

酿酒酵母残留 DNA 检测试剂盒

(PCR-荧光探针法)

说明书

货号：1101103

在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意点！

版本：A/2

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 试剂盒简介

酿酒酵母残留 DNA 检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 用于定量检测各种生物制品及药品的中间品、半成品和成品中酿酒酵母宿主细胞 DNA 的专用试剂盒。

本试剂盒利用荧光探针原理, 定量检测样品中酿酒酵母残留 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。试剂盒配套有酿酒酵母 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酿酒酵母细胞 DNA。

该试剂盒仅供研究使用, 不可用于临床。

■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
酿酒酵母 DNA 定量参考品	NNA009	50 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下
酿酒酵母 Primer&Probe MIX	NNC039	300 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下, 避光
酿酒酵母 qPCR Reaction Buffer	NNB006	850 μ L \times 2 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下, 避光
DNA 稀释液	NND001	1.5 mL \times 3 管	-18 $^{\circ}$ 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 9600 定量 PCR 系统
- Mx3000PTM 定量 PCR 系统

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 1.5 mL 无菌低吸附离心管
- 96 孔 qPCR 板

➤ 1000 μL, 100 μL, 10 μL 无菌低吸附带滤芯枪头

■ 相关设备

➤ 1000 μL, 100 μL, 10 μL 移液枪

■ 实验操作流程

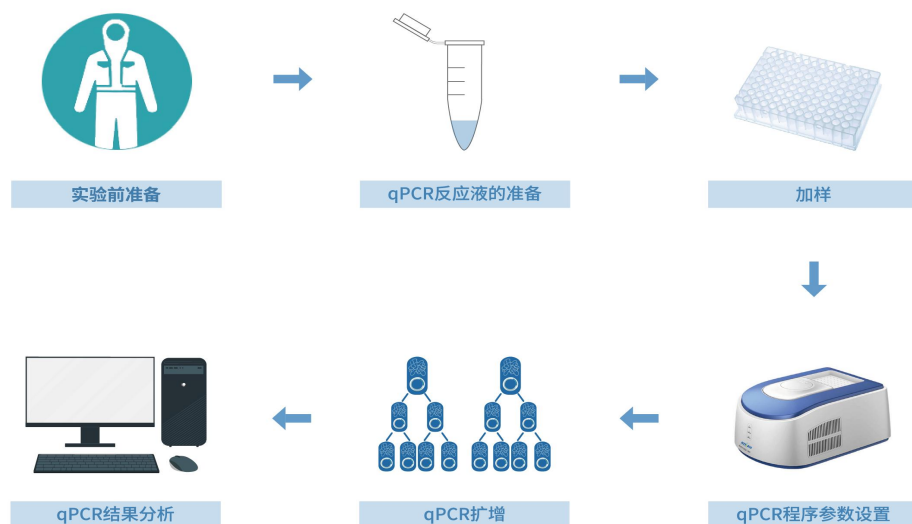


图 1 操作流程示意图

一、试剂、仪器准备

(一) 实验前准备:

1. 穿戴无 DNA 污染的工作服、一次性乳胶手套、一次性无纺布帽子。
2. 工作台面、移液枪及离心管架紫外照射 30 分钟，喷洒 75%酒精并擦干。
3. 将试剂盒从冰箱-18 °C以下区域转移至 **2-8 °C区域或冰上融化**，涡旋振荡混匀并瞬时离心。

(二) qPCR 反应液准备:

1. 反应孔数计算：根据检测样品的数量，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）×3

2. MIX 总量计算：根据反应孔数计算所需 MIX 总量。

MIX 总量 = (反应孔数+2) × 20 μL (含有 2 孔的损失量)

3. qPCR MIX 配制: 根据表 2 配制表准备各试剂 qPCR MIX 用量。

表 2. qPCR MIX 配制表

组分	单孔用量
酿酒酵母 qPCR Reaction Buffer	17 μL
酿酒酵母 Primer&Probe MIX	3 μL
总体积	20 μL

二、样品准备

● 酿酒酵母 DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

酿酒酵母 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 稀释液将定量参考品进行稀释, 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 秒, 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 ng/μL, 振荡混匀后短时间快速离心 3-5 秒, 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 3 依次进行 5 次稀释操作。

表 3. 酿酒酵母 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 pg/μL
ST2	10 μL ST1 + 90 μL DNA 稀释液	30 pg/μL
ST3	10 μL ST2 + 90 μL DNA 稀释液	3 pg/μL
ST4	10 μL ST3 + 90 μL DNA 稀释液	300 fg/μL
ST5	10 μL ST4 + 90 μL DNA 稀释液	30 fg/μL

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。

●加标回收（ERC）

根据需要设置 ERC 中的酿酒酵母 DNA 加样浓度（以制备加 30pg 酿酒酵母 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。

备注：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。

●阴性对照（NCS）

1. 取 100 μL DNA 稀释液加入 1.5 mL 干净的离心管中，标记为阴性质控 NCS。

备注：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。

三、操作步骤

（一）加样

1. 各试剂置于冰上，轻微振荡混匀，按表 4 和表 5 所示加样：

表 4.各反应孔加样示例

各样品	加样量
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

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。

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

（二）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”页面中选择步骤 1：选择反应孔。
3. 选择步骤 2：选择项目中的“酿酒酵母残留 DNA”程序。
4. “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 Sac-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 分钟；

95 °C 15 秒，60 °C 1 分钟（读取荧光），40 个循环；反应体积 30μL。

四、结果计算与判断

（一）结果计算

- 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 3 赋值，例如“酿酒酵母残留 DNA”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 pg/μL。
- 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 pg/10μL。后续可在检测报告中将单位换算为 pg/μL 或 pg/mL。

（二）结果判断

1. 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。
 2. 阴性质控 NCS 的 Ct 均值应大于标曲最低浓度 Ct 均值，若经验证的定量限浓度低于标曲最低浓度，则 NCS 的检测值应小于定量限浓度。
 3. 无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值 ≥ 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 07 月 11 日

生效日期：2023 年 07 月 14 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