



毕赤酵母 宿主细胞 DNA 残留检测试剂盒-操作说明书

应用：定量检测重组蛋白表达、中间产物纯化及最终成品中残留 DNA 的含量

本试剂盒仅供科研使用，不得用于临床及诊断使用！

产品编号/规格：

1, PP-D050T(50T)

2, PP-D100T(100T)

一、产品介绍

本试剂盒采用 Taqman 探针荧光定量 PCR 法，设计专属探针和关键引物，特异性好，灵敏度高，其最低定量限可以达到 10fg/μL 水平。

DNA 参考品制备过程与其它宿主细胞 DNA 国家标准品制备一致，因此纯度高，无蛋白及离子干扰，保证了待测样品含量检测的准确度。

试剂盒提供 DNA 稀释专用稀释液，单次实验复孔平行性及多次实验间数据重现性好。

二、试剂盒组成

DNA 扩增			
组分编号	组分名称	产品编号/规格	
		PP-D050T(50T)	PP-D100T(100T)
B1	2X qPCR Mix	0.625mL	1.25mL
B2	Primer & Probe Mix	100 μ L	200 μ L
B3	DNA Dilution Buffer	2 × 1.5mL	4 × 1.5mL
B4	DNA Control (10ng/ μ L)	25 μ L	50 μ L
B5	RNase-Free H ₂ O	0.5mL	1mL
B6	50X ROX Reference Dye (可选)	0.15ml	0.3ml

* ROX 参比染料为可选，是否使用取决于使用的仪器。具体可参照 PART 6 中的说明。

三、实验需要但未提供的耗材及设备

1. 移液器：5 μ L-1000 μ L
2. 1.5/2ml 无 DNA 酶/RNA 酶离心管
3. 200 μ L 无 DNA 酶/RNA 酶 PCR 管
5. 迷你离心机
6. 无 DNA 酶/RNA 酶 8 联管
7. 生物安全柜



4. 涡旋仪

8. 荧光定量 qPCR 仪

四、运输和保存方法

- 1) 所有组分均干冰运输。
- 2) 试剂盒需 -20℃ 保存，建议一年内使用完。其中组分 B2 需避光保存。
- 3) B2/B3/B4 组分在 -20℃ 可以保存两年，B1/B5/B6 组分在 -20℃ 可以保存一年。此外 B1/B5/B6 三个组分也可以一起另外购买。

五、实验前准备

- 1) 使用本试剂前请仔细阅读说明书，所有成分使用前应完全化冻，低速离心，震荡混匀。
- 2) 从 -20℃ 冰箱取出，将组分 B1(2X qPCR Mix) 和 B6 (50X ROX Reference Dye) 分别融解，轻轻颠倒（尽量避免产生泡沫），待溶液完全均一后再行使用。注：如 B1(2X qPCR Mix) 和 B6 (50X ROX Reference Dye) 需一段时间内经常取用，可在 2-8 度条件下储存 3 个月。尽量避免反复多次冻融；如解冻后没有使用，须彻底混匀后重新冷冻。
- 3) B2 (Primer & Probe Mix) and B4 (DNA Control) 在使用前混匀时切勿反复吹打，可采用类似清洗管壁方式。注：为减少反复冻融次数和避免污染，建议初次使用时将 B4 (DNA Control) 分装储存于 -20℃。
- 4) 已融化未使用的 B3 (DNA Dilution Buffer) 可保存于 2-8℃ 7 天，若长时间不用，请放置于 -20℃。
- 5) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作，实验开始前后紫外照射 30min 以消除环境中潜在的 DNA 污染源。
- 6) 由于荧光定量 PCR 实验有极强的灵敏度，保持工作环境的洁净非常重要，实验开始前建议完全清洁移液器及周边工作环境，移除清理实验过程中用不到的任何物品。

六、操作过程

（一）DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

- 1) 将试剂盒中的 DNA Control 和 DNA Dilution Buffer 置于冰上完全融化，轻微振荡混匀，低速离心 10 sec。
- 2) 取 6 支洁净的 200 μL PCR 管，分别标记为 S0, S1, S2, S3, S4, S5 每管各加入 45 μL DNA 稀释液。



3) 在标记为 S0 的 PCR 管中加入 5 μ L DNA Control (10 ng/ μ L), 即 1000pg/ μ L, 快速离心 10 sec, 振荡 5sec, 再快速离心 10 sec, 该浓度可分装置于-20 $^{\circ}$ C短期保存 (不超过 3 个月), 使用时避免反复冻融。

4) S1, S2, S3, S4, S5 管稀释操作同 S0, 稀释方法如下:

	稀释过程	终浓度
S0	5 μ L DNA Control (10ng/ μ L) + 45 μ L DNA Dilution Buffer	1000pg/ μ L
S1	5 μ L S0 + 45 μ L DNA Dilution Buffer	100pg/ μ L
S2	5 μ L S1 + 45 μ L DNA Dilution Buffer	10pg/ μ L
S3	5 μ L S2 + 45 μ L DNA Dilution Buffer	1pg/ μ L
S4	5 μ L S3 + 45 μ L DNA Dilution Buffer	100fg/ μ L
S5	5 μ L S4 + 45 μ L DNA Dilution Buffer	10fg/ μ L

(二) 反应体系

组分	体积 (μ L)
2X qPCR Mix	12.5
Primer&Probe Mix	2
DNA template (control or sample)	5
补加水	5.5
总体积	25

【注】:

- 根据反应孔数计算本次所需 Mix 混合液总量: Mix 混合液=(反应孔数+4) * (12.5+2+5.5) μ L (含有 4 孔的损失量), 建议冰上操作。
- 标准品及待测样本每个浓度做 3 个复孔。上述标准曲线的线性范围适用大多数实验, 可根据实际需要适当调整, 如 30fg/ μ L-300pg/ μ L 等。
- 实验操作应保持一致。加样完成密封好管子后, 请低速离心 10 sec 将管壁的液体离心收集至管底, 再震荡混匀 5 sec 以上, 完全混匀反应液, 再低速离心 10 sec, 如有气泡, 需将气泡排尽。
- 为确保实验结果准确性, 建议用 1X PBS 将溶液中蛋白浓度稀释至 1-10mg/ml 进行加标回收率实验, 确保回收率在 50%~150%之间。
- 几种常见仪器的匹配 ROX Reference Dye 浓度见下表:



仪器	终浓度
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT/Step One 等	2.5X（例如：1.25μL ROX/25μL 体系）
ABD 7500/7500Fast Stratagene Mx3000P/Mx3005P/Mx4000 等	0.5X（例如：0.25μL ROX/25μL 体系）
Roche/Bio-Rad/Eppendorf 仪器等	不用添加

(三) 扩增程序设置（2 步法）

阶段	温度(°C)	时间	内容	荧光信号采集	循环数
预变性	95°C	15 min	预变性	否	1
PCR 反应	95°C	3 sec	变性*	否	40
	60°C	30 sec	退火/延伸*	是	

【注】：

- PCR 反应的预变性条件必须设定为 95°C，15min。
- 选择报告荧光基团为“FAM”，猝灭荧光基团为“TAMRA”。
- 变性*：请按照仪器使用说明书对不同型号的仪器进行时间。使用 ABI 7900HT/7900HT Fast/ViiA 7/StepOne/StepOnePlus 时可设定为 1sec。
- 退火/延伸*：请按照仪器使用说明书对不同型号的仪器进行时间。几种常见仪器的时间设定见下表：

使用 ABI 7500 Fast/7900HT/7900HT Fast/ViiA 7/StepOne/StepOnePlus 时请设定在 30sec
使用 Roche LightCycler/LightCycler 480 时请设定在 20sec
使用 ABI 7000/7300 时请设定在 31sec
使用 ABI 7500 时请设定在 32sec

七、判定标准

- 1) 标准曲线： $R^2>0.99$ ；扩增效率(Eff%)： $90\%\leq Eff\%\leq 110\%$ ；斜率 (Slope)：-3.8~-3.1。
- 2) 加标回收率%=(加标样品测定值-样品测定值)/加标理论值*100%，范围 50%-150%。
- 3) 无模板对照（NTC）：即反应体系中用 DNA 稀释液代替待检测模板，其余成分不变，其检测结果 Ct 值应为 Undetermined 或 Ct 值 ≥ 35 。