SHENTEK®

酿酒酵母残留 DNA 检测试剂盒

（PCR-荧光探针法）说明书

货号：1101103

版本：A/0
仅供研究用
湖州申科生物技术有限公司

■ **试剂盒简介**

酿酒酵母残留 DNA 检测试剂盒用于定量检测各种生物制品及药品的中间品、半成品和成品中酿酒酵母宿主细胞 DNA 的专用试剂盒。

本试剂盒利用荧光探针原理，定量检测样本中酿酒酵母残留 DNA。检测快速，专一性强，性能可靠，最低检测限可以达到 fg 级别。试剂盒配套有酿酒酵母 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，可准确定量样本中残留的微量酿酒酵母细胞 DNA。

■ **试剂盒成份**

表 1.试剂盒组份

组份	装量	储存条件
酿酒酵母 DNA 定量参考品	50μl×1 管	-18℃及以下
酿酒酵母 Primer&Probe MIX	300μl×1 管	-18℃及以下，避光
酿酒酵母 qPCR Reaction Buffer	850μl×2 管	-18℃及以下，避光
DNA 稀释液	1.5ml×3 管	-18℃及以下

■ **规格：**100 Reactions。

■ **有效期:** 规定储存条件下 24 个月。

■ **适用机型**

- PRISM® 7500 Real-Time PCR System（ABI）
- StepOne Plus Real-Time PCR System（ABI）
- CFX96(Bio-Rad)
- LineGene 9600（博日）
- Mx3000PTM (Stratagene)

■ **实验所需但试剂盒中未含材料**

- 1.5ml 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**

❖ **酿酒酵母 DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备**

酿酒酵母 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 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 DNA 定量参考品和 DNA 稀释液置于冰上融化，待完全融化后，轻微振荡混匀，短时间快速离心 10s。

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 DNA 定量参考品稀释至 3 ng/μl，振荡混匀后短时间快速离心 10s。

4.在 ST1，ST2，ST3，ST4，ST5 管中分别加入 90μl DNA 稀释液。

5.按表 2 依次进行 5 次稀释操作。

表 2. 酿酒酵母 DNA 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度
ST1	10μl ST0+90μl DNA 稀释液	300pg/μl
ST2	10μl ST1+90μl DNA 稀释液	30pg/μl
ST3	10μl ST2+90μl DNA 稀释液	3pg/μl
ST4	10μl ST3+90μl DNA 稀释液	300fg/μl
ST5	10μl ST4+90μl DNA 稀释液	30fg/μl

- 已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于 2-8℃。

❖ 加样回收质控 ERC 的制备

根据需要设置 ERC 中的酿酒酵母 DNA 加样浓度（以制备加 30pg 酿酒酵母 DNA 量的样本 ERC 为例），具体操作如下：

1.取 100μl 待测样本加入 1.5ml 干净的离心管中。

2.再加入 10μl ST3，混匀，标记为样本 ERC。

- 样本 ERC 和同批待测样本一起进行样本前处理，制备成样本 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 样本基质溶液(或 DNA 稀释液)加入 1.5ml 干净的离心管中；

2.标记为阴性质控 NCS。

- 阴性质控 NCS 和同批待测样本一起进行样本前处理，制备成阴性质控 NCS 纯化液。

❖ **qPCR 反应液（qPCR MIX）的准备**

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，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 +待测样本×2）×3

- 待测样本×2 是因为我们推荐每个待测样本检测时都应同时做样本 ERC。

2．根据反应孔数计算本次所需的 qPCR MIX 总量：

- qPCR MIX =（反应孔数+2）× 20μl（含有 2 孔的损失量）

3．各试剂放在冰上融化，并根据表 3 所示准备 qPCR MIX：

表 3. qPCR MIX 配制表

组份	单孔反应
酿酒酵母 qPCR Reaction Buffer	17μl
酿酒酵母 Primer&Probe MIX	3μl
总体积	20μl

❖ **加样**

1．各试剂置于冰上，轻微振荡混匀，按表 4 所示加样：

表 4.各反应孔加样示例

标准曲线	20μl qPCR MIX+10μl ST1/ST2/ST3/ST4/ ST5
NTC	20μl qPCR MIX + 10μl DNA 稀释液
NCS	20μl qPCR MIX + 10μl 阴性质控 NCS 纯化液
待测样本	20μl qPCR MIX + 10μl 待测样本纯化液
样本 ERC	20μl qPCR MIX + 10μl 样本 ERC 纯化液

- 加样完成后每孔总体积为 30μl。

表 5. 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 DNA 标准曲线（ST1～ST5）、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、5 个待测样本（S1～S5）和每个样本的 ERC（S1 ERC～S5 ERC）。每个检测做 3 个重复孔。
- 实际检测时可根据样本多少，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 程序参数设置

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 Sac-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 10min；95℃ 15 s，60℃ 1 min，40 个循环；反应体积 30μl。

- 各实验室可根据所用机型设置合理的反应程序。

❖ qPCR 结果分析

以 AB 公司 7500 qPCR 仪、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、待测样本孔、样本 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、待测样本、样本 ERC 的检测值，单位为 pg/10μl。后续可在检测报告中将单位换算为 pg/μl 或 pg/ml。

结果分析的参数设置需依据具体的机型及使用的软件版本，一般也可由仪器自动判读。

根据待测样本和样本 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。

阴性质控 NCS 的 Ct 值应大于标曲最低浓度 Ct 均值。

- 无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值≥35。

服务支持

湖州申科生物技术有限公司
www.shenkebio.com
地址：浙江省湖州市红丰路 1366 号
南太湖科创中心 5 号楼 5 楼
Email：Info@shenkebio.com
电话：0572-2115083