

毕赤酵母宿主细胞 DNA 检测试剂盒

(PCR-荧光探针法)

说明书

目 录

内 容	页 码
■ 试剂盒简介	3
■ 试剂盒成份	3
■ 有效期	3
■ 适用机型	3
■ 实验所需但试剂盒中未含材料	4
■ 相关设备	4
■ 样本前处理（手动操作）	4
■ 毕赤酵母 DNA 检测操作	6
■ 技术参数	8
■ 常见问题	9

毕赤酵母宿主细胞 DNA 检测试剂盒说明书

（PCR-荧光探针法）

■ 试剂盒简介

毕赤酵母宿主细胞 DNA 检测试剂盒是用于定量检测各种生物制品及药品的中间品、半成品和成品中毕赤酵母宿主细胞 DNA 的专用试剂盒。该试剂盒主要由两部分组成：试剂盒 A--样本前处理试剂，试剂盒 B--毕赤酵母 DNA 检测试剂。

样本前处理试剂主要用于初始样本的前期处理，目的是稳定高效的获得毕赤酵母 DNA。针对一些样本中蛋白质浓度高、DNA 残留量低等特点，该组份可以从复杂的基质溶液中将微量的 DNA 进行有效的提取纯化，稳定的回收率保证了检测的准确和稳定。

毕赤酵母 DNA 检测试剂是利用 Taqman 探针原理，定量检测样本中毕赤酵母 DNA。该组份的 DNA 最低检测限可以达到 fg 级别。

本试剂盒可以根据以下内容进行手工操作，也可以适用于 SHENTEK™ 的自动核酸提取仪 rDNApurify。

■ 试剂盒成份

表 1. 试剂盒组份

试剂组份	装量	储存条件
试剂盒 A（样本前处理试剂）		
蛋白酶 K 缓冲液	10ml×1 瓶	室温
结合液	20ml×1 瓶	室温
洗涤液 A	30ml×1 瓶	室温
洗脱液	10ml×1 瓶	室温
稀释液	10ml×1 瓶	室温
磁珠	500μl×1 管	2~8℃
蛋白酶 K	500μl×1 管	-18℃ 及以下
糖原	500μl×1 管	-18℃ 及以下
试剂盒 B（毕赤酵母 DNA 检测试剂 100 tests）		
毕赤酵母 DNA 定量参考品（30ng/μl）	50μl×1 管	-18℃ 以下
毕赤酵母 Primer&Probe MIX	300μl×1 管	-18℃ 以下避光保存
毕赤酵母 qPCR Reaction Buffer	850μl×2 管	-18℃ 以下避光保存
DNA 稀释液	1 ml×3 管	-18℃ 以下

■ 有效期

规定储存条件下 24 个月。

■ 适用机型

本产品适用于 ABI PRISM® 7500 Real-Time PCR System，Mx3000PTM (Stratagene)，CFX96(Bio-Rad)，LineGene 9600(博日)等多种 Real Time PCR 仪。

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 无水乙醇（分析纯）
- 100%异丙醇（分析纯）
- 5M 的 NaCl
- 1M 的 HCl 和 NaOH
- 灭菌超纯水
- 1.5ml 无菌离心管
- PCR 8 连管或 96 孔板，相应管盖或覆膜
- 一次性手套
- 1000μl, 100μl, 10μl 无菌带滤芯枪头

■ 相关设备

- 荧光定量 PCR 仪
- 迷你离心机
- 恒温水浴锅
- 磁性分离架
- 漩涡振荡器
- 1000μl, 200μl, 100μl, 10μl 移液枪
- 超净台

样本前处理（手动操作）

实验前请完整阅读操作说明及注意要点

■ 试剂准备

开启新试剂盒时需完成以下工作：

- 在新开启的**洗涤液 A** 中加入 40ml 的无水乙醇；
- 在干净的离心管中用无水乙醇和灭菌超纯水配制 70%乙醇溶液，标记为**洗涤液 B**；
- 配制后的洗涤液应密封，室温保存，防止乙醇挥发。

每次实验前需预先完成以下工作：

- 准备好 100%的异丙醇；
- 准备好 3 个水浴温度：37℃、55℃、70℃；
- 使用前若发现**结合液**出现结晶或沉淀，应 37℃水浴至完全溶解后，震荡混匀；
- 使用前若发现**蛋白酶 K 缓冲液**出现结晶或沉淀，应 37℃水浴，待完全溶解后，震荡混匀；

■ 样本要求及处理

- 如果待检测样本是生物制品纯化过程中的粗制样本，可能含有较高的 DNA，为了保证检测的准确性，可以用稀释液对样本进行适当比例的稀释后再进行样本纯化处

理；也可以在样本纯化处理完成之后，用 DNA 稀释液对纯化处理后的样本 DNA 进行稀释，然后再进行 DNA 残留检测。

- 若样本为干粉状态，可以用稀释液或其他适合的溶剂进行溶解，再进行下一步操作；或先用适当的试剂将样本溶解，配成高浓度溶液，再用 DNA 稀释液稀释后，进行下一步操作。
- pH 值要求：一般情况下生物制品纯化中间品均为中性环境，若样本的 PH<5 或者 PH>9，会影响样本纯化处理效果，可以用 1M 的盐酸或氢氧化钠调整样本的 PH 至中性后继续操作。
- 阴性质控（NCS）：每次实验中都需要设置一个 NCS 作为空白样本，NCS 与其他待测样本一起进行处理，以检验在样本处理过程中是否存在交叉污染或环境污染。可以以试剂盒中提供的稀释液作为阴性质控，每次取 100μl。
- 阳性质控（PCS）：每次实验中可设置一个 PCS 作为阳性对照样本，PCS 与其他待测样本一起进行处理，以检验样本前处理操作正常。阳性质控可以选择在 100μl 稀释液中加入已知量的毕赤酵母 DNA，建议加入的 DNA 来自于配制好的标曲，如加入 10μl ST2。
- 加样回收质控（ERC）：用 ERC 来评估 DNA 提取的效率、回收率和准确度，并可用 ERC 来评估验证分析方法和系统性能。对具体样品的 DNA 加标量一般设定在样本测试值的 2-10 倍为宜，建议加入的 DNA 来自于配制好的标曲，如加入 10μl ST4。

■ 操作过程

样本消化

1. 每个待检测样本取 100μl 到 1.5ml 干净的离心管中。
2. 每 100μl 样品中加入 10μl 5M NaCl。
3. 加入蛋白酶 K 消化液震荡混匀后，55℃水浴 1 小时。
 单个样本所需的蛋白酶 K 消化液的准备：10μl 蛋白酶 K+100μl 蛋白酶 K 缓冲液

DNA 结合

1. 将磁珠置于室温下，震荡混匀。
 磁珠可以根据实验量提前进行分装，避免环境温度反复导致结合能力降低。
2. 从水浴中取出样本，高速离心 40s，加入工作结合液，震荡混匀。
 单个样本的工作结合液的准备：200μl 结合液+ 9μl 糖原
3. 快速离心 10s 后在样本混合物中分别加入 200μl 异丙醇，10μl 磁珠。
 如果样本较多，每次加入磁珠过程中应再次充分震荡混匀磁珠，以保证每次加入的磁珠量的一致性。
4. 将装有全部混合物的离心管快速震荡 5min，快速离心 5~10s 后静置于磁性分离架上。
 快速离心的目的在于将附着在离心管盖和壁上的混合物甩至管底。
5. 待溶液澄清，磁珠完全分离后，用枪头小心移去上清。
 去除上清时要避免搅动磁珠，避免磁珠同上清一起被去除。

DNA 洗涤

1. 从磁性分离架上将含有磁珠的离心管取下，加入 700μl 洗涤液 A，震荡 10s 混匀；快速离心 5~10s 后，将离心管重置于磁性分离架上，待溶液澄清，磁珠完全分离后，用枪头移去上清液，完成第 1 次磁珠洗涤。

2. 从磁性分离架上取下含有磁珠的离心管，加入 700 μ l 洗涤液 B，震荡 40s 混匀；快速离心 5~10s 后，将离心管重置于磁性分离架上，待溶液澄清，磁珠完全分离后，用枪头移去上清液，完成第 2 次磁珠洗涤。
3. 为保证液体充分移除，可将除去上清的离心管再次快速离心 5s，置于磁性分离架上，待磁珠分离后，用 10 μ l 枪头小心的将残余液体吸除干净。
4. 从磁性分离架上取下离心管，打开管盖将在室温下干燥 30s~3 min，除去乙醇残留。
 干燥时间依具体情况而定，室温较高或空气干燥的环境下可以选择较短干燥时间；而室温较低或空气湿润环境下，干燥时间可以稍长。

DNA 洗脱

1. 沿离心管壁加入 50~100 μ l 洗脱液，轻微震荡 5s 使磁珠和洗脱液混匀，70 $^{\circ}$ C 水浴 7min，水浴过程中可再次震荡混匀 2~3 次。
 震荡后需将残留于管壁上的磁珠和洗脱液轻甩至管底。
 震荡至管盖上的磁珠和洗脱液需快速离心后重新震荡混匀。
2. 孵育完成后，将离心管高速离心 1min，然后静置于磁性分离架上后，待磁珠分离后，用枪头小心转移溶液到干净的离心管中
3. 将上一步获得的样本洗脱液快速离心 10s，然后静置于磁性分离架上，待磁珠分离后，用枪头再次转移溶液到干净离心管，所得即为样本纯化液。
 每次收集洗脱液时，尽量将溶液转移干净。
 样本纯化液可在 2~8 $^{\circ}$ C 短时间保存，请在完成样本纯化处理当天进行 DNA 检测，请勿反复冻融样本纯化液。

■ 操作注意要点

1. DNA 洗涤和洗脱操作时，每次震荡混匀后，都应该短时间快速离心，以保证没有磁珠附着于离心管盖上，迷你离心机的最高转速不低于 6000rpm；
2. 在磁性分离架上分离磁珠时，中途可以适当旋转离心管，使磁珠吸附更加集中。
3. 在去除乙醇干燥时，观察磁珠状态，勿让磁珠太干，以免洗脱时不完全溶解。

毕赤酵母 DNA 检测操作

完成样本前处理后，进行以下步骤

■ 试剂准备

➤ 毕赤酵母 DNA 定量参考品的稀释及标准曲线构建

用试剂盒中提供的 DNA 稀释液将 30ng/ μ l 的毕赤酵母 DNA 定量参考品进行梯度稀释，稀释浓度依次为 300pg/ μ l、30pg/ μ l、3pg/ μ l、300fg/ μ l，30fg/ μ l。

1. 取 6 支干净的 1.5ml 离心管，分别标记为 ST0，ST1，ST2，ST3，ST4，ST5；
2. 在标记好的 6 支管中分别加入 90 μ l DNA 稀释液；
3. 将试剂盒中的毕赤酵母 DNA 定量参考品置于冰上融化，待完全融化后，轻微震荡，短时间快速离心；
4. 取 10 μ l 的毕赤酵母 DNA 定量参考品，加入 ST0 管，震荡混匀；

5. 按表 2 依次进行稀释操作：

表 2. 毕赤酵母 DNA 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度
ST0	10μl 毕赤酵母 DNA 定量参考品+90μl DNA 稀释液	3ng/μl
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℃。
- 试剂盒中的参考品 DNA 每次使用前轻弹混匀，离心 3s 甩至管底。标曲配制过程中，ST0~ST5 每管震荡 3s，离心 3s 甩下去即可，整个过程重复 1~2 遍。

➤ qPCR 反应液的准备

- 计算所需检测反应孔数，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 + 1 个阳性质控 PCS +待测样本×2）×3
- 根据反应孔数计算完成本次检测所需的毕赤酵母 qPCR MIX 总量：
毕赤酵母 qPCR MIX =（反应孔数+2）× 20μl（含有 2 孔的损失量）
- 各试剂置于冰上融化，轻微振荡混匀，按表 3 所示准备毕赤酵母 qPCR MIX：

表 3. 毕赤酵母 qPCR MIX 配制表

组分	单孔反应
毕赤酵母 qPCR Reaction Buffer	17μl
毕赤酵母 Primer&Probe MIX	3μl
总体积	20μl

■ 加样

- 各试剂置于冰上，轻微震荡混匀，按表 4 示例加样。

表 4. 各反应孔加样示例

标准曲线	20μl 毕赤酵母 qPCR MIX + 10μl ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
无模板对照 NTC	20μl 毕赤酵母 qPCR MIX + 10μl DNA 稀释液
阴性质控 NCS	20μl 毕赤酵母 qPCR MIX + 10μl 阴性质控 NCS 纯化液
阳性质控 PCS	20μl 毕赤酵母 qPCR MIX + 10μl 阳性质控 PCS 纯化液
待测样本	20μl 毕赤酵母 qPCR MIX + 10μl 待测样本纯化液
样本 ERC	20μl 毕赤酵母 qPCR MIX + 10μl 样本 ERC 纯化液

- 96 孔板加样完成后体积为 30μl /孔。

表 5. 96 孔板排版示例

S1	S1	S1		S1 ERC	S1 ERC	S1 ERC			NTC	NTC	NTC	A
S2	S2	S2		S2 ERC	S2 ERC	S2 ERC						B
S3	S3	S3		S3 ERC	S3 ERC	S3 ERC			ST1	ST1	ST1	C
S4	S4	S4		S4 ERC	S4 ERC	S4 ERC			ST2	ST2	ST2	D
S5	S5	S5		S5 ERC	S5 ERC	S5 ERC			ST3	ST3	ST3	E
									ST4	ST4	ST4	F
									ST5	ST5	ST5	G
NCS	NCS	NCS		PCS	PCS	PCS						H
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

该示例表示的是检测 5 个浓度梯度的毕赤酵母 DNA 标准曲线 (ST1~ST5)、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、1 个阳性质控 PCS、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。

- 将 96 孔板用光学膜封闭, 短时间快速离心 10s 后放入 qPCR 仪。

■ 技术参数

➤ 程序参数设置

以 AB 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 1.4 为例

- 创建空白新程序, 选择绝对定量检测模板。
- 创建新检测探针, 命名为毕赤酵母-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。
- 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。

➤ qPCR 结果分析

以 AB 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 1.4 为例。

- 在 Results 的 Amplification Plot 面板中, 将 Threshold 设置为 0.02, Baseline 设置为自动, 点击 Analyze, 此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常。
- 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。
- 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、阳性质控 PCS 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、PCS、S、ERC, 之后点击 .
- 在 Results 的 Standard Curve 面板中, 可读取标准曲线的斜率 (Slope)、截距 (Intercept)、 R^2 。
- 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、阳性质控 PCS、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。
- 无模板对照 NTC、阴性质控 NCS 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值 $\geq$ 35。

■ 常见问题

常见问题	可能原因	解决方案
纯化回收量低	洗涤液 A 中未加入乙醇	按照说明书中加入无水乙醇
	洗涤后磁珠过干，影响 DNA 洗脱	磁珠干燥时间不要过长，室温较高或空气干燥的环境下30s~1min即可，室温较低或空气湿润环境下，干燥1~3min
	洗脱时磁珠附着于管壁，洗脱液与磁珠未能充分混匀	将已加入洗脱液的离心管置于漩涡震荡器上振荡，使磁珠从管壁上脱落且与洗脱液混匀；如操作后磁珠仍附着于管壁，可将离心管70℃水浴2min 后于漩涡震荡器上振荡，直至磁珠与洗脱液混匀
	磁珠吸附力下降	预先分装磁珠，37℃反复加热不要超过 5 次
	样品蛋白含量高	可相应增加蛋白酶 K 用量和消化时间，样本含量高于 100mg/ml 时，建议每个样本加入 20 μ l 蛋白酶 K
	样本盐离子浓度较低	用 NaCl 调节盐离子浓度
	样本 pH 值过低	调整样本 pH 到中性范围
	洗涤过程中磁珠有损失	洗涤过程中如发现磁珠吸附位置太过靠近管底，可轻柔吹打几次，使管底磁珠往上吸附
回收结果不稳定	磁珠保存于-18℃及以下导致磁珠性能下降	在 2~8℃保存磁珠，尽量避光
	加标不准确或洗脱液体积吸取不准确	定期校准移液枪，保证移液枪准确度
	洗脱后纯化液中残留磁珠	对仍有磁珠残留，可重复离心一次，吸取上清
无检测结果	报告荧光设置错误	设置正确的检测报告荧光
标准曲线异常	分析参数设置	说明书中参数设置为 7500 标准参数；若检测机型不同，可以由仪器自动判读后，调整 threshold。
	用水稀释标准参考品，会造成低浓度不稳定	使用试剂盒提供的 DNA 稀释液

手动操作流程说明：(具体准备及操作细节请见第 4 页)

