

■ 简介

锦博生物E.coli宿主细胞残留DNA检测试剂盒利用TaqMan荧光探针的qPCR检测原理对重组蛋白、抗体、疫苗等生物制品中E.coli细胞残留DNA进行定量测定，检测快速，专一性强。

本检测方法可溯源至中国药典方法，通则<3407>。

■ 试剂盒组分

表1. E.coli细胞残留DNA检测试剂盒组份

名称	规格	支数	储存条件
E.coli DNA Positive Control	30ng/μl, 50μl	1	-25°C~-15°C
Compound of primers and probes	0.5ml	1	-25°C~-15°C, 避光
qPCR Master Mix	1.5ml	1	-25°C~-15°C, 避光
DNA Dilution Buffer	1.5ml	3	-25°C~-15°C

本试剂盒规格：100 reactions.

有效期：规定储存条件下24个月。

运输和储存：长时间储存请放置在-20°C，运输过程中请放置在干冰或冰袋中。

操作步骤：

■ E. coli DNA阳性对照标准曲线样品的制备

E.coli DNA阳性对照品浓度标注于管壁标签上，确认实际浓度后再进行稀释。用试剂盒中提供的DNA稀释液将E.coli DNA阳性对照品进行梯度稀释，稀释浓度依次为3000pg/μl、300pg/μl、30pg/μl、3pg/μl、0.3pg/μl、0.03pg/μl。

具体操作如下：

1. 将试剂盒中的E.coli DNA阳性对照品和DNA稀释液从-20°C取出后置于冰上融化，待完全融化后，轻微振荡混匀，快速离心2~5秒。
2. 取6支低吸附离心管，分别标记为ST0、ST1、ST2、ST3、ST4和ST5。按下表准备E.coli DNA标准样品，每步稀释后各管均用旋涡混合器混匀，快速离心2~5秒，再进行下一个梯度稀释，标准样品稀释完后2~8°C保存，现配现用。

表2. E.coli DNA阳性对照品的稀释

稀释管	稀释步骤	浓度 (pg/μl)
ST0	10μl DNA阳性对照品 + 90μl DNA稀释液	3000
ST1	10μl ST0 + 90μl DNA稀释液	300
ST2	10μl ST1 + 90μl DNA稀释液	30
ST3	10μl ST2 + 90μl DNA稀释液	3
ST4	10μl ST3 + 90μl DNA稀释液	0.3
ST5	10μl ST4 + 90μl DNA稀释液	0.03

已融化未使用的DNA稀释液可暂存于2-8°C

■ 加样回收质控ERC的制备

根据需要设置ERC中的E.coli DNA加标量（建议加标量设定为其样品历史无加标测试值的2~30倍），以制备加30pg E.coli DNA量的供试品ERC为例，具体操作如下：

1. 取100μl供试品加入1.5ml低吸附离心管中。
2. 加入10μl ST3，混匀，标记为供试品ERC。
3. 样本ERC与同批供试品一起进行前处理，制备成供试品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100μl供试品基质溶液（或DNA稀释液）加入1.5ml低吸附离心管中标记为阴性质控NCS。

阴性质控NCS和同批供试品一起进行前处理，制备成阴性质控NCS纯化液。

■ qPCR反应体系

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。

反应孔数=（5个浓度梯度的标准曲线样品+1个空白对照BLK+1个阴性质控NCS+供试品+供试品ERC）×3；

2. 根据反应孔数计算本次所需的Compound of primers and probes及qPCR Master Mix的总量：
Compound of primers and probes =（反应孔数+2）×5μl（含有2孔的损失量）
qPCR Master Mix =（反应孔数+2）×15μl（含有2孔的损失量）

3. 各试剂置于室温融化后，根据上一步所计算的引物与Mix的量配置所需要的反应混合液，轻微振荡混匀，然后按下表所示加样：

表3. 各反应孔加样示例

标准曲线	20μl反应混合液 + 10μl ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
BLK	20μl反应混合液+ 10μl DNA稀释液
NCS	20μl反应混合液 + 10μl NCS纯化液
供试品SAM	20μl反应混合液 + 10μl DNA待测样本纯化液
供试品ERC	20μl反应混合液+ 10μl 样本ERC纯化液

■ qPCR反应的加样

1. 取96孔PCR板，在所需各孔内先加入20μl反应混合液。
2. 按照表4加样表，分别加入BLK、NCS、SAM、ERC，并依次从低到高加入10μl ST1、ST2、ST3、ST4和ST5 DNA标准品溶液，所有加样均为3复孔。
3. 粘性膜封板涡旋30S混匀，离心待qPCR。

表4. 96孔板加样示例表

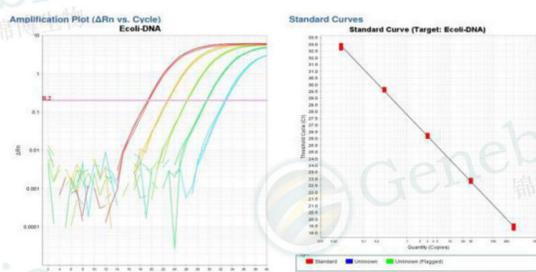
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	BLK	BLK									
B	NCS	NCS	NCS							ST5	ST5	ST5
C	SAM1	SAM1	SAM1							ST4	ST4	ST4
D	SAM2	SAM2	SAM2							ST3	ST3	ST3
E	SAM3	SAM3	SAM3							ST2	ST2	ST2
F	ERC1	ERC1	ERC1							ST1	ST1	ST1
G	ERC2	ERC2	ERC2									
H	ERC3	ERC3	ERC3									

■ qPCR仪运行程序设置

以Applied Biosystems® 7500 Fast qPCR仪为例。

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E.coli-DNA，选择报告荧光基团为FAM，猝灭荧光基团为TAMRA，检测参比荧光为ROX。
3. 设置两步法反应程序：
4. 95°C预变性10 min；95°C 15s，60°C 1min，40个循环；反应体积30μl。

■ 标准曲线PCR结果：



■ 结果计算

1. 供试品结果计算

按下式计算供试品的DNA残留量：

$$\text{外源性DNA残留量}(\text{pg}/\text{mg}) = \frac{\text{稀释倍数} \times \text{供试品平均值}(\text{pg}/\mu\text{l}) \times \text{洗脱体积}(\mu\text{l})}{\text{供试品蛋白浓度}(\text{mg}/\text{ml}) \times \text{供试品抽提加样体积}(\text{ml})}$$

复孔变异系数的计算：

$$\text{变异系数}(\text{CV}\%) = \frac{\text{复孔DNA含量标准偏差}}{\text{复孔DNA平均值}} \times 100\%$$

如DNA抽提样品检测结果在检测下限（ST5）附近（Ct值±2个循环）或检测结果Ct大于ST5，不计算变异系数。

2. 加标供试品回收率的计算

加标样品经过与样品同法处理后，根据PCR的标准曲线方程以及加标样品的Ct值，计算加标样品的DNA含量，根据加标的标示量，计算加标回收率。

$$\text{加标回收率}\% = \frac{(\text{供试品ERC浓度}(\text{pg}/\mu\text{l}) - \text{供试品浓度}(\text{pg}/\mu\text{l})) \times \text{洗脱体积}(\mu\text{l})}{\text{加标量}(\text{pg})} \times 100\%$$

■ 注意事项：

- 使用化学药品时，一定要穿戴合适的实验服、一次性手套和护目镜。
- 如试剂一次用不完，请放-20°C冰箱保存。
- 如在操作过程中，不慎将试剂溅入眼口鼻，请立即用大量的清水冲洗。
- 如果发现标签、试管壁出现污损、字迹不清楚等情况请停止使用该试剂盒。