

■ 简介

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USP，<509>Residual DNA Testing。

■ 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℃~-15℃
Compound of primers and probes	0.5ml	1	-25℃~-15℃，避光
qPCR Master Mix	1.5ml	1	-25℃~-15℃，避光
DNA Dilution Buffer	1.5ml	3	-25℃~-15℃

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℃，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℃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7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℃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℃

■ 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与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, 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。
- qPCR结果分析阈值建议调至0.1

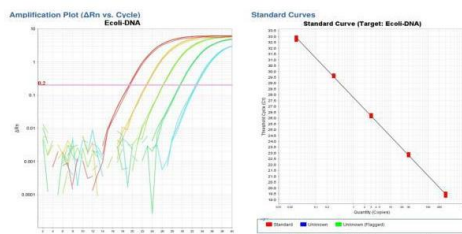
上海骏民科学仪器有限公司

电话: 021-54033671

地址: 上海市奉贤区茂园路59号楼803室

委托生产商: 苏州探实生物技术有限公司

■ 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:

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

复孔变异系数的计算:

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

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。

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

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。

