

**E.coli 残留 DNA 片段分析  
检测试剂盒（2G）  
（PCR-荧光探针法）  
说明书**

货号：1103171-2

版本：A/2

仅供研究用

湖州申科生物技术有限公司

## ■ 试剂盒简介

SHENTEK® E.coli 残留 DNA 片段分析检测试剂盒是用于定量分析检测各种生物制品的中间品、半成品和成品中 E.coli 宿主细胞 DNA 残留片段大小分布的专用试剂盒。

本试剂盒利用 PCR 荧光探针法原理, 设计了四种不同的扩增片段 (85bp、103bp、220bp、550bp) 来定量检测分析样品中 E.coli 残留 DNA 片段的大小分布情况。检测快速, 专一性强, 性能可靠, 最低检测限可以达到 fg 水平。试剂盒配套有 E.coli 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。

## ■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

序号	组分	装量	储存条件
I	E.coli Primer&Probe MIX-85	300µl×1 管	-18°C及以下, 避光
	E.coli Primer&Probe MIX-103	300µl×1 管	-18°C及以下, 避光
	E.coli Primer&Probe MIX-220	300µl×1 管	-18°C及以下, 避光
	E.coli Primer&Probe MIX-550	300µl×1 管	-18°C及以下, 避光
	qPCR Reaction Buffer	850µl×8 管	-18°C及以下, 避光
	IPC MIX	550µl×1 管	-18°C及以下, 避光
II	DNA 稀释液	1.5ml×3 管	-18°C及以下
	E.coli DNA 定量参考品	50µl×1 管	-18°C及以下

## ■ 规格

4×100 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
- 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

- 1.5ml 低吸附无菌离心管
- 96 孔 qPCR 板

➤1000μl, 100μl, 10μl 无菌低吸附带滤芯枪头

## ■ 相关设备

➤荧光定量 PCR 仪

➤1000μl, 100μl, 10μl 移液枪

## ■ 操作过程

### ❖ E.coli DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

✚ 片段分析试剂盒中含有四种不同长度的扩增片段, 在建立标曲时, 需分别对不同的扩增片段设置标曲, 并根据对应扩增片段的标曲来计算其残留量和分布相对量。

**E.coli 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 E.coli DNA 定量参考品进行梯度稀释, 稀释浓度依次为 3ng/μl、300pg/μl、30pg/μl、3pg/μl、300fg/μl, 30fg/μl。具体操作如下:

1. 将试剂盒中的 E.coli DNA 定量参考品和 DNA 稀释液置于冰上或 2-8℃ 条件下融化。待完全融化后, 轻弹数下混匀, 短时间快速离心 3~5s, 如此重复 3 次。
2. 取 6 支干净的 1.5ml 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 E.coli DNA 定量参考品稀释至 3ng/μl, 振荡混匀后短时间快速离心 3~5s, 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 180μl DNA 稀释液。
5. 按表 2 依次进行 5 次稀释操作。

表 2. E.coli DNA 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度
ST1	20μl ST0+180μl DNA 稀释液	300pg/μl
ST2	20μl ST1+180μl DNA 稀释液	30pg/μl
ST3	20μl ST2+180μl DNA 稀释液	3pg/μl
ST4	20μl ST3+180μl DNA 稀释液	300fg/μl
ST5	20μl ST4+180μl DNA 稀释液	30fg/μl

✚ 已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于 2-8℃。

✚ 若 DNA 稀释液中有析出, 建议于 37℃ 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。

### ❖ 阴性质控 NCS 的制备

1. 取 100 $\mu$ l DNA 稀释液加入 1.5ml 干净的离心管中, 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) 的制备

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)  $\times$  3

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 $^{\circ}$ C 条件下融化, 并参考表 3、4、5、6 所示准备对应扩增片段的 qPCR MIX:

表 3. qPCR MIX-85 配制表

组份	单孔反应
qPCR Reaction Buffer	15.9 $\mu$ l
E.coli Primer&Probe MIX-85	2.8 $\mu$ l
IPC MIX	1.3 $\mu$ l
总体积	20 $\mu$ l

表 4. qPCR MIX-103 配制表

组份	单孔反应
qPCR Reaction Buffer	15.9 $\mu$ l
E.coli Primer&Probe MIX-103	2.8 $\mu$ l
IPC MIX	1.3 $\mu$ l
总体积	20 $\mu$ l

表 5. qPCR MIX-220 配制表

组份	单孔反应
qPCR Reaction Buffer	15.9 $\mu$ l
E.coli Primer&Probe MIX-220	2.8 $\mu$ l
IPC MIX	1.3 $\mu$ l
总体积	20 $\mu$ l

表 6. qPCR MIX-550 配制表

组份	单孔反应
qPCR Reaction Buffer	15.9 $\mu$ l
E.coli Primer&Probe MIX-550	2.8 $\mu$ l
IPC MIX	1.3 $\mu$ l
总体积	20 $\mu$ l

 为满足同步进行四种扩增片段检测，DNA 模板需 $\geq 120\mu$ 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。

#### ❖ 加样

1. 各试剂置于冰上，轻微振荡混匀，选择对应扩增片段参考表 7、8、9、10 所示加样。

表 7. MIX-85 各反应孔加样示例

ST-85	20 $\mu$ l qPCR MIX-85+10 $\mu$ l ST1/ST2/ST3/ST4/ ST5
NTC	20 $\mu$ l qPCR MIX-85+10 $\mu$ l DNA 稀释液
NCS	20 $\mu$ l qPCR MIX-85+10 $\mu$ l 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 $\mu$ l qPCR MIX-85+10 $\mu$ l 待测样品纯化液

表 8. MIX-103 各反应孔加样示例

ST-103	20 $\mu$ l qPCR MIX-103+10 $\mu$ l ST1/ST2/ST3/ST4/ ST5
NTC	20 $\mu$ l qPCR MIX-103+10 $\mu$ l DNA 稀释液
NCS	20 $\mu$ l qPCR MIX-103+10 $\mu$ l 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 $\mu$ l qPCR MIX-103+10 $\mu$ l 待测样品纯化液

表 9. MIX-220 各反应孔加样示例

ST-220	20 $\mu$ l qPCR MIX-220+10 $\mu$ l ST1/ST2/ST3/ST4/ ST5
NTC	20 $\mu$ l qPCR MIX-220+10 $\mu$ l DNA 稀释液
NCS	20 $\mu$ l qPCR MIX-220+10 $\mu$ l 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 $\mu$ l qPCR MIX-220+10 $\mu$ l 待测样品纯化液

表 10. MIX-550 各反应孔加样示例

ST-550	20 $\mu$ l qPCR MIX-550+10 $\mu$ l ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	20 $\mu$ l qPCR MIX-550+10 $\mu$ l DNA 稀释液
NCS	20 $\mu$ l qPCR MIX-550+10 $\mu$ l 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	20 $\mu$ l qPCR MIX-550+10 $\mu$ l 待测样品纯化液

✚ 加样完成后每孔总体积为 30 $\mu$ l。

表 11. 96 孔板排版示例

MIX-85			MIX-103			MIX-220			MIX-550			
NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	A
NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	B
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	C
ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	D
ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	E
ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	F
ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	G
ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	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、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、1 个待测样品。每个检测做 3 个重复孔。其中 1~3 列为 qPCR MIX-85, 4~6 列为 qPCR MIX-103, 7~9 列为 qPCR MIX-220, 10~12 列为 qPCR MIX-550。

✚ 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 10s 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 E.coli SIZE-85 反应孔, 选择步骤 2 项目中的“E.coli

**SIZE-85bp**”程序；选择检测 E.coli SIZE-103 反应孔，选择步骤 2 项目中的“**E.coli SIZE-103bp**”程序；选择检测 E.coli SIZE-220 反应孔，选择步骤 2 项目中的“**E.coli SIZE-220bp**”程序；选择检测 E.coli SIZE-550 反应孔，选择步骤 2 项目中的“**E.coli SIZE-550bp**”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：

选择 FAM 通道代表 E.coli 检测信号，选择 VIC 通道代表 IPC 检测信号。

1. 创建空白新程序，选择绝对定量检测模板。

2. 四组 qPCR MIX 创建新检测探针，分别命名为 qPCR MIX-85、qPCR MIX-103、qPCR MIX-220、qPCR MIX-550，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 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）。

3. 设置三步法反应程序：**95°C 预变性 10min；95°C 15 s，60°C 30 s，72°C 1 min 30 s**（读取荧光），**40 个循环**；反应体积 30 $\mu$ l。

#### ❖ 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，并进行赋值。“E.coli SIZE-85bp、E.coli SIZE-103bp、E.coli SIZE-220bp、E.coli SIZE-550bp”设为 300、30、3、0.3，0.03，并在相应的“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/ $\mu$ l。

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

1. 在 Results 的 Amplification Plot 面板中，Analysis Settings 选择 Manual Ct, Threshold 设置为 0.02，选择 Auto Baseline，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，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、待测样品的检测值，单位为 pg/10 $\mu$ l。后续可在检测报告中将单位换算为 pg/ $\mu$ l 或 pg/ml。

6. 以 qPCR MIX-85 的待测样品检测值为 100%，计算 qPCR MIX-103、qPCR MIX-220、qPCR MIX-550 的待测样品百分比。

7. 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。

8. 阴性质控 NCS、无模板对照 NTC FAM 信号的 Ct 均值大于标曲最低浓度 FAM 信号 Ct 均值或扩增曲线无明显起峰，VIC 信号为有效的“S”型扩增曲线。

 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：2022 年 11 月 10 日

## 服务支持



湖州申科生物技术有限公司

[www.shenkebio.com](http://www.shenkebio.com)

地址：浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: [Info@shenkebio.com](mailto:Info@shenkebio.com)

电话：0572-2165910