

E.coli 残留 DNA 检测试剂盒

（PCR-荧光探针法）

说明书

货号：SK030202E100

版本：B/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

SHENTEK® E.coli 残留 DNA 检测试剂盒是用于定量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 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 E.coli 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 水平。

试剂盒配套有 E.coli DNA 定量参考品，已溯源至国家标准品。本试剂盒与宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒配套使用，可准确定量样品中 E.coli 残留 DNA。

■ 试剂盒组分

表 1.试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
E.coli DNA 定量参考品	NNA002	50 µL×1 管	-18℃及以下
E.coli qPCR MIX	NNC002	1 mL×2 管	-18℃及以下，避光
DNA 稀释液	NND001	1.5 mL×3 管	-18℃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
- CFX96 定量 PCR 系统
- Linegene 9600plus 定量 PCR 系统
- Mx3000PTM 定量 PCR 系统
- qTOWER3G 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

■ 相关设备

- 荧光定量 PCR 仪
- 1000 μL，100 μL，10 μL 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

E.coli DNA 定量参考品的浓度标注于管壁标签，请确认后再进行稀释。

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 3 ng/μL、300 pg/μL、30 pg/μL、3 pg/μL、300 fg/μL，30 fg/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 3~5 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 ng/μL，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.E.coli 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℃。
- ✚ 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。

❖加样回收质控 ERC 的制备

根据需要设置 ERC 中的 E.coli DNA 加样浓度（以制备加 30 pg E.coli 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，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 反应液的制备和加样

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 E.coli qPCR MIX 总量：

E.coli qPCR MIX = (反应孔数 + 2) $\times 20 \mu\text{L}$ (含有 2 孔的损失量)

3. 各试剂置于冰上融化，轻微振荡混匀，按表 3 所示加样：

表 3. 各反应孔加样示例

标准曲线	20 μL qPCR MIX + 10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
无模板对照 NTC	20 μL qPCR MIX + 10 μL DNA 稀释液
阴性质控 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 4.96 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 E.coli 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。

4. 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 结果分析

✧ 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“E.coli 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 E.coli-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℃预变性 10 min；95℃ 15 s，60℃ 1 min（读取荧光），40 个循环；**反应体积 30 μ 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，并在标品赋值中分别根据表 2 赋值，例如“E.coli 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/10 μL。后续可在检测报告中将单位换算为 pg/μL 或 pg/mL。

6. 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。

7. 阴性质控 NCS 的 Ct 值应大于标曲最低浓度 Ct 均值。

8. 无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值 $\geq$ 35.00，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