

大肠杆菌DNA残留探针法qPCR检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
D7701S	大肠杆菌DNA残留探针法qPCR检测试剂盒	50次
D7701M	大肠杆菌DNA残留探针法qPCR检测试剂盒	200次

产品简介:

- 碧云天研发生产的大肠杆菌DNA残留探针法qPCR检测试剂盒, 即*E.coli* DNA Residue Probe qPCR Kit, 又称大肠杆菌基因组DNA残留探针法qPCR检测试剂盒(*E.coli* genomic DNA Residue Probe qPCR Kit)或大肠杆菌宿主细胞基因组DNA残留检测试剂盒, 是一种通过探针法qPCR (Quantitative PCR)快速、有效、高灵敏地定量检测各种生物制品样品中*E.coli*宿主细胞残留基因组DNA含量的试剂盒。本产品为防污染型, 含有优化比例的高品质UDG酶和dUTP, 可有效消除PCR扩增过程中带来的产物污染问题造成的假阳性或CT值偏低。
- 大肠杆菌(*E.coli*)常用于大规模表达和生产目标蛋白或生物活性分子, 包括重组蛋白、疫苗以及抗癌药物等新型医用生物制品[1]。这些生物制品在生产过程中, 会有少量大肠杆菌细胞DNA片段的残留。这些片段可能具有免疫原性、感染性或者致癌性, 当其残留水平过高时就可能引发免疫反应、致病性感染以及诱发肿瘤等安全问题[2]。在许多国家和地区, 药物注册和监管机构对生物制品中的宿主细胞DNA残留有严格的要求和限制。通过检测和控制宿主细胞DNA残留, 可以评估生物制品的免疫原性风险和安全性。另外用于微量样品高通量测序时, 也需要确保相关的大肠杆菌重组表达的酶没有大肠杆菌DNA的污染。
- 本试剂盒能高效灵敏地检测*E.coli*宿主细胞的残留DNA, 最低检测限可至飞克(Femtogram, fg)。根据《中华人民共和国药典》2020年版第三部规定, 检测DNA残留量的方法包括DNA探针杂交法、荧光染色法和定量PCR法, 并且规定以细胞基质生产的生物制剂DNA残留量不能超过100pg/剂, 以细菌或真菌基质生产的疫苗DNA残留量不能超过10ng/剂。本试剂盒基于中华人民共和国药典(2020年版)中外源性DNA残留量测定法中的定量PCR法, 采用探针法qPCR, 检测下限为3fg/ μ l, 检测范围为3fg/ μ l-300pg/ μ l。用于阳性对照检测的平均CT值、平均lgCT以及根据标准曲线计算所得的浓度见下表, 扩增及标准曲线参考图1。

Target	300pg/ μ l	30pg/ μ l	3pg/ μ l	300fg/ μ l	30fg/ μ l	3fg/ μ l	NTC
平均CT值	18.99	21.95	25.28	29.08	31.9	35.2	Undetermined
平均lgCT	2.37	1.47	0.45	-0.71	-1.57	-2.57	-
浓度	236.5pg/ μ l	29.55pg/ μ l	2.85pg/ μ l	197.14fg/ μ l	27.18fg/ μ l	2.67fg/ μ l	-

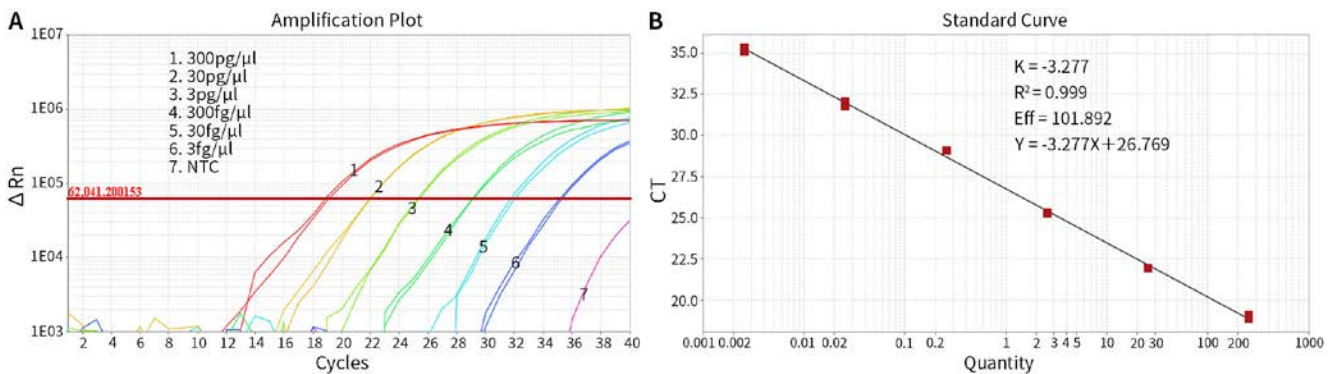


图1. 碧云天大肠杆菌DNA残留探针法qPCR检测试剂盒(D7701)用于不同浓度梯度的阳性对照的扩增曲线及标准曲线。将本试剂盒中的*E.coli* DNA Control稀释至浓度分别为300pg/ μ l、30pg/ μ l、3pg/ μ l、300fg/ μ l、30fg/ μ l和3fg/ μ l, 然后用本试剂盒进行qPCR检测。NTC, No Template Control。实测数据可能会因样品、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- 本试剂盒特异性强, HeLa细胞和CHO细胞基因组DNA对*E.coli* DNA残留检测无干扰。本试剂盒只检测*E.coli*宿主细胞DNA, 与其它物种DNA无交叉反应(图2)。

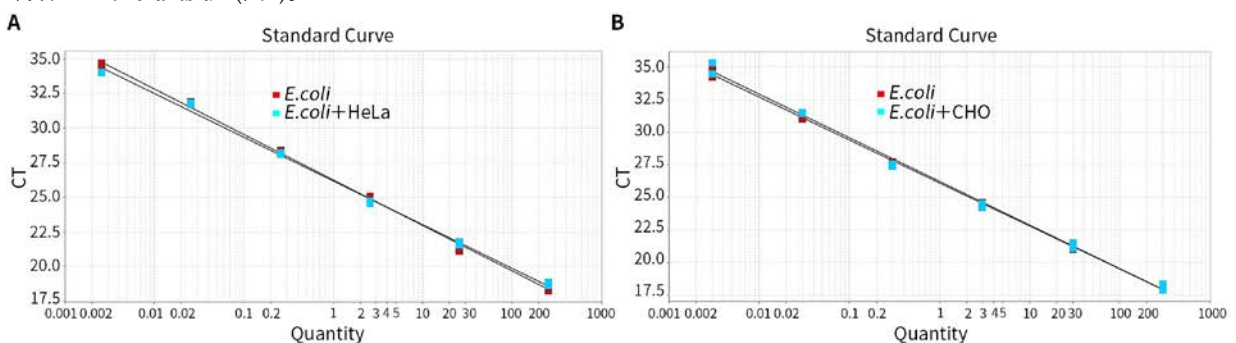


图2. 碧云天大肠杆菌DNA残留探针法qPCR检测试剂盒(D7701)检测不同浓度梯度阳性对照以及分别加入10倍量HeLa和CHO细胞基因组DNA的阳性对照的标准曲线。实测数据可能会因样品、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

➤ 本试剂盒稳定性高，不同程度的碎片化DNA对*E.coli* DNA残留检测基本无干扰。利用不同量微球菌核酸酶(Micrococcal Nuclease, MNase) (D7201)将*E.coli* DNA Control碎片化至不同程度，然后使用本试剂盒进行qPCR检测。结果显示，超过200bp的DNA，基本都会被检测到，不影响检测效果；但如果碎片化程度过于严重，导致200bp以下的DNA居多，会使DNA残留量检测值偏小。本试剂盒检测不同碎片化程度DNA的扩增曲线及标准曲线参考图3，DNA碎片化处理的电泳结果参考图4。

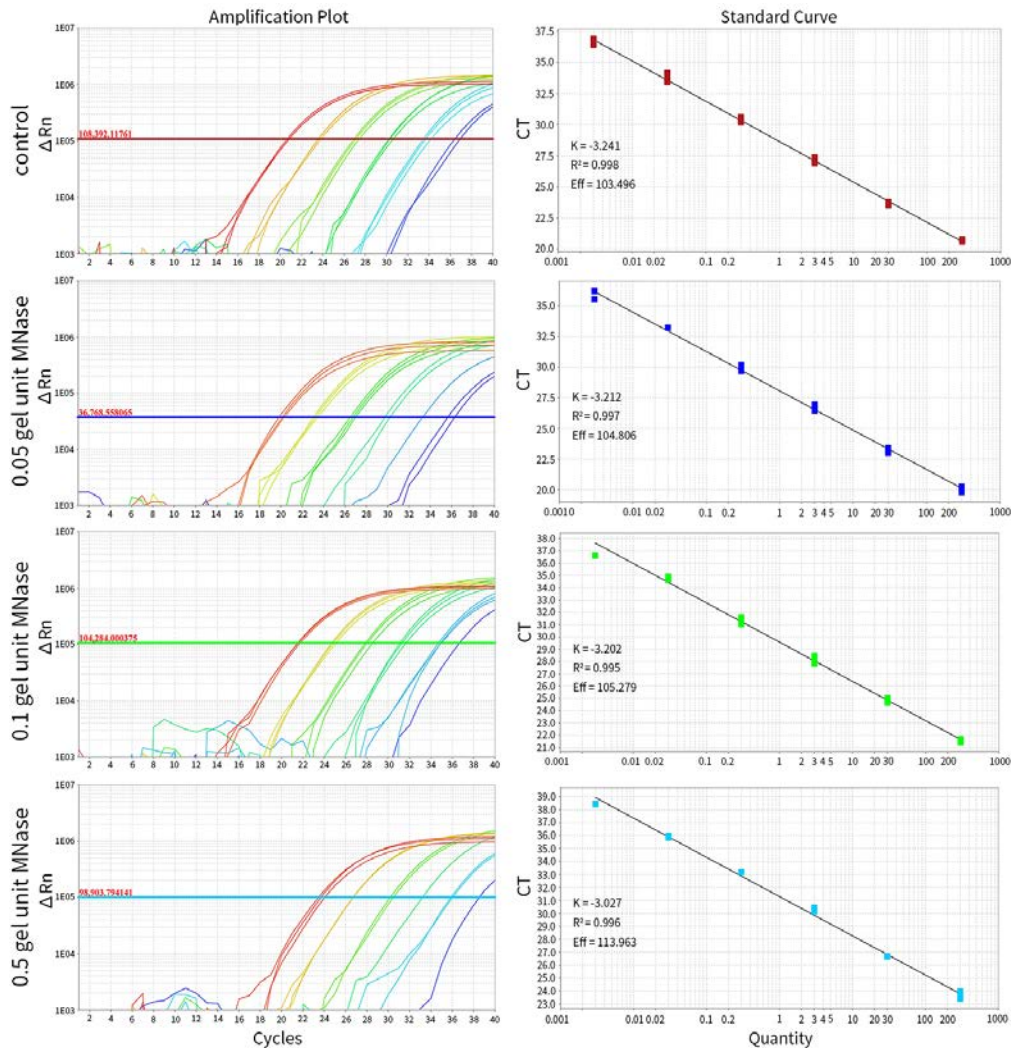


图3. 碧云天大肠杆菌DNA残留探针法qPCR检测试剂盒(D7701)对不同程度碎片化大肠杆菌DNA的检测效果图。*E.coli*基因组DNA经不同量MNase碎片化处理后稀释成如图1中的各个浓度进行检测。实验结果显示，在0.05和0.1 gel unit的MNase处理后，检测结果和未碎片化处理的对照(control)基本一致；在0.5 gel unit的MNase处理后，由于大部分DNA在200bp以下(见图4)，此时CT值明显增加。实测数据可能会因样品、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

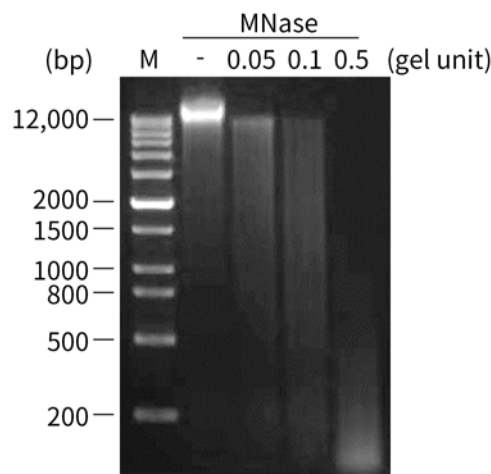


图4. 不同量MNase碎片化处理的大肠杆菌基因组DNA的电泳图。*E.coli* DNA约0.5μg，37℃ 15分钟进行碎片化处理后终止反

应。实测效果可能会因样品种类、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

- 本试剂盒重复性好，重复12次检测3pg/μl、30fg/μl *E.coli* DNA的CT值见下表，CV值(变异系数)均小于5%。

重复次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	CV
3pg/μl CT值	24.41	24.22	24.67	24.79	24.76	25.07	24.71	24.6	25.02	24.86	24.89	25.28	1.11%
30fg/μl CT值	31.54	31.48	30.79	32.2	31.73	30.71	31.99	31.49	31.48	32.1	31.53	31.73	1.38%

- 本试剂盒可搭配BeyoMag™磁珠法残留DNA样品制备试剂盒(D0051)用于样品提取，使用*E.coli* DNA Control模拟样品的回收率测试结果见下表。

回收前残留DNA浓度	回收前体积	回收后残留DNA浓度	回收后体积	回收率
30fg/μl	100μl	32.55fg/μl	100μl	108.5%
3fg/μl	100μl	3.08fg/μl	100μl	102.7%

注1：回收率和样品浓度、体积、样品种类及实验操作等的不同而存在差异，表中数据仅供参考。

注2：根据中华人民共和国药典(2020年版·三部)‘外源性DNA残留测定法’中‘第三法 定量PCR’对于结果计算的要求，加标样品的回收率应在50%~150%之间。

- 本试剂盒提供了qPCR实验所需的预混液BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, UDG)和特异性引物探针混合物。预混液包含了高质量、无*E.coli* DNA残留的BeyoFast™ Taq DNA Polymerase、UDG酶、PCR Buffer、dNTPs、dUTP、稳定剂和镁离子等所有的通用组分；高纯度引物探针混合物以*E.coli* 23S rDNA的保守区序列作为靶点所设计，二者结合可用于*E.coli* DNA的超高灵敏度定量检测。此外，本试剂盒提供*E.coli* DNA Control，作为阳性对照，用于检测试剂盒本身是否能正常工作及构建标准曲线。
- 本产品提供了Low ROX和High ROX，广泛兼容于无需ROX和需要Low ROX或High ROX作为校正染料的荧光定量PCR仪。ROX的作用是用于校正与PCR无关的荧光波动，从而最大限度减少孔间差异。这种差异可能由多种因素引起，如移液误差及样品蒸发等。不同的荧光定量PCR仪对ROX的要求不同，请根据实际所用仪器选择含高浓度ROX (High ROX)、低浓度ROX (Low ROX)或不含ROX的BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X)。通常含高浓度ROX的BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, High ROX)也可以用于不需要ROX或需要低浓度ROX的荧光定量PCR仪。常用仪器所需ROX类型请参考如下表格。

添加ROX类型	适用PCR仪
不需添加	Bio-Rad: CFX384, CFX96, MiniOpticon, iCycler IQ, MyiQ and iQ5; Eppendorf: Mastercycler ep realplex and realplex2 s; Qiagen/Corbett Rotor-Gene: 6000; Roche LightCycler 480; Cepheid SmartCycler; Illumina Eco qPCR
Low ROX	ABI: 7500(Fast), ViiA 7, QuantStudio 6 and 7 Flex Systems; Stratagene: Mx3000P, Mx3005P and Mx4000; Qiagen/Corbett Rotor-Gene: 3000; Bio-Rad/MJ: Chromo4, Opticon 2 and Opticon
High ROX	ABI GeneAmp 5700; ABI PRISM 7000, 7700; ABI 7300, 7900HT(Fast); ABI StepOne (Plus)

- 本试剂盒如果用于常规的96孔板qPCR检测(建议反应体系为20μl)或384孔板qPCR检测(建议反应体系为10μl)，本产品小包装分别可以进行50次和100次检测，中包装分别可进行200次和400次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D7701S-1	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, UDG)	500μl
D7701S-2	Primer/Probe Mix (10X)	100μl
D7701S-3	Ultrapure Water	500μl
D7701S-4	Dilution Buffer	3ml
D7701S-5	<i>E.coli</i> DNA Control (30ng/μl)	50μl
D7701S-6	Low ROX (50X)	20μl
D7701S-7	High ROX (50X)	20μl
-	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D7701M-1	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, UDG)	2ml
D7701M-2	Primer/Probe Mix (10X)	400μl
D7701M-3	Ultrapure Water	2ml
D7701M-4	Dilution Buffer	12ml
D7701M-5	<i>E.coli</i> DNA Control (30ng/μl)	200μl
D7701M-6	Low ROX (50X)	80μl

D7701M-7	High ROX (50X)	80µl
-	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。其中Primer/Probe Mix (10X)、Low ROX (50X)、High ROX (50X)须避光保存，并尽量避免反复冻融。

注意事项：

- 本产品请在首次开启后建议立即使用完毕，或务必在无菌条件下对其适当分装并保存于-20°C，以免空气中的大肠杆菌污染影响实验结果。
- 使用前请务必确保试剂完全融化，充分混匀后使用。混匀过程尽量避免产生气泡。
- Primer/Probe Mix (10X)、Low ROX (50X)、High ROX (50X)中含有荧光染料，保存本产品或设置PCR反应体系时应避免强光照射，以尽量避免荧光淬灭问题。
- 经测试，本产品反复冻融10次对使用效果无显著影响，但仍需尽量避免反复冻融。反复冻融可能使产品性能下降。
- qPCR检测是超高灵敏度的检测，请尽量在标准的PCR实验室中进行检测。PCR反应设置区域须尽量避免各种可能的扩增产物的污染。虽然本产品为防污染型，但仍建议勿在PCR反应设置区域撕开PCR封板膜或打开PCR管盖，PCR产物宜密封后按扩增后产物要求处理，以避免超高浓度的PCR产物污染实验环境。
- 建议使用带滤芯的吸头配制PCR体系，这样可以最大限度的避免污染导致的假阳性。推荐BeyoGold™无菌滤芯盒装吸头 (FTIP631/FTIP635/FTIP638)。
- 建议使用低吸附的1.5ml离心管，样品回收率高。推荐BeyoGold™ 1.5毫升离心管(无色，低吸附，Nuclease free) (FTUB312)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 需要用户自备的耗材、仪器和试剂。

- a. 具有FAM荧光通道的荧光定量PCR仪。
- b. DNase-free、RNase-free的吸头、低吸附离心管、荧光定量PCR用96孔板或384孔板、PCR板封板膜。

2. 样品准备。

选择合适的残留DNA样品制备试剂盒用于纯化提取生物制品的中间品、半成品和成品等中的大肠杆菌宿主细胞残留的基因组DNA，以此去除样品中抑制qPCR反应的物质。推荐使用BeyoMag™磁珠法残留DNA样品制备试剂盒(D0051)用于样品提取。

注：由于本试剂盒灵敏度特别高，通常建议把样品制备的房间、qPCR反应体系配制的房间、处理扩增产物的房间按顺序分成3个房间，以避免出现假阳性。高浓度*E.coli* DNA Control处理时须特别小心，仅稀释后的*E.coli* DNA Control可以带入qPCR反应体系配制的房间。

3. *E.coli* DNA Control标准曲线设置。

用本试剂盒中提供的Dilution Buffer将*E.coli* DNA Control (30ng/µl)进行梯度稀释，按照下表依次配制300pg/µl、30pg/µl、3pg/µl、300fg/µl、30fg/µl、3fg/µl的*E.coli* DNA Control。

Tube Number	Dilution Methods	Concentration
ST0	10µl <i>E.coli</i> DNA Control (30ng/µl) + 90µl Dilution Buffer	3ng/µl
ST1	10µl ST0 + 90µl Dilution Buffer	300pg/µl
ST2	10µl ST1 + 90µl Dilution Buffer	30pg/µl
ST3	10µl ST2 + 90µl Dilution Buffer	3pg/µl
ST4	10µl ST3 + 90µl Dilution Buffer	300fg/µl
ST5	10µl ST4 + 90µl Dilution Buffer	30fg/µl
ST6	10µl ST5 + 90µl Dilution Buffer	3fg/µl

注1: *E.coli* DNA Control (30ng/µl)和Dilution Buffer使用前置于冰上或4°C融化，Vortex充分混匀后使用。

注2: 每次稀释时应注意充分混匀。

注3: ST0管可置于-20°C保存，3个月有效；Dilution Buffer可置于4°C保存，至少一周有效，如果长时间不用，可以在-20°C保存。

4. 样品加标回收质控ERC和阴性质控NEC的制备(选做)。

根据实验需要，设置ERC (Extraction/Recovery Control)，即在待测样品中加入已知浓度的标准品，与待测样品同时进行DNA提取，并进行qPCR检测，以计算待测样品的回收率，进而评估样品回收的效率。设置NEC (Negative Extraction Control)，即仅含Dilution Buffer不含待测样品，与待测样品同时进行DNA提取，以评估检测系统本身、环境、人为等因素造成的误差及差异等。

- a. **ERC的制备：**以制备加3pg *E.coli* DNA量的ERC为例，取90µl待测样品和10µl 300fg/µl (即3pg)的ST4加入1.5ml离心管中，充分混匀，标记为ERC。
- b. **NEC的制备：**取100µl Dilution Buffer加入1.5ml离心管中，标记为NEC。

注：ERC、NEC与待测样品须同批进行提取处理(同步步骤2)。若样品中*E.coli* DNA残留较高，需要稀释后再添加*E.coli* DNA标准品，加标量在样品量的0.1-10倍范围内比较合适。

5. qPCR反应体系的设置。

- 融解并混匀反应所需的各种溶液，置于冰浴上或冰盒内。
- 参考下表在室温或冰浴上设置qPCR反应体系(以96孔板，每孔反应体系为20μl为例)。下表中的Template为样品(纯化提取的或稀释后的)、无模板阴性对照(No Template Control, NTC)、标准品(*E.coli* DNA Control)、ERC或NEC (可选)。NTC可使用Dilution Buffer。建议每次检测都设置NTC和Standard。

Reagent	Volume
BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, UDG)	10μl
Primer/Probe Mix (10X)	2μl
Template	2μl
Without or Low/High ROX (50X)	0 or 0.4μl
Ultrapure Water	To 20μl

- 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀，室温离心数秒，使液体体积聚于管底。
- 将设置好的PCR反应管或PCR反应板置于荧光定量PCR仪上，开始PCR反应。
- 荧光检测通道的选择：*E.coli* DNA Probe的荧光基团是FAM，可选择检测通道为FAM，淬灭基团是BHQ1，如果没有BHQ1，则选择无。

6. qPCR反应程序。

本试剂盒建议采用如下的qPCR程序，本程序是以QuantStudio™ 6 Flex Systems荧光定量PCR仪为例：

- UDG酶处理：50°C 5min
- 预变性：95°C 2min
- 变性：95°C 15sec
- 退火/延伸：60°C 30sec
- 重复步骤c和步骤d，总共40个循环
- 最后使用荧光定量PCR仪提供的软件分析检测结果

7. 结果的定性判断。

- 无模板阴性对照(NTC)：FAM通道无典型扩增曲线，检测结果应为Undetermined或CT值 ≥ 38 ，或根据实验室自身验证结果设定具体标准；
- 标准曲线： $R^2 \geq 0.98$ ，扩增效率(Efficiency, Eff) = 90-110%；
- NEC的CT值大于标准曲线最低浓度的CT值；
- 样品浓度的计算：根据标准曲线有效范围内的CT值并结合标准曲线公式计算样品浓度(pg/μl或fg/μl)。请勿使用标准曲线有效范围之外的CT值计算待测样本的浓度；
- 加样回收率的计算：根据待测样品和加标样品(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。计算示例如步骤7f。
- 计算示例：

(a) 样品浓度计算示例：

使用碧云天BeyoMag™磁珠法残留DNA样品制备试剂盒(D0051)对100μl模拟待测样品(含BSA)以及对应的加标样品(即在待测样品基础上再添加一定量的标准品)进行制备操作，并使用碧云天大肠杆菌DNA残留探针法qPCR检测试剂盒(D7701)检测样品浓度：

复孔	待测样品CT值	待测样品lgCT	待测样品浓度	加标样品CT值	加标样品lgCT	加标样品浓度
1	33.53	0.97	9.36fg/μl	31.6	1.54	35.0fg/μl
2	34.30	0.74	5.53fg/μl	31.84	1.47	29.7fg/μl
3	33.82	0.89	7.68fg/μl	31.73	1.51	32.0fg/μl

注：上表中用于计算样品浓度的标准曲线公式为： $Y = -3.371X + 36.804$ ，其中Y为CT值，X为该待测样品浓度的对数，斜率和Y轴截距是由荧光定量PCR仪自动生成。

(b) 加样回收率计算示例：

根据步骤(a)中待测样品浓度及加标样品浓度，计算回收率：

复孔	待测样品浓度	加标样品浓度	洗脱体积	加标量	回收率
1	9.36fg/μl	35.0fg/μl	100μl	3000fg	85.4%
2	5.53fg/μl	29.7fg/μl	100μl	3000fg	80.5%
3	7.68fg/μl	32.0fg/μl	100μl	3000fg	81.1%

注：上表中用于计算加样回收率的公式为： $(\text{加标样品的浓度} - \text{待测样品的浓度}) \times \text{洗脱体积} / \text{加标量}$ 。

参考文献：

- Lee DH, Bae JE, Lee JH, Shin JS, Kim IS. J Microbiol Biotechnol. 2010. 20(10):1463-70.
- Li D, Zhang Q, Liu G, Zhang L, Gu Z, et al. J Pharm Biomed Anal. 2021. 198:114000.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
D0051S	BeyoMag™磁珠法残留DNA样品制备试剂盒	50次
D0051M	BeyoMag™磁珠法残留DNA样品制备试剂盒	200次
D7580S	猫细小病毒(FPV)染料法qPCR检测试剂盒	50次
D7580M	猫细小病毒(FPV)染料法qPCR检测试剂盒	200次
D7583S	猫细小病毒(FPV)探针法qPCR检测试剂盒	50次
D7583M	猫细小病毒(FPV)探针法qPCR检测试剂盒	200次
D7589S	猫细小病毒(FPV)等温扩增荧光检测试剂盒	25次
D7589M	猫细小病毒(FPV)等温扩增荧光检测试剂盒	100次
D7701S	大肠杆菌DNA残留探针法qPCR检测试剂盒	50次
D7701M	大肠杆菌DNA残留探针法qPCR检测试剂盒	200次
FASA011-1pc	BeyoGold™封板膜刮板	1个/袋
FSF002	荧光定量PCR用封板膜(ABI分装)	20片/包装
FSF035-20pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用封板膜(压敏型)	20片/包装
FSF035-100pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用封板膜(压敏型)	100片/包装
FSF039-20pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用封板膜(压敏型, 进口分装)	20片/包装
FSF039-100pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用封板膜(压敏型, 进口分装)	100片/包装
FTIP631-10bxs	BeyoGold™无菌滤芯盒装吸头(0.5-10μl, 无色加长, 4.5cm)	96个/盒, 10盒/箱
FTIP631-50bxs	BeyoGold™无菌滤芯盒装吸头(0.5-10μl, 无色加长, 4.5cm)	96个/盒, 50盒/箱
FTIP635-10bxs	BeyoGold™无菌滤芯盒装吸头(1-200μl, 黄色加长, 5.6cm)	96个/盒, 10盒/箱
FTIP635-50bxs	BeyoGold™无菌滤芯盒装吸头(1-200μl, 黄色加长, 5.6cm)	96个/盒, 50盒/箱
FTIP638-10bxs	BeyoGold™无菌滤芯盒装吸头(100-1000μl, 蓝色加长, 10.2cm)	96个/盒, 10盒/箱
FTIP638-50bxs	BeyoGold™无菌滤芯盒装吸头(100-1000μl, 蓝色加长, 10.2cm)	96个/盒, 50盒/箱
FTUB333	荧光定量PCR用96孔板(ABI原装)	20个/包装
FTUB335-10pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 无裙边, 透明)	10个/盒
FTUB335-50pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 无裙边, 透明)	10个/盒, 5盒/箱
FTUB337-10pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 半裙边, 透明)	10个/盒
FTUB337-50pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 半裙边, 透明)	10个/盒, 5盒/箱
FTUB339-10pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 高裙边, 磨砂)	10个/盒
FTUB339-50pcs	BeyoGold™荧光定量PCR用96孔板(0.2ml, 高裙边, 磨砂)	10个/盒, 5盒/箱
FTUB384	荧光定量PCR用384孔板(ABI分装)	20个/包装
ST578	RNase A (10mg/ml)	1ml
ST579	RNase A (100mg/ml)	0.5ml
ST873-100ml	BeyoPure™ Ultrapure Water (PCR级, Sterile)	100ml

Version 2024.06.09