

# 大肠杆菌 DNA 残留检测试剂盒说明书

产品编号：006.25416

规格：100T

## 应用范围

本试剂盒基于高度敏感的 Taqman 探针法，设计针对大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 基因组序列设计引物及 Taqman 探针，可用于定量分析各种生物制品的中间品、半成品和成品中的大肠杆菌残留 DNA 含量，可检测出微量的 DNA 残留 (10fg/ul)。

## 试剂盒组成

名称	规格	数量	储存
qPCR Mix (2×)	1ml	1	-20°C
<i>E. coli</i> Primer and Probe Mix	300ul	1	-20°C
Nuclease-Free Water	10ml	1	-20°C
<i>E. coli</i> DNA Control (10ng/ul)	50ul	1	-20°C

## 保存条件及有效期

试剂盒在 -20°C 保存，有效期 1 年。

## 适用仪器

包括但不限于 ABI 系列、iCycler、Roche 等基于 Taqman 技术原理设计的荧光检测仪及相应软件。

## 操作说明

### 1. *E. coli* DNA Control 定量参考品的稀释及标准曲线的制备

使用试剂盒提供的 Nuclease-Free Water 将 *E. coli* DNA Control 进行梯度稀释，稀释浓度依次为 1ng/ul、100pg/ul、10pg/ul、1pg/ul、100fg/ul、10fg/ul；

- 1) 将 *E. coli* DNA Control 置于冰上完全融化，涡旋混匀，低速离心 10s；
- 2) 取 6 支干净的 1.5ml 离心管，分别标记 Std0、Std1、Std2、Std3、Std4、Std5；
- 3) 标记为 Std0 的管中加入 90ul Nuclease-Free Water 和 10ul 的 *E. coli* DNA Control (10ng/ul)，涡旋混匀 1min，此时 Std0 的浓度为 1ng/ul，可置于 -20°C 保存，使用时避免反复冻融。
- 4) 在 Std1、Std2、Std3、Std4、Std5 管中加入 90ul 的 Nuclease-Free Water，再进行梯度稀释，具体稀释如下：

稀释管	稀释比例	浓度 (fg/ul)
Std1	10ul Std0+90ul Nuclease-Free Water, 涡旋混匀 1min	100000
Std2	10ul Std1+90ul Nuclease-Free Water, 涡旋混匀 1min	10000
Std3	10ul Std2+90ul Nuclease-Free Water, 涡旋混匀 1min	1000

Std4	10ul Std3+90ul Nucelase-Free Wate, 涡旋混匀 1min	100
Std5	10ul Std4+90ul Nucelase-Free Wate, 涡旋混匀 1min	10

## 2. 反应体系

组分	体积 (ul)
E. coli qPCR Mix (2×)	10
E. coli Primer and Probe Mix	3
DNA Template	7
Total	20

注:

- 每个样本设置 3 个复孔, 根据反应孔数配制 Mix 混合液总量: Mix 混合液 = (反应孔数 + 2) × (10+3) ul (含有 2 孔的损失量)
- 阴性对照孔: Nucelase-Free Wate, 待测样品孔: 可做预实验确定大致浓度范围, 如样本浓度高于标准曲线最高检测限, 可用 Nucelase-Free Wate 进行稀释。

## 3. PCR 扩增 (FAM 通道)

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95℃	10min	1
变性	95℃	15s	50
退火/延伸 (收集荧光)	60℃	1min	

## 结果分析

### 1. 标准曲线绘制:

以标准品的浓度 C 的对数为 X 轴, Ct 值为 Y 轴作标准曲线, 可使用 Excel 或 ELISACalc 软件计算。

示例:

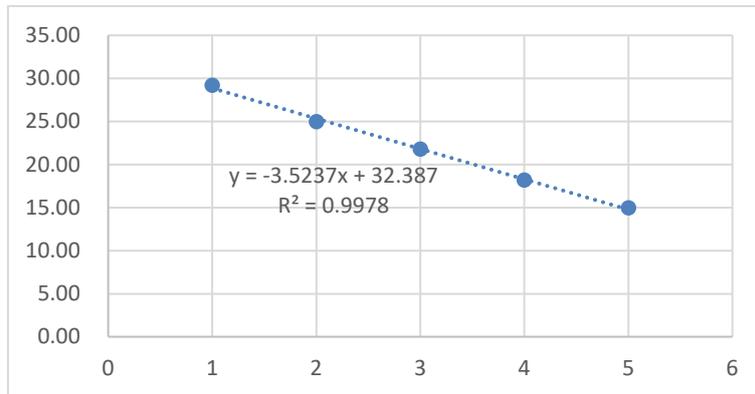
各标准品浓度对应的 Ct 值如下:

浓度 (fg/ul)	10	100	1000	10000	100000
Ct	29.18	24.98	21.77	18.20	14.95

以标准品的浓度 C 的对数 lg(C) 为 X 轴, Ct 值为 Y 轴

Lg(C)	1	2	3	4	5
Ct	29.18	24.98	21.77	18.20	14.95

制作标准曲线, 计算线性回归方程  $y=ax+b$ ,  $R^2$



### 2. 待测样品浓度计算:

将待测样品浓度的 Ct 均值带入方程中, 计算:

$$X_{\text{待测}} = (Ct_{\text{待测}} - b) / a;$$

然后根据 X 值计算待测样品的浓度:

$$C_{\text{待测}} = 10^{(X_{\text{待测}})} \times \text{稀释倍数 pg/ul}$$