

大肠杆菌基因组残留探针法 qPCR 试剂盒

E. coli Residual gDNA Probe PCR Kit

CAT#: BN62306

低温运输, -20℃保存

产品及特点

目前, 作为药物和疫苗用的质粒 DNA 制品必须符合严格的质量标准, 其中大肠杆菌作为宿主菌基因组 DNA 残留量的控制是一个非常重要的指标。现行的检测方法主要是 Southern blot 法, 不但繁琐费力, 不能精确定量, 而且一次检测的样本量也比较有限。此外, 该方法的检测周期长, 不利于生产环节的质控。为了解决这些问题, 本试剂盒利用实时荧光定量 PCR 技术开发的大肠杆菌基因组残留检测试剂盒, 它通过荧光染料实时显示样品模板 DNA 的量, 并通过坐标曲线表示出来, 结果直观准确。它具有下列特点:

1. 即开即用, 用户只需要提供样品 DNA 模板。
2. 引物和探针经过优化, 分析灵敏性高, 可以达到 100 拷贝/ μ L。
3. 提供阳性对照, 便于区分假阴性样品。
4. 特异性高, 引物是根据大肠杆菌 DNA 高度保守区设计, 不会跟其他生物的 DNA 发生交叉反应。
5. 既可用于定性检测, 又可用于定量检测。用于定量检测时线性范围至少为 5 个数量级。
6. 本产品足够 50 次 20 μ L 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。
7. 本产品只能用于科研。

规格及成分

成分	编号	包装
2 \times Probe qPCR MagicMix	60001	0.5 mL
荧光 PCR 专用模板稀释液	60002	1 mL
超纯水	60003	1 mL
大肠杆菌 qPCR 引物-探针混合液	62306-4	150 μ L
大肠杆菌 qPCR 阳性对照(1 \times 10E7 拷贝/ μ L)	62306-5	50 μ L
使用手册		1 份

运输及保存

低温运输, -20℃保存, 保存期限为 12 个月。

本产品仅用于科研

自备试剂	样品 DNA。
使用方法	<p>一、稀释标准曲线样品（以 10E1-10E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释度为例）。由于标准品浓度非常高，因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行，千万不能污染样品或本试剂盒的其他成分）。本产品不提供活体样品做阳性对照，只提供 DNA 片段作为阳性对照。</p> <ol style="list-style-type: none">1. 标记 6 个离心管，分别为 6, 5, 4, 3, 2, 1。2. 用带芯枪头分别加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同）。3. 在 6 号管中加入 5 μL 1\times10E7 拷贝/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1\times10E6 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 1\times10E6 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1\times10E5 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。5. 换枪头，在 4 号管中加入 5 μL 1\times10E5 拷贝/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1\times10E4 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。6. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。 <p>二、样品 DNA 的制备</p> <ol style="list-style-type: none">7. 如果有 N 个样品，最好设置 N+2 个提取，多出的一个是 PC（样品制备阳性对照），一个是 NC（样品制备阴性对照）。可以用 10μL 上步所得 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样，以此作为 PC。另外用水作为 NC。8. 用自选方法纯化样品的 DNA，本试剂盒跟市场上大多数样品 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。 <p>三、Probe qPCR 反应（20μL 体系，在样品制备室进行）</p> <ol style="list-style-type: none">9. 如果做定量分析并且只做 1 次重复，则标记 N+9 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 PCR 阴性对照（用水做模板），6 个用于标准曲线。如果做定性分析并且只做 1 次重复，则标记 N+4 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 PCR 阴性对照（用水做模板），1 个用于 PCR 阳性对照（直接用第 6 步第 4 号管的阳性对照稀释液做模板）。下面只以定量分析为例描述操作步骤。

10. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复。样品管和阴性对照设置完毕后才设置阳性对照，并且阳性对照样品要等所有管子盖上盖子储存好后最后加）：

成分	样品管 N+2 个	PCR 阴性 对照	标准曲线样品管 (1-6 管)
2×Probe qPCR MagicMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
大肠杆菌 qPCR 引物-探针混合液	各 3 μL	3 μL	各 3 μL
N+2 个待测 DNA 样本	各 7 μL	不加	不加
超纯水	不加	7 μL	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 7μL(2 号样到 2 号管, 3 号样到 3 号管...)

11. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR：

过程	温度	时间
预变性	95℃	5 min
PCR 反应 (45 个循环)	95℃	15 sec
	60℃	1 min(采集 FAM 通道的荧光信号)

五、数据处理

12. 如果把本试剂盒用于定量检测，则以阳性对照浓度的 log 值为横轴，以 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的 Ct 值从标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。
13. 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照 Ct 必须大于或等于 40。阳性对照必须有荧光对数增长，有典型扩增曲线，Ct 值应该小于或等于 35。对待测样品，如果其 Ct 大于或等于 40 则为阴性，如果小于或等于 35 则为阳性。如果在 35-40 之间，则重复一次。重复实验的 Ct 值如果大于或等于 40 则为阴性，如果小于 40，则为阳性。

关联产品

大肠杆菌荧光及可视化 LAMP 检测试剂盒