

毕赤酵母残留 DNA 检测试剂盒
(PCR-荧光探针法)
说明书

货号：SK030205P100

版本：B/0

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 试剂盒简介

毕赤酵母残留 DNA 检测试剂盒用于定量检测各种生物制品及药品的中间品、半成品和成品中毕赤酵母宿主细胞 DNA 的专用试剂盒。

本试剂盒利用荧光探针原理，定量检测样品中毕赤酵母残留 DNA。检测快速，专一性强，性能可靠，最低检测限可以达到 fg 级别。试剂盒配套有毕赤酵母 DNA 定量参考品。本试剂盒与 SHENTEK™ 宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒配套使用，可准确定量样品中残留的微量毕赤酵母细胞 DNA。

■ 试剂盒组分

表 1.试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
毕赤酵母 DNA 定量参考品	NNA007	50 μ L×1 管	-18°C及以下
毕赤酵母 qPCR Reaction Buffer	NNB005	850 μ L×2 管	-18°C及以下，避光
毕赤酵母 Primer&Probe MIX	NNC041	300 μ L×1 管	-18°C及以下，避光
DNA 稀释液	NND001	1.5 mL×3 管	-18°C及以下

■ 规格

100 Reactions。

■ 有效期

规定储存条件下 24 个月，具体详见试剂盒标签。

■ 适用机型（包括但不限于）

- SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统
- 7500 Real-Time PCR System
- StepOne Plus Real-Time PCR System
- CFX96 定量 PCR 系统
- Linegene 9600plus 定量 PCR 系统

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 1.5 mL 无菌离心管
- 96 孔 qPCR 板

➤ 1000 μL , 100 μL , 10 μL 无菌低吸附带滤芯枪头

➤ DNase 及缓冲液

■ 相关设备

➤ 荧光定量 PCR 仪

➤ 1000 μL , 100 μL , 10 μL 移液枪

■ 操作过程

❖ 毕赤酵母 DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

毕赤酵母 DNA 定量参考品浓度标注于管壁标签上, 请确认浓度后再进行稀释。

用试剂盒中提供的 DNA 稀释液将 DNA 定量参考品进行梯度稀释, 稀释浓度依次为 3 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 、300 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 、30 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 、3 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 、300 $\text{fg}/\mu\text{L}$, 30 $\text{fg}/\mu\text{L}$ 。具体操作如下:

1. 将试剂盒中的 DNA 定量参考品和 DNA 稀释液置于冰上或 2-8°C 条件下融化, 待完全融化后, 轻弹数下混匀, 短时间快速离心 3~5 s, 如此重复 3 次。
2. 取 6 支干净的 1.5 mL 离心管, 分别标记为 ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5。
3. 在 ST0 管中用 DNA 稀释液将 DNA 定量参考品稀释至 3 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 振荡混匀后短时间快速离心 3~5 s, 重复 3 次以确保定量参考品与 DNA 稀释液充分混匀。
4. 在 ST1, ST2, ST3, ST4, ST5 管中分别加入 90 μL DNA 稀释液。
5. 按表 2 依次进行 5 次稀释操作。

表 2. 毕赤酵母 DNA 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度
ST1	10 μL ST0+90 μL DNA 稀释液	300 $\text{pg}/\mu\text{L}$
ST2	10 μL ST1+90 μL DNA 稀释液	30 $\text{pg}/\mu\text{L}$
ST3	10 μL ST2+90 μL DNA 稀释液	3 $\text{pg}/\mu\text{L}$
ST4	10 μL ST3+90 μL DNA 稀释液	300 $\text{fg}/\mu\text{L}$
ST5	10 μL ST4+90 μL DNA 稀释液	30 $\text{fg}/\mu\text{L}$

✚ 已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于 2-8°C。

✚ 若 DNA 稀释液中有析出, 建议于 37°C 条件下进行孵育。

✚ 标准曲线浓度点可根据实际验证结果选择, 应至少有 5 个浓度点。

❖ 加样回收质控 ERC 的制备

根据需要设置 ERC 中的毕赤酵母 DNA 加样浓度（以制备加 30 pg 毕赤酵母 DNA 量的样品 ERC 为例），具体操作如下：

1. 取 100 μL 待测样品加入 1.5 mL 干净的离心管中。
2. 再加入 10 μL ST3，混匀，标记为样品 ERC。

✚ 样品 ERC 和同批待测样品一起进行样品前处理，制备成样品 ERC 纯化液。

❖ 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 μL DNA 稀释液加入 1.5 mL 干净的离心管中；
2. 标记为阴性质控 NCS。

✚ 阴性质控 NCS 和同批待测样品一起进行样品前处理，制备成阴性质控 NCS 纯化液。

❖ qPCR 反应液（qPCR MIX）的准备和加样

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 $\times 2$ ） $\times 3$

✚ 待测样品 $\times 2$ 是因为我们推荐每个待测样品检测时都应同时做样品 ERC。

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

$$\text{qPCR MIX} = (\text{反应孔数} + 2) \times 20 \mu\text{L}$$

3. 各试剂放在冰上或 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下融化，并根据表 3 所示准备 qPCR MIX：

表 3. qPCR MIX 配制表

组份	单孔反应
qPCR Reaction Buffer	17 μL
毕赤酵母 Primer&Probe MIX	3 μL
总体积	20 μL

4. 上述各试剂置于冰上，轻微震荡混匀，按表 4 所示加样：

表 4.各反应孔加样示例

标准曲线	20 μL qPCR MIX + 10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ ST5
NTC	20 μL qPCR MIX + 10 μL DNA 稀释液
NCS	20 μL qPCR MIX + 10 μL 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 μL qPCR MIX + 10 μL 待测样品纯化液
样品 ERC	20 μL qPCR MIX + 10 μL 样品 ERC 纯化液

✚ 加样完成后每孔总体积为 30 μL。

表 5. 96 孔板排版示例

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

✚ 该示例表示的是检测 5 个浓度梯度的 DNA 标准曲线 (ST1~ST5)、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、5 个待测样品 (S1~S5) 和每个样品的 ERC (S1 ERC~S5 ERC)。每个检测做 3 个重复孔。

✚ 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。

5. 将 96 孔板用光学膜封闭, 轻微震荡混匀, 短时间快速离心 10 s 后放入 qPCR 仪。

❖ **qPCR 程序设置**

◇ SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例。

1. 点击“实验向导”。

2. “孔板编辑”页面中选择检测样品反应孔, 选择步骤 2 项目中的“毕赤酵母残留 DNA”程序;

3. “实验运行”页面中点击“开始”运行程序。

◇ 其他定量 PCR 系统程序设置如下:


1. 创建空白新程序，选择绝对定量检测模板。
2. 创建新检测探针，命名为 Pichia-DNA，选择报告荧光基团为 FAM，猝灭荧光基团为 none，检测参比荧光为 ROX（可选）。
3. 设置两步法反应程序：**95°C 预变性 10 min；95°C 15 s，60°C 1 min（读取荧光），40 个循环；**反应体积 30 μL 。

❖ qPCR 结果分析

✧ 以 SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例。

1. “孔板编辑”页面中步骤 3：定义反应孔，将标准曲线孔的选择样品类型设置为标准品，并在标品赋值中分别根据表 2 赋值，“毕赤酵母残留 DNA”分别设为 300、30、3、0.3、0.03，并且在相应的“样本名称”中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。

2. 待测样品将样品类型设置为待测样品，NTC 将样品类型设置为无模板对照。


3. 在“实验分析”页面点击 ，可读取标准曲线的斜率、截距、相关系数、扩增效率。

4. 在“反应孔信息表中”可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品的检测值，单位为 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 。

✧ 以 7500 Real-Time PCR System、软件版本 1.4 为例。


1. 在 Results 的 Amplification Plot 面板中，将 Threshold 设置为 0.02，点击 Analyze，此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常。

2. 在 Results 的 Plate 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 3000、300、30、3、0.3（含义为每孔的 DNA 总量，单位为 pg ），并且在相应的 sample name 一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。

3. 在 Results 的 Plate 面板中，将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC，将阴性质控 NCS 孔、待测样品孔、样品 ERC 孔的 Task 一栏设置为 Unknown，并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 NTC、NCS、S、ERC，之后点击 。

4. 在 Results 的 Standard Curve 面板中，可读取标准曲线的斜率（Slope）、截距（Intercept）、 R^2 。

5. 在 Results 的 Report 面板中，Mean Quantity 一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品、样品 ERC 的检测值，单位为 $\text{pg}/10 \mu\text{L}$ 。后续可在检测报告中将单位换算为 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 或 pg/mL 。

 根据待测样品和样品 ERC 的检测结果计算加样回收率，加样回收率要求在 50%~

150%之间。

✚ 阴性质控 NCS 的 Ct 均值应大于标曲最低浓度 Ct 均值。

✚ 无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值 \geq 35, 或根据实验室自身验证结果设定具体标准。

✚ 上述示例结果分析的参数设置仅供参考, 具体需依据实验室机型及使用的软件版本进行设定, 一般也可由仪器自动判读。

修订日期: 2023 年 01 月 16 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址: 浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话: 0572-2165910