 标准品的稀释应在每次实验前重新制备, 不可使用前一次或前一日制备的标准品。
- ✚ 已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于 2-8 $^{\circ}$ C 7 天, 若长时间不用, 请放置于 -20 $^{\circ}$ C $\pm$ 5 $^{\circ}$ C。

## 2. 待测样本 S 的制备

根据实验设置待测样本 S, 具体操作如下:

- 1) 取 100  $\mu$ L 待测样本加入 1.5 mL 洁净的离心管中, 标记为 S, 进行样本前处理, 制备待测样本 S 纯化液。
  - 2) 建议设置加标样品 (ERC), 与待测样品进行同步处理, 作为回收率考察。
- ✚ 一般建议样品加标量设置为样品 *E.coli* DNA 实际残留量的 2-10 倍。若样品 *E.coli* DNA 实际残留量低于本试剂盒的定量限, 加标量应设置在定量限范围之内, 保证检测结果的准确性。

### 3. 阴性质控 NCS 的制备

根据实验设置阴性抽提质控 NCS，具体操作如下：

- 1) 取 100  $\mu\text{L}$  样本基质溶液（或 DNA 稀释液）加入 1.5 mL 洁净的离心管中，标记为 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. 反应体系混合液（qPCR MIX）的准备

- 1) 根据所要检测的标准曲线及待测样品数量，计算所需反应孔数，一般做 3 个重复孔/样。

反应孔数 = (5 个浓度梯度的标准曲线 + 1 个无模板对照 NTC + 1 个阴性质控 NCS + 待测样品数)  $\times$  3

- 2) 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR 反应液总量（含有 2 孔的损失量）：

qPCR MIX = (反应孔数 + 2)  $\times$  15  $\mu\text{L}$

- 3) 各试剂放在冰上或 2-8 $^{\circ}\text{C}$  条件下充分融化后，轻微震荡混匀，参照表 3、表 4、表 5 所示配制反应 MIX。

表 3 qRT-PCR MIX-103 配制表

| 组分                                     | 单孔反应 ( $\mu\text{L}$ ) |
|--|------------------------|
| qPCR Reaction Mix                      | 12.5                   |
| <i>E.coli</i> DNA Primer&Probe MIX-103 | 1                      |
| D-IPC Mix                              | 1                      |
| ROX                                    | 0.5                    |
| 总体积                                    | 15                     |

表 4 qRT-PCR MIX-203 配制表

| 组分                                     | 单孔反应 ( $\mu\text{L}$ ) |
|--|------------------------|
| qPCR Reaction Mix                      | 12.5                   |
| <i>E.coli</i> DNA Primer&Probe MIX-203 | 1                      |
| D-IPC Mix                              | 1                      |
| ROX                                    | 0.5                    |

|     |    |
|-----|----|
| 总体积 | 15 |
|-----|----|

表 5 qRT-PCR MIX-343 配制表

| 组分                                     | 单孔反应 (μL) |
|--|-----------|
| qPCR Reaction Mix                      | 12.5      |
| <i>E.coli</i> DNA Primer&Probe MIX-343 | 1         |
| D-IPC Mix                              | 1         |
| ROX                                    | 0.5       |
| 总体积                                    | 15        |

✚ 为满足同步进行三种扩增片段检测, DNA 模板需 $\geq 100\mu\text{l}$ , 建议每个样品同时准备 2 管进行前处理, 提取完成后混匀使用。

## 5. 加样

1) 上述各试剂置于冰上融化, 轻微振荡混匀, 按照表 6、表 7、表 8 所示加样:

表 6 MIX-103 各反应孔加样示例

|      |  |
|------|--|
| 标准曲线 | 15 μL qPCR MIX-103+10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5 |
| NTC  | 15 μL qPCR MIX-103+10 μL DNA 稀释液             |
| NCS  | 15 μL qPCR MIX-103+10 μL NCS 纯化液             |
| 待测样品 | 15 μL qPCR MIX-103+10 μL 待测样品纯化液             |

表 7 MIX-203 各反应孔加样示例

|      |  |
|------|--|
| 标准曲线 | 15 μL qPCR MIX-203+10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5 |
| NTC  | 15 μL qPCR MIX-203+10 μL DNA 稀释液             |
| NCS  | 15 μL qPCR MIX-203+10 μL NCS 纯化液             |
| 待测样品 | 15 μL qPCR MIX-203+10 μL 待测样品纯化液             |

表 8 MIX-343 各反应孔加样示例

|      |  |
|------|--|
| 标准曲线 | 15 μL qPCR MIX-343+10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5 |
| NTC  | 15 μL qPCR MIX-343+10 μL DNA 稀释液             |
| NCS  | 15 μL qPCR MIX-343+10 μL NCS 纯化液             |

|      |  |
|------|--|
| 待测样品 | 15 $\mu$ L qPCR MIX-343+10 $\mu$ L 待测样品纯化液 |
|------|--|

加样完成后每孔总体积为 25  $\mu$ L。

表 9 96 孔板排版示例

|   | MIX-103 |     |     | MIX-203 |     |     | MIX-343 |     |     |
|---|---------|-----|-----|---------|-----|-----|---------|-----|-----|
|   | 1       | 2   | 3   | 4       | 5   | 6   | 7       | 8   | 9   |
| A | ST1     | ST1 | ST1 | ST1     | ST1 | ST1 | ST1     | ST1 | ST1 |
| B | ST2     | ST2 | ST2 | ST2     | ST2 | ST2 | ST2     | ST2 | ST2 |
| C | ST3     | ST3 | ST3 | ST3     | ST3 | ST3 | ST3     | ST3 | ST3 |
| D | ST4     | ST4 | ST4 | ST4     | ST4 | ST4 | ST4     | ST4 | ST4 |
| E | ST5     | ST5 | ST5 | ST5     | ST5 | ST5 | ST5     | ST5 | ST5 |
| F | S       | S   | S   | S       | S   | S   | S       | S   | S   |
| G | NCS     | NCS | NCS | NCS     | NCS | NCS | NCS     | NCS | NCS |
| H | NTC     | NTC | NTC | NTC     | NTC | NTC | NTC     | NTC | NTC |

该示例表示的是 5 个浓度梯度的标准曲线 (ST1~5)、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、1 个待测样品(S)。每个检测做 3 个重复孔。其中 1~3 列为 qPCR MIX-103, 4~6 列为 qPCR MIX-203, 7~9 列为 qPCR MIX-343。

 实际检测时可根据样品多少, 参照此示例进行 96 孔板排版加样。

- 1) 加样完成后, 将 96 孔板用光学膜封闭, 轻微震荡混匀, 短时间快速离心 10 sec 后放入 qPCR 仪, 如有气泡, 需将气泡排尽。

## 6. 扩增程序参数设置

以 ABI 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 2.3 为例

- 1) 创建空白新程序, 选择绝对定量检测模板。

创建新检测探针, 分别命名为 103、203、343, 选择报告荧光基团为“FAM”, 猝灭荧光基团为 none; 创建新检测探针, 命名为 DNA IPC, 选择报告荧光基团为 VIC, 猝灭荧光基团为 none; 检测参比荧光为 ROX (可选,参比荧光可根据仪器型号等情况, 选择是否需要添加)。

| Define Targets |                  |             |               |
|----------------|------------------|-------------|---------------|
| Add New Target | Add Saved Target | Save Target | Delete Target |
| Target Name    | Reporter         | Quencher    | Colour        |
| 103            | FAM              | None        | Blue          |
| 203            | FAM              | None        | Blue          |
| 343            | FAM              | None        | Yellow        |
| DIPC           | VIC              | None        | Pink          |

- 2) 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“300”、“30”、“3”、“0.3”、“0.03”（含义为每孔的 DNA 浓度，单位为  $\text{pg}/\mu\text{L}$ ），并且在相应的“Sample Name”一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。
- 3) 将无模板对照 NTC 孔的“Task”一栏设置为“NTC”；将阴性质控 NCS 孔、待测样本 S 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”。
- 4) 扩增程序设置：设置两步法扩增程序，反应体积  $25 \mu\text{L}$ 。

表 10 qPCR 扩增程序

| 循环步骤   | 温度 ( $^{\circ}\text{C}$ ) | 时间          | 循环数 |
|--------|---------------------------|-------------|-----|
| UDG 消化 | 37                        | 2 min       | 1   |
| 预变性    | 95                        | 2 min       | 1   |
| 扩增     | 95                        | 9 sec       | 45  |
|        | 60                        | 30 sec (采光) |     |

- 5) 之后点击“Start Run”，开始仪器运行。

## 7. qPCR 结果分析

- 1) 在“Analysis”的“Amplification Plot”面板中，系统会自动给出“Threshold”，有时系统给出的“Threshold”离基线太近，导致复孔之间 Ct 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“Standard Curve”面板中，可读取标准曲线的  $R^2$ 、扩增效率 (Eff%)、斜率 (Slope)、截距 (Intercept) 等。正常的标曲： $R^2 > 0.99$ ，扩增效率在  $90\% \leq \text{Eff}\% \leq 110\%$  范围内，Slope 在  $-3.8 \sim -3.1$ 。

- 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 的检测值，单位为 pg/ $\mu$ L，后续可在检测报告中  
进行单位换算。
- 4) 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。
- 5) 分析 IPC 的 Ct 值，正常情况下样品 Ct-IPC 值应在 NCS Ct-IPC 值 $\pm$ 1.0 范围内。若  
样品 Ct-IPC 值与 NCS Ct-IPC 值相比明显增大，则表明样品可能有抑制。如同时测  
试加标样品，则优先考虑样品回收率结果，IPC 结果作为参考。
- 6) 阴性质控 NCS 的 Ct 值应大于标曲最低浓度 Ct 的均值。
- 7) 无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undetermined 或大于标准曲线最低浓度点 2 个  
Ct 值以上。

## 注意事项

1. 本产品仅作科研用途，不用于临床诊断。
2. 本试剂盒需在有效期内使用。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
4. 注意在不同加样步骤间及时更换吸头、避免交叉污染，避免长时开盖。
5. 使用本试剂前请仔细阅读本说明书，实验应规范操作，包括样本处理、反应体系的配制  
及加样。
6. 试剂盒内所有组分建议在低温环境融化后使用，且使用前每个组分请上下颠倒轻轻混匀，  
尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。
7. 避免反复冻融本品，反复冻融可能使产品性能下降。
8. 本产品长期保存可置于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 避光保存。如果在短期内需要频繁使用，可在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 保  
存。

### 【基本信息】

生产企业名称：北京阅微基因技术股份有限公司

住所：北京市海淀区三里河路 17 号 10 层 1005 至 1010

售后服务单位名称：北京阅微基因技术股份有限公司

生产地址：北京市昌平区中关村科技园区白浮泉北街 1 号院 1 号楼-1 至 6 层 101 三层及六  
层 601