



产品使用说明书

Rhinogen[®] *E.coli* 细胞残留 DNA 检测试剂盒

货号：RA-IP13



目 录

目 录	1
产品信息	2
试剂包装	2
产品介绍	2
存储条件	2
操作方法	3
设备准备	3
适用机型	3
<i>E.coli</i> DNA 定量参考品的稀释及标准曲线的制备	3
加样回收质控 ERC 的制备	3
阴性质控 NCS 的制备	4
qPCR 反应体系	4
qPCR 反应的加样	4
qPCR 仪运行程序设置	4
qPCR 结果分析	5
操作说明	5
相关产品	6
联系我们	7

产品信息

试剂包装 Rhinogen® *E.coli* 残留 DNA 检测试剂盒包装规格如下:

名称	货号	规格
<i>E.coli</i> 残留 DNA 检测试剂盒	RA-IP13	100T
试剂盒组分:		
<i>E.coli</i> DNA 定量参考品	RA-IP13A	50µl*1vial
<i>E.coli</i> qPCR Master Mix	RA-IP13B	1.5ml*1vial
<i>E.coli</i> 引物探针混合液	RA-IP13C	500µl*1vial
DNA 稀释液	RA-IP13D	1.5ml*3vials

产品介绍 Rhinogen® *E.coli*残留DNA检测试剂盒本试剂盒利用Taqman 荧光探针原理，定量检测各种生物制品及药品的中间品、半成品和成品中残留的*E.coli* DNA，检测快速、特异性强、检测灵敏度高，最低检测限可以达到fg 级别。试剂盒配套有*E.coli* DNA定量参考品，已溯源至国家标准品。

本检测方法可溯源至中国药典方法，通则<3407>。

存储条件 采用干冰运输，收到产品后请立即置于-18℃及以下存储，有效期为12个月。

注：*E.coli* 引物探针混合液需要避光存储。

操作方法

- 设备准备**
- ✓ 荧光定量 PCR 仪;
 - ✓ 掌上离心机;
 - ✓ 涡旋混合仪。

- 适用机型**
- ✓ 7500 Real-Time PCR System (AB);
 - ✓ StepOne Plus Real-Time PCR System (AB);
 - ✓ 7300 Plus Real-Time PCR System (AB);
 - ✓ QuantStudio 3 Real-Time PCR System (AB);
 - ✓ QuantStudio 5 Real-Time PCR System (AB);
 - ✓ 耶拿荧光定量 PCR 仪 qTOWER3 系列;
 - ✓ SLAN 96S;
 - ✓ LineGene9600 (博日)。

注：其他机型可按照说明书试用。

E. coli

DNA 定量参考品的稀释及标准曲线的制备

E. coli 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 *E. coli* DNA 定量参考品进行梯度稀释，稀释浓度依次为 3000pg/μl、300pg/μl、30pg/μl、3pg/μl、0.3pg/μl、0.03pg/μl。具体操作如下：

1. 将试剂盒中的 *E. coli* DNA 定量参考品和 DNA 稀释液从-20°C取出后置于冰上融化，待完全融化后，轻微振荡混匀，快速离心 5s;
2. 取 6 支低吸附离心管，分别标记为 ST0、ST1、ST2、ST3、ST4、ST5;
3. 每管分别加入 90μl DNA 稀释液;
4. 取 10μl 的 *E. coli* DNA 定量参考品，加入 ST0 管，振荡混匀后短时间快速离心 5s，重复 3 次以确保定量参考品与 DNA 稀释液充分混匀;
5. 按下表依次进行 6 次稀释操作，稀释步骤同 4。

稀释管	稀释步骤	浓度 (pg/μl)
ST0	10μl DNA 定量参考品+ 90μl 稀释液	3000
ST1	10μl ST0 + 90μl 稀释液	300
ST2	10μl ST1 + 90μl 稀释液	30
ST3	10μl ST2 + 90μl 稀释液	3
ST4	10μl ST3 + 90μl 稀释液	0.3
ST5	10μl ST4 + 90μl 稀释液	0.03

注：1) 已融化未使用的 DNA 稀释液可暂存于 2~8°C，保存期限不超过 7 天;

2) 标准品现用现配。

加样回收质控 ERC 的制备

根据需要设置 ERC 中的 *E. coli* DNA 加标量（建议加标量设定为其样品历史无加标测试值的 2-30 倍），以制备加 30pg *E. coli* DNA 量的供试品 ERC 为例，具体操作如下：

1. 取 100μl 供试品加入 1.5ml 低吸附离心管中;
2. 加入 10μl ST3，混匀，标记为供试品 ERC;

3. 样本 ERC 与同批供试品一起进行前处理，制备成供试品 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 供试品基质溶液（或样本稀释液）加入 1.5ml 低吸附离心管中，标记为阴性质控 NCS；
2. 阴性质控 NCS 和同批供试品一起进行前处理，制备成阴性质控 NCS 纯化液。

qPCR 反应体系

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：
反应孔数=（5 个浓度梯度的标准曲线样品+1 个空白对照 BLK+1 个阴性质控 NCS+供试品+供试品 ERC）×3
2. 根据反应孔数计算本次所需的 *E.coli* qPCR Master Mix 和 *E.coli* 引物探针混合液的总量：
E.coli qPCR Master Mix 用量=（反应孔数+2）×15μl
E.coli 引物探针混合液用量=（反应孔数+2）×5μl
3. 各试剂置于室温融化后，计算所需 *E.coli* 引物探针混合液与 *E.coli* qPCR Master Mix 的用量，然后将两试剂混合，配制所需要的反应混合液，轻微振荡混匀，快速离心 5 秒，然后按照下表所示加样：

标准曲线	20μl 反应混合液+ 10μl ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
BLK	20μl 反应混合液+ 10μl DNA 稀释液
NCS	20μl 反应混合液+ 10μl NCS 纯化液
供试品 SAM	20μl 反应混合液+ 10μl DNA 待测样本纯化液
供试品 ERC	20μl 反应混合液+ 10μl 样本 ERC 纯化液

qPCR 反应的加样

1. 取 96 孔 PCR 板，在所需各孔内先加入 20μl 反应混合液；
2. 按照下表，分别加入 BLK、NCS、SAM、ERC，并依次从高到低加入 10μl ST1、ST2、ST3、ST4、ST5 DNA 标准品溶液，所有加样均为 3 复孔；

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	BLK	BLK							ST1	ST1	ST1
B	NCS	NCS	NCS							ST2	ST2	ST2
C	SAM1	SAM1	SAM1							ST3	ST3	ST3
D	SAM2	SAM2	SAM2							ST4	ST4	ST4
E	SAM3	SAM3	SAM3							ST5	ST5	ST5
F	ERC1	ERC1	ERC1									
G	ERC2	ERC2	ERC2									
H	ERC3	ERC3	ERC3									

3. 粘性膜封板，离心，确保试管中无气泡，待测；
4. 也可使用专用的 qPCR 微量反应管，加样方式同上。加样后盖紧试管盖离心，确保试管中无气泡，待测。

qPCR 仪运行程序设

以 AB 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 2.0 为例：

1. 创建新运行程序，实验类型选择定量—标准曲线，试剂类型选择 TaqMan；

-
- 置**
2. 选择检测探针, 命名为 *E.coli*-DNA, 选择荧光报告基团为 FAM, 淬灭基团为 TAMRA;
 3. 根据样品加样位置选择相应孔位, 标准品在 Task 一栏设置为 Standard, 并在 Quantity 一栏中输入对应的浓度 (单位为 pg/μl), 其余测试品在 Task 一栏均设置为 Unknown;
 4. 检测参比荧光为 ROX;
 5. 设置三步法反应程序: 37°C 2min; 95°C 30s; 95°C 10s, 60°C 30s 采集荧光, 40 个循环; 反应体积为 30μl。
-

- qPCR 结果分析**
- 以 AB 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 2.0 为例:
1. 在 Analysis 的 Amplification Plot 面板中, 将 Threshold 设置为 0.2, 点击 Analyze, 此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常;
 2. 在 Analysis 的 Standard Curve 面板中, 可读取标准曲线的斜率 (Slope)、截距 (Intercept)、R²;
 3. 在 Analysis 的 Amplification Plot 面板中选择 View Well Table 窗口, Quantity 一栏可读取无模板对照 BLK、阴性质控 NCS、待测样本、样本 ERC 的检测值, 单位为 pg/μl;
 4. 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;
 5. 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;
 6. 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 BLK 的检测结果应为 Undetermined 或 ct 值比 ST5 ct 值靠后 3 个 ct。
-

- 操作说明**
- ✓ 本产品仅供研究使用, 不适于人或 本产品仅供研究使用, 不适于人或动物的诊断及治疗用途。
-

相关产品

产品名称	货号
CHO 宿主细胞蛋白检测试剂盒	RA-IP01
宿主细胞残留 DNA 提取试剂盒（磁珠法）	RA-IP11
CHO 细胞残留 DNA 检测试剂盒	RA-IP12
HEK293 细胞残留 DNA 检测试剂盒	RA-IP14
毕赤酵母残留 DNA 检测试剂盒	RA-IP15
Vero 细胞残留 DNA 检测试剂盒	RA-IP16
SV40LTA&E1A 残留 DNA 检测试剂盒	RA-IP17
质粒 DNA 残留检测试剂盒	RA-IP18
E1A 残留 DNA 检测试剂盒	RA-IP19
E1B 残留 DNA 检测试剂盒	RA-IP20
HEK293 残留 DNA 片段化分析检测试剂盒	RA-IP21
rcAAV-5/N 检测试剂盒（PCR-荧光探针法）	RA-IP22
RCL 基因拷贝数检测试剂盒（RT-PCR 荧光探针法）	RA-IP23
宿主细胞残留 DNA 提取试剂盒（磁珠法-手动/自动）	RA-IP24
宿主细胞残留 DNA 提取试剂盒（预装）	RA-IP25
磁力架	RA-IP26
全自动核酸提取仪	RA-IP27

联系我们

如果您需要帮助，我们的客户支持专家可以通过电话和 email 为您提供帮助：

- 电 话: [0512-87663137](tel:0512-87663137)
 - 技术支持: techserv@rhinobio.com
-

RHINO BIO



上海瑞诺生物科技有限公司
苏州瑞特佰生物科技有限公司
网 址: www.rhinobio.com
电 话: 0512-87663137
邮 箱: techserv@rhinobio.com



公众号



联系客服

