



E.coli 残留 DNA 检测试剂盒 (LAMP 荧光探针法)

E.coli Residual DNA Detection Kit
(Fluorescent LAMP)

✉ info@ezassay.com

🌐 www.ezassay.com

深圳易致生物科技有限公司

目录编码: ECO-DNA-LAM-100

目录 CONTENTS

内容	页码
产品简介	1
试剂盒组成	1
储存	1
需要但未提供的试剂	1
相关设备	2
检测步骤	2

产品简介

Product Introduction

易致生物E.coli 残留 DNA 检测试剂盒是用于定量检测各种生物制品的中间品、半成品和成品中 E.coli 宿主细胞 DNA 的专用试剂盒。本试剂盒恒温荧光探针原理，定量检测样品中 E.coli 残留 DNA。检测快速，专一性强，性能可靠，最低检测限可以达到 fg 水平。

试剂盒配套有 E.coli DNA 定量参考品，已溯源至国家标准品。本试剂盒与宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒配套使用，可准确定量样品中 E.coli 残留 DNA。

试剂盒组成

Materials supplied

组分	货号：ECO-DNA-LAM-100 体积(规格：100T)
E coli DNA定量参考品 (30ng/μL)	500 μL
DNA稀释液	1000 μL
E coli残检溶液A	1000 μL*2
E coli残检溶液B	100 μL

储存

Storage

-20°C避光保存，有效期2年。

需要但未提供的试剂

Other materials required

- 1、1.5 mL 或 2.0 mL 无菌低吸附离心管
- 2、八联管或 96 孔 qPCR 板
- 3、1000 μL, 100 μL, 10 μL 无菌低吸附带滤芯枪头
- 4、PCR 水

相关设备

Related Equipment

- 1、荧光定量 PCR 仪
- 2、超净台或生物安全柜
- 3、迷你离心机
- 4、微孔板离心机
- 5、漩涡振荡器
- 6、移液枪

适用机型（包括但不限于）

Bio-Rad: CFX96 Optic Module;

Thermo Scientific: ABI 7500; ABI Quant Studio 5; ABI Step OnePlus

杭州博日科技: LineGene 9600 定量 PCR 系统

检测步骤

Assay procedure

一、E.coli DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

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3 ng/ μ L、300 pg/ μ L、30 pg/ μ L、3 pg/ μ L、300 fg/ μ L、30 fg/ μ L。具体操作如下：

- 1、将试剂盒中的E.coli DNA定量参考品和DNA稀释液置于冰上或2-8 $^{\circ}$ C条件下融化，待完全融化后，轻弹数下混匀，短时间快速离心3~5 s，如此重复3次。
- 2、取6支干净的1.5 mL离心管，分别标记为ST0，ST1，ST2，ST3，ST4，ST5。
- 3、在ST0管中用DNA稀释液将DNA定量参考品稀释至3 ng/ μ L，振荡混匀后短时间快速离心3~5s，重复3次以确保定量参考品与DNA稀释液充分混匀。
- 4、在ST1，ST2，ST3，ST4，ST5管中分别加入90 μ L DNA稀释液。
- 5、按下表依次进行5次稀释操作。

稀释管	稀释体积	浓度
ST1	10 μ L ST0+90 μ L DNA Dilution Buffer	300 pg/ μ L
ST2	10 μ L ST1+90 μ L DNA Dilution Buffer	30 pg/ μ L

ST3	10 μL ST2+90 μL DNA Dilution Buffer	3 pg/μL
ST4	10 μL ST3+90 μL DNA Dilution Buffer	300 fg/μL
ST5	10 μL ST4+90 μL DNA Dilution Buffer	30 fg/μL

注：

*已融化未使用的 DNA 稀释液可暂时保存于2-8°C，若长时间不用，请放置于-20°C。

**若DNA稀释液中有析出，建议于37°C条件下进行孵育。

***标准曲线浓度点可根据实际验证结果选择，应至少有5个浓度点。

二、加样回收质控ERC的制备

根据需要设置 ERC中的E.coli DNA加样浓度（以制备加30 pg E.coli DNA量的样品ERC为例），具体操作如下：

- 1、取100 μL待测样品加入1.5 mL干净离心管；
- 2、再加入10 μL ST3，混匀，标记为样品ERC。

三、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100 μL DNA稀释液加入1.5 mL干净的离心管中，标记为阴性质控NCS。

四、检测反应的配制和加样

1、根据所要检测的标准曲线及待测样品数量，计算所需反应孔数，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 +待测样品 ×2）×3；（每个待测样本都应同时作样品ERC）；

2、根据反应孔数计算本次所需的E coli残检溶液MIX总量：

E.coli残检溶液MIX=（反应孔数+2）×（19μL E.coli残检溶液A+1 μL残检溶液B）（含有2孔损失量）

3、加样示例如下表所示：

标准曲线	20μL E.coli残检溶液MIX+5 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
无模板对照NTC	20μL E.coli残检溶液MIX+5 μL DNA稀释液
阴性质控NCS	20μL E.coli残检溶液MIX+5 μL阴性质控NCS纯化液
待测样品	20μL E.coli残检溶液MIX+5 μL待测样品纯化液
样品 ERC	20μL E.coli残检溶液MIX+5 μL样品ERC纯化液

按下表进行上机：

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

S=Sample; NTC=No Template Control; NEC=Negative Extraction Control;
ERC=Extraction/Recovery Control

*****该表是检测5个浓度梯度的E.coli DNA标准曲线（ST1~ST5）、1个无模板对照NTC、1个阴性质控NCS、5个待测样品（S1~S5）和每个样品的ERC（S1 ERC~S5 ERC）。每个检测做3个重复孔。实际检测时可根据样品多少，参照此示例进行96孔板排版加样。

3、将96孔板用光学膜封闭，轻微震荡混匀，短时间快速离心10 s后放入qPCR仪；设置程序：65°C 40min，每min采集荧光。

五、结果与分析

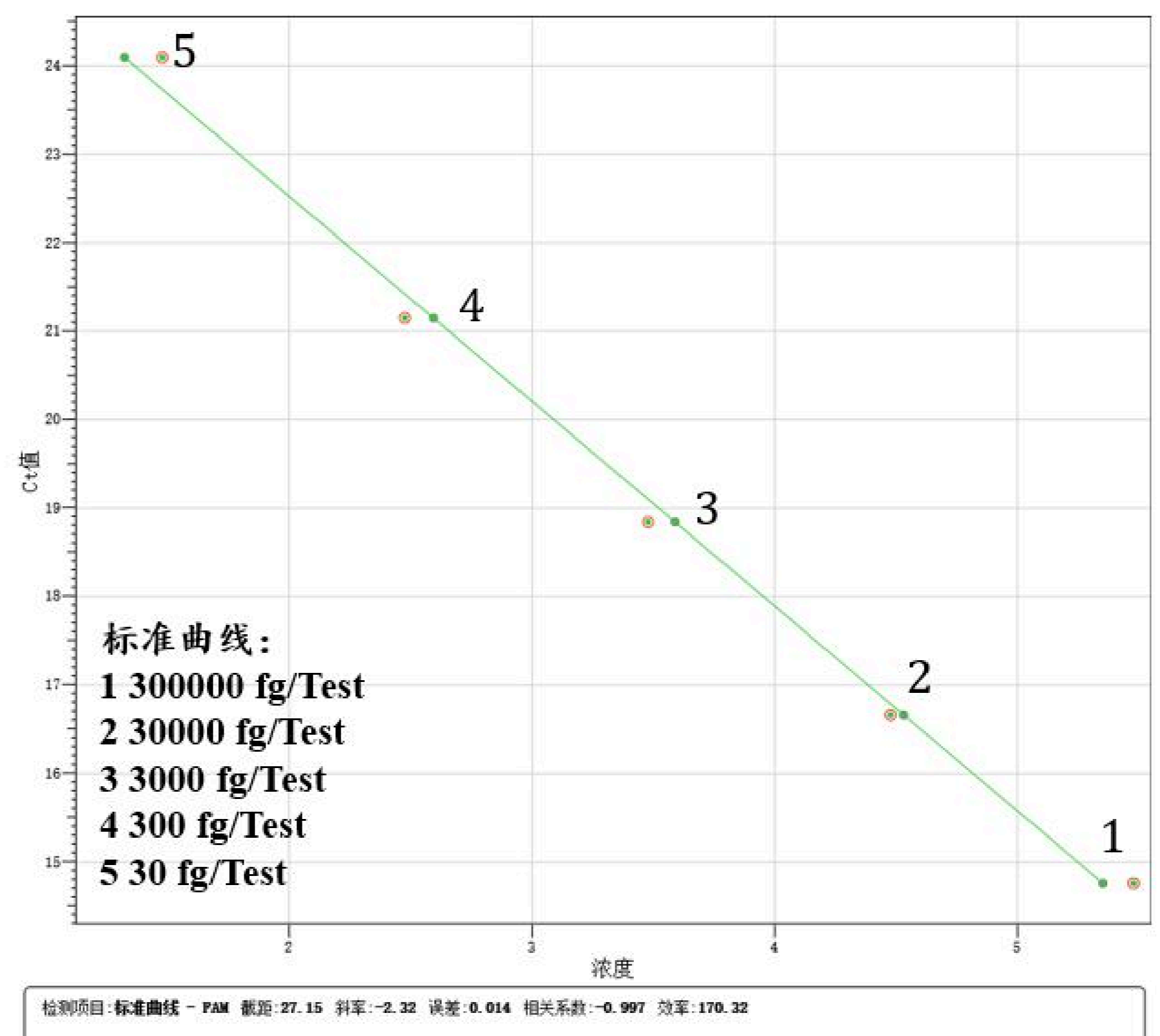
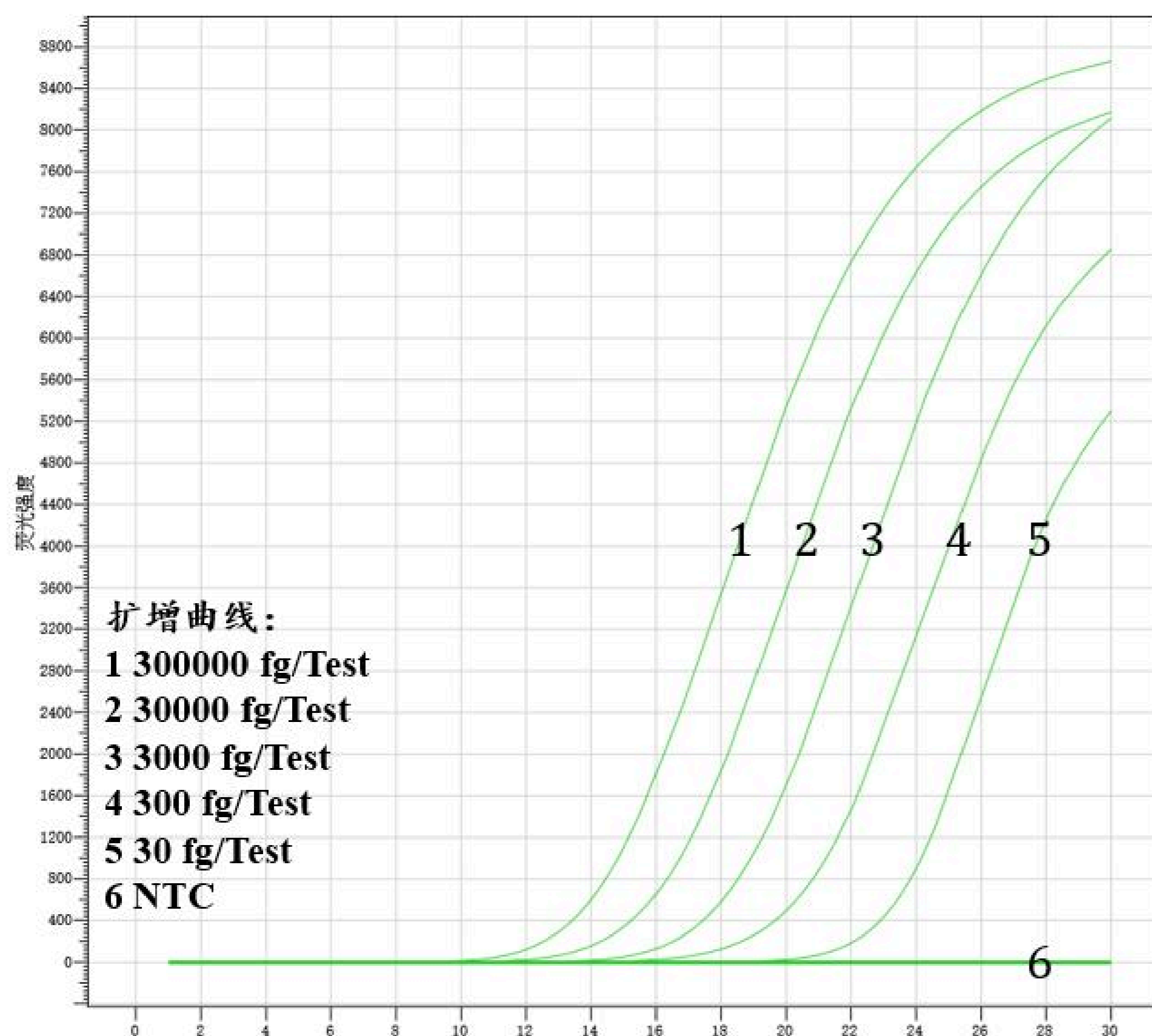
以 ABI7500, 7500 software v2.4 为例:

- 1、新建实验 (New experiment) , 输入实验名称, 选择标曲定量模式 (Quantitation Standard Curve) , TaqMan reagents 和 Standard 模式;
- 2、在 Plate Setup 界面自命名 Target Name, 选报告荧光基团 (Reporter) 为 FAM, 淬灭基团 (Quencher) 为 None;
- 3、在 Plate Setup 界面, 将标准曲线孔 Task 栏设置为 “ST1、ST2、ST3、ST4、ST5” , 在 Quantity 栏按照浓度梯度分别设置为 300000、30000、3000、300、30 (即 DNA 浓度单位为 $\text{fg}/\mu\text{L}$) ;
- 4、设定靶标: 根据实验需要进行排板, 尽量将定量参考品和阴性及待测样品分开排布, 以防加样污染影响检测结果
- 5、分析设定: ABI7500 的设置基线 (baseline) 为自动基线 (Auto Baseline) 。

其他机型结果分析: 参数设置需要依据具体机型及软件版本, 一般也可由仪器自动判读;

- 1、标准曲线判定标准: $R^2 \geq 0.98$, $\text{Eff}\% = 90 \sim 110\%$;
- 2、NTC 的检测结果显示应为 Undetermined 或 Ct 值 > 35 ;
- 3、NEC Ct 值大于标曲最低浓度 Ct 值;
- 4、根据标准曲线计算待测样本浓度 ($\text{pg}/\mu\text{L}$ 或 $\text{fg}/\mu\text{L}$) : 待测样品的 Ct 值只根据标准曲线有效范围内可用于浓度计算。请勿使用标准曲线有效范围之外的 Ct 值计算待测样本的浓度;
- 5、根据待测样本和样本 ERC 的检测结果显示计算加样回收率, 加样回收率要求在 $50\% \sim 150\%$ 之间。

六、结果示例



核酸与蛋白产品专业提供商
Professional supplier of point-of-care test products

 深圳易致生物科技有限公司

 www.ezassay.com
 info@ezassay.com