天净沙系列

CAT#:15-174-resiD-yd

低温运输，-20℃保存

天净沙

2020 年中国药典外源性 DNA 残留量测定试剂盒（毕赤酵母，定量 PCR 探针法）

Pichia pastoris Probe qPCR Kit

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是根据 2020 中国药典开发，专门用于检测样品中毕赤酵母细胞基因组 DNA 残留的试剂盒。PCR 反应过程中可通过荧光标记的特异性探针或荧光染料掺入而检测 PCR 产物量，通过连续监测反应体系中荧光数值的变化，可即时反映特异性扩增产物量的变化。在反应过程中所释放的荧光强度达到预设的阈值时，体系的 PCR 循环数（Ct 值）与该体系所含的起始 DNA 模板量的对数值呈线性关系。采用已知浓度的 DNA 标准品，依据以上关系，构建标准曲线，对特定模板进行定量分析，测定供试品中的外源 DNA 残留量。本产品它具有下列特点：

1. 根据中国药典开发，达到合规要求。
2. 即开即用，用户只需要提供待测样本。
3. 本产品提供满足 2020 年中国药典要求的毕赤酵母专一性 PCR 引物和质粒标准品。但本试剂不提供灭活的毕赤酵母。
4. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的探针法 qPCR 反应。
5. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用五孔盒包装

成分	编号	规格	包装
2×Probe qPCR MasterMix	981201	0.5 mL	0.5 mL 本色管
1× TE 缓冲液，pH8.0	6-3542	1 mL	1.5 mL 本色管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
毕赤酵母 DNA 测定 引物-探针干粉	yp15-174-resiD-yd	50 次	0.5 mL 棕色管
毕赤酵母 DNA 标准品溶液（10 ng/μL）	pc174-resiD-yd	50 μL	0.5 mL 黄盖管
使用手册	15-174-resiD-yd sc	1 份	无

注意：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 165 μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20℃保存。

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。

自备试剂

样品 DNA，无核酸酶水。

使用方法

一、供试品处理

1. 可根据需要对供试品进行稀释，也可按碘化钠沉淀法或磁珠法等方法浓缩纯化 DNA。碘化钠沉淀法药典要求进行。

二、DNA 标准品溶液的配制

2. 用 TE 缓冲液将 DNA 标准品溶液稀释成 1000 pg/μL、100 pg/μL、10 pg/μL、

1 pg/μL、0.1 pg/μL、0.01 pg/μL、0.001 pg/μL 的系列浓度梯度，或其他适宜的浓度范围。DNA 标准品溶液含量在 0.01-100 pg/μL 范围内本法线性较好。

三、DNA 浓缩/纯化

3. 按药典要求进行 DNA 浓缩及纯化步骤，本试剂盒不提供相关试剂。

四、检测（定量 PCR 法）

4. 配制 PCR 反应体系：吸取 DNA 标准品溶液和抽提后的 DNA 样品溶液，配制 PCR 反应体系。每个 20 μL PCR 反应体系所需的成分如下：

成分	体积
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL
毕赤酵母 DNA 测定 引物-探针混合液	各 3 μL
超纯水	不加
DNA 模版 （标准品或供试品溶液）	7 μL

5. 配制不含 DNA 模板的 PCR 反应混合液：于 96 孔反应板中分别加入 13 μL PCR 模板混合液（2×Probe qPCR MasterMix 10 μL，毕赤酵母 DNA 测定引物-探针混合液 3 μL），再移取无核酸酶水、DNA 样品、稀释的 DNA 标准品各 7 μL 至 96 孔反应板中，每个样品做 3 个复孔。另取无核酸酶水 20 μL，做 3 复孔为阴性对照。
6. 反应板覆盖光学盖膜后，离心去除气泡。将反应板放置在荧光定量 PCR 仪中运行反应，设定如下参数（样品体积 20 μL）：

过程	温度	时间
预变性	95℃	10 min.
PCR 反应 （45 个循环）	95℃	15 sec.
	60℃	60 sec（采集 FAM 通道的荧光信号，淬灭基团为 TAMRA）

五、结果计算

7. 取第 3 到 15 次循环的荧光强度均值加 10 倍标准差，或采用阴性对照荧光值的最高点作为荧光阈值。以至少 5 个连续标准品溶液浓度点生成标准曲线，R2 值应≥0.98，斜率应在-3.1 至-3.8 范围内；
8. 标准品溶液浓度最低点的 Ct 值，不得高于 39。阴性对照组若有 Ct 值时，不得低于标准品溶液浓度最低点的 Ct 值；每组加标样品的回收率应在 50%～150%之间，RSD≤30%。
9. 适当情况下，可剔除第一个或者第六个点，以连续 5 个标准品溶液浓度点生成标准

	曲线，系统适用性仍应满足以上条件。以标准品溶液浓度的对数值对其相应的 Ct 值作直线回归，求得直线回归方程，供试品溶液的 Ct 值代入直线回归方程，求出供试品中 DNA 残留量。 **六、注意事项** 10. 当 DNA 残留量低于标准曲线最低浓度点时，应为限量测定。 11. 供试品首次应用本法测定时需要进行方法学验证，验证内容至少包括精密度试验和回收率试验。若供试品干扰回收率和精密度，应采用适宜方法稀释或纯化 DNA 以排除干扰，直至精密度试验和回收率试验均符合要求。需要纯化 DNA 后再进行测定的供试品，每次测定均应从纯化步骤起增加回收率试验，并用回收率对测定结果进行校正。 12. 引物及探针设计：建议针对具有种属特异性的高度重复序列进行设计。设计的引物及探针应经过验证，其灵敏度、特异性、重复性、精确性能够达到要求。 13. PCR 反应体系及反应条件可按照具体使用的仪器及试剂进行相应的调整，实验应在符合检测要求的洁净条件下进行，排除核酸和核酸酶的污染。
关联产品	毕赤酵母可视化染料-荧光染料 LAMP 试剂盒