

## PerfectStart® *Pichia* DNA Quantification Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号: DH141

版本号: Version 1.0

保存: -20°C保存两年。

### 产品说明

本产品用于对各类生物制品中的毕赤酵母DNA进行定量检测。

本产品原理为利用在PCR体系中加入荧光探针(TaqMan或Molecular Beacon等),扩增过程中其荧光量与扩增产物量成正比,通过荧光量的检测测定样品核酸量。本产品中的*Pichia* qPCR SuperMix (2×)含PerfectStart Taq热启动酶(利用3种单克隆抗体与Taq DNA Polymerase高效结合,有效地封闭了DNA聚合酶活性,阻止了低温下的非特异性扩增)、针对毕赤酵母DNA检测特殊优化的qPCR反应缓冲液、dNTPs、PCR增强剂、稳定剂。此外,本反应液引入了dUTP/UDG系统,可在反转录前降解含U的ssDNA和dsDNA,消除由PCR产物导致的交叉污染。

### 特点

- 3种抗体封闭,特异性高,灵敏度高,扩增效率高,适用样品范围广。
- 特殊优化的qPCR反应缓冲液,可提供更高的延伸速度、灵敏度和特异性。
- 使用UDG酶和dUTP,有效防止PCR产物的交叉污染,数据准确。

### 产品组成

组分名称	DH141-01	主要成分
<i>Pichia</i> qPCR SuperMix (2×)	2× 750 μl	PCR酶、dNTPs、镁离子、PCR缓冲液等
6× <i>Pichia</i> 引物探针混合液	500 μl	毕赤酵母 DNA引物探针
<i>Pichia</i> DNA标准品 S0	500 μl	毕赤酵母 DNA
标准品稀释液	3× 1 ml	
无核酸酶的水	1 ml	

**适用仪器:** 适用但不限于ABI系列、Bio-Rad CFX系列、博日LineGene 9600 Plus等荧光PCR仪。

### 检验方法

#### 1. 标准曲线样品准备 (在样品处理区进行)

- (1) 取出试剂盒中*Pichia* DNA标准品S0以及标准品稀释液,冰上放置待完全融化后,轻柔振荡混匀瞬时离心;
- (2) 梯度稀释:取干净1.5 ml离心管5支,标为S1、S2、S3、S4、S5,并在每管中加入90 μl标准品稀释液。从S0中取10 μl加至S1中,振荡混匀并瞬时离心。再从S1中取10 μl至S2中,以此类推重复上述步骤进行梯度稀释。

标准品S0-S5浓度如下:

标准品	S0	S1	S2	S3	S4	S5
浓度	3 ng/μl	300 pg/μl	30 pg/μl	3 pg/μl	300 fg/μl	30 fg/μl

- (3) 稀释得到的S1-S5作为标准曲线样品放置于冰上备用, S0留存。实验结束后剩余标准品以及稀释液建议保存于-20°C,且建议标准品S1-S5在一周内使用。

#### 2. 试剂准备 (在试剂准备区进行)

- (1) 取出试剂盒中的各组分以及自备试剂,室温放置,待温度平衡至室温,混匀后备用;
- (2) qPCR工作液配制 (整个过程中避免被光源直射)

根据所检测的样品数量按照下表配制反应液,建议每次检测均设置阴性对照。

待检样品数为n时,需配制反应体系数N=【待检样品数(n)+标准曲线样品(5)+阴性对照NTC(1)】×重复孔数+1。

组分名称	组分用量	工作浓度
<i>Pichia</i> qPCR SuperMix (2×)	15 μl×N	1×
6× <i>Pichia</i> 引物探针混合液	5 μl×N	1×

- (3) 将配制好的qPCR工作液充分混匀后瞬时离心,待用。

#### 3. 加样 (在样品处理区进行)

向每个PCR管中分装加入前一步准备好的qPCR工作液20 μl,并在相应孔中按顺序分别添加10 μl模板:阴性对照NTC、待测样品、标准曲线样品(S1-S5)。建议以上三类样品在反应孔设计布板时分区放置,以免互相污染,导致测试结果不准确。盖上管盖或使用光学膜封闭后,轻柔振荡混匀,离心使液体全部沉于管底。



#### 4、qPCR扩增 (在扩增与分析区进行)

将PCR反应管放入扩增仪样品槽，按照对应顺序设置阴性对照、待测样品、标准曲线样品，并设置样品名称。

##### (1) 荧光通道选择

选择FAM通道 (Reporter: FAM, Quencher : none) 检测毕赤酵母 DNA；

参比荧光 (Passive Reference)设置为none。

设置反应体系为30  $\mu$ l。

##### (2) qPCR扩增程序设置

温度	时间	循环数	信号采集
95 $^{\circ}$ C	5 min	1	
95 $^{\circ}$ C	5 s	40	
60 $^{\circ}$ C	15 s		√

#### 5、结果分析

在结果分析软件中，将相应反应孔的样品类型分别设置为NTC (阴性对照)、Unknown (待测样品)以及Standard (标准曲线样品)，并对Standard样品的浓度赋值为300、30、3、0.3、0.03(单位为 pg/ $\mu$ l)。设置完成后运行分析，软件自动生成标准曲线与扩增曲线以及相应数值。生成的标准曲线相关系数 R2 应不低于 0.99，斜率应位于 -3.1 ~ -3.6 之间 (表示扩增效率位于 90% ~ 110% 之间)。NTC (阴性对照) 样品 Ct 值应为无显示或 $\geq$ 36。待测样品浓度根据标准曲线自动生成后，换算出原样品中毕赤酵母DNA浓度。

标准曲线需要进行调整时，可参照以下原则：

- 根据复孔间 Ct 值差异 $\leq$ 0.3 的原则，可对 DNA Standards (S5-S1) 原始 Ct 值进行过滤。
- 参照 NTC 阴性对照的 Ct 值确认标准曲线 Ct 值有效范围，确保相邻一组标准品间的 $\Delta$ Ct 值在 3.1-3.6 之间，并且 NTC 比最低浓度的标准品的 Ct 值大于 3 以上。
- 若 Ct (NTC) > Ct (S5) + 3，则最大有效 Ct 值为 Ct (S5)，应使用 DNA Standard S1-S5 所产生的 Ct 值制作标准曲线。
- 若 Ct (S5) + 3 > Ct (NTC)，而 Ct (S5) - Ct (S4) 在 3.1-3.6 之间，可以舍弃 S5，使用 DNA Standard S1-S4 制作标准曲线，并按照要求评估标准曲线的质量。
- 若 Ct (S4) + 3 > Ct (NTC)，提示定量体系存在严重污染，需更换体系中所有组分后重复实验。
- 为了确保定量准确，请至少使用 4 个 Ct (DNA Standards) 制作标准曲线。
- 如果标准曲线参数不佳，超出了有效范围，建议重新进行定量。

#### 6、质控样品

在测试过程中，为确保实验结果的可信度，可增加加样回收质控ERC样品以及阴性质控NCS样品，同步进行核酸提取、检测步骤。建议的样品配制方法如下：

- 加样回收质控ERC样品：180  $\mu$ l待测样品中加入20  $\mu$ l S3，混匀作为ERC；
- 阴性质控NCS样品：200  $\mu$ l DNA稀释液 (或生物制品基础溶液)，作为NCS。

二者的质控判断标准如下：

- 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。
- NCS的 Ct 值应大于标曲最低浓度 Ct 值。

##### 检验方法的局限性

不合理的样品采集、转运及处理，以及不当的实验操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。

##### 产品性能指标

具体参考产品性能报告。

##### 注意事项

- 本产品仅用于科研使用，使用前请仔细阅读本说明书。
- 实验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项，对每次实验进行质量控制。
- 实验室管理需严格遵照PCR基因扩增实验室的管理规范，实验人员必须进行专业培训，实验过程严格分区进行，所有消耗品仅作一次性使用，实验操作的每个阶段使用专用仪器和设备，各区各阶段用品不可交叉使用。所有检测样品均视为具有传染性的物质，实验过程中穿工作服并经常更换手套，以避免样品间的交叉污染；样品操作、废弃物处理应符合相关法规要求：《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。
- 所有试剂使用前均需彻底化冻、混匀。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1.0-202203

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

