

毕赤酵母 *P. pastoris* 残留 DNA 检测试剂盒

❖ 试剂盒简介

毕赤酵母 *P. pastoris* 残留 DNA 检测试剂盒可用于定量检测生物制品如重组蛋白药物、病毒类疫苗、细胞治疗和基因治疗等产品的研发和生产过程中的中间品、半成品和成品中的 DNA 残留量。试剂盒采用荧光探针 PCR 原理和方法，具有极高的灵敏度、特异性和准确性，最低定量限可达到 fg 级别。中国药典 2020 年版三部规定，以细菌或真菌基质生产的疫苗 DNA 残留量不能超过 10 ng/剂。

本试剂盒配套有毕赤酵母 *P. pastoris* 定量参考品 DNA，准确定量。本试剂盒与宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂已经过全面的方法学验证，包括适用范围、可行性、专属性、定量限、扩增效率、线性范围、准确性、中间精密度以及耐用性的验证，能够满足毕赤酵母 *P. pastoris* 残留 DNA 检测的需求。

❖ 产品组分、规格及储存条件

试剂盒包括 100 个反应，未开封包装的保质期标注在包装标签上，试剂盒储存于 -20℃ 及以下。

表 1 试剂盒组分

产品组分	装量	管盖颜色	储存条件
qPCR 反应缓冲液 qPCR Reaction Buffer	1 mL/管×1	红色	-18℃及以下
引物和探针混悬液 Primer & Probe Mix	500 μL/管×1	棕色管	-18℃及以下，避光
<i>P. pastoris</i> 定量参考品 DNA Quantitative Reference DNA	100 μL/管×1	蓝色	-18℃及以下
DNA 稀释缓冲液 DNA Diluted Buffer	1 mL/管×3	透明色	-18℃及以下

❖ 用户提供的耗材及设备

- 用于检测 FAM™ 荧光的 qPCR 仪，如 ABI 7500 Fast;
- 涡旋仪

- 移液枪及枪头 (10 μ L、100 μ L 和 1000 μ L)
- 1.5 mL 的无核酸反应管
- qPCR 反应管或 96 孔板

❖ 操作步骤

● 稀释 *P. pastoris* 定量参考品 DNA 用于制备标准曲线

- 1、确认试剂盒中毕赤酵母 *P. pastoris* 定量参考品 DNA 的浓度，待其完全融化后，轻微震荡混匀 1 min 并快速离心 10 s；
- 2、取 1 支 1.5 mL 的离心管，标记为 ST0，用 DNA 稀释缓冲液将毕赤酵母 *P. pastoris* 定量参考品 DNA 稀释至浓度为 3 ng/ μ L，轻微震荡混匀 1 min 并快速离心 10 s。
- 3、再取 5 支 1.5 mL 的离心管，分别标记为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5，并分别加入 90 μ L 的 DNA 稀释缓冲液；
- 4、按表 2 依次进行稀释操作。

表 2 毕赤酵母 *P. pastoris* 定量参考品 DNA 稀释

稀释管	稀释体积	终浓度
ST1	10 μ L ST0+90 μ L DNA 稀释缓冲液	300 pg/ μ L
ST2	10 μ L ST1+90 μ L DNA 稀释缓冲液	30 pg/ μ L
ST3	10 μ L ST2+90 μ L DNA 稀释缓冲液	3 pg/ μ L
ST4	10 μ L ST3+90 μ L DNA 稀释缓冲液	300 fg/ μ L
ST5	10 μ L ST4+90 μ L DNA 稀释缓冲液	30 fg/ μ L
ST6	10 μ L ST5+90 μ L DNA 稀释缓冲液	3 fg/ μ L

注意：1、标准曲线应至少选择 5 个浓度点，浓度点可根据试剂验证结果选择。

2、为避免反复冻融次数及避免污染，建议初次使用毕赤酵母 *P. pastoris* 定量参考品 DNA 时，按需求分装之后储存于 -20 $^{\circ}$ C。

● 加标回收质控 ERC 样本的制备

可根据需要设置 ERC 中的毕赤酵母 *P. pastoris* 定量参考品 DNA 的浓度，下述是以加入 30 pg 毕赤酵母 *P. pastoris* 定量参考品 DNA 制备回收质控 ERC 样本为例，具体操作如下：

- 1、取 1 支 1.5 mL 的离心管，加入 100 μ L 的待测样本，待测样本标记为 S。
- 2、再加入 10 μ L 的 ST3，轻微震荡混匀 1 min 并快速离心 10 s，标记为 ERC。
- 3、使用样本前处理试剂盒，将加标回收质控 ERC 样本和待测样本一起进行样本前处理，制备加标回收质控 ERC 纯化液。

注：ERC 为提取效率控制 (Extraction Recovery Control, ERC)。

● 阴性提取质控 NEC 样本的制备

可根据实验设置阴性提取质控 NEC 样本，具体操作如下：

- 1、取 1 支 1.5 mL 的离心管，加入 100 μ L 的样本基质溶液或 DNA 稀释缓冲液，标记为 NEC。
- 2、使用样本前处理试剂盒，将阴性提取质控 NEC 样本和待测样本一起进行样本前处理，制备阴性提取质控 NEC 纯化液。

注：NCS (Negative Extraction Control, NEC) 为样本基质溶液或者 DNA Dilution Buffer 进行样本前处理后所得纯化液。

● 无模板对照 NTC 样本的制备

根据实验要求设置无模板对照 NTC，取 1 支 1.5 mL 的离心管加入 DNA 稀释缓冲液，标记为 NTC，无需样本前处理，直接用于 qPCR 检测。

注：NTC (No Template Control, NTC) 为 DNA 稀释缓冲液。

● qPCR 反应体系的配制及加样

- 1、根据标准曲线制备样本数、待测样本数、加标回收质控 ERC 样本数、阴性提取质控 NEC 样本数以及无模板对照 NTC 样本数计算所需孔数，一般设置 3 个重复孔。

反应孔数= (5 个浓度梯度的标准曲线+ 1 个无模板对照 NTC+ 1 个阴性提取质控 NEC + 待测样品个数+加标回收质控 ERC 样本个数) \times 3

注：待测样本个数等于加标回收质控 ERC 样本个数，每个待测样本都需要制备加标回收质控 ERC。

- 2、根据反应孔数计算试剂用量，每个反应体系混合液配制如下表 3：

表 3 单孔 qPCR 反应混合液配制表

试剂	用量
qPCR 反应缓冲液 qPCR Reaction Buffer	10 μ L
引物和探针混悬液 Primer & Probe Mix	2 μ L
总体积	12 μ L

- 3、加入标准曲线制备样本、待测样本 S、加标回收质控 ERC 样本、阴性提取质控 NEC 样本以及无模板对照 NTC 样本，如下表 4：

表 4 单孔反应混合液加入样本量配制表

反应混合液	样品	总体积
12 μ L 上述反应体系混合液	8 μ L 标准曲线制备样本 ST1/ST2/ST3/ST4/ST5/ST6	20 μ L
	8 μ L 加标回收质控 ERC 样本	20 μ L
	8 μ L 待测样本 S	20 μ L
	8 μ L 无模板对照 NTC 样本	20 μ L
	8 μ L 阴性提取质控 NEC 样本	20 μ L

4、将上述总体积 30 μ L 的加样反应液加入至 96 孔板或者 qPCR 反应管中，可参考下表 5 的 96 孔板排版示例（以 3 个样本为例）：

表 5 96 孔板排版示例

A	NTC	NTC	NTC		S1	S1	S1			ST6	ST6	ST6
B	NEC	NEC	NEC		ERC-S1	ERC-S1	ERC-S1			ST5	ST5	ST5
C					S2	S2	S2			ST4	ST4	ST4
D					ERC-S2	ERC-S2	ERC-S2			ST3	ST3	ST3
E					S3	S3	S3			ST2	ST2	ST2
F					ERC-S3	ERC-S3	ERC-S3			ST1	ST1	ST1
G												
H												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

注：S1、S2、S3 分别是 3 个待测样本，ERC-S1、ERC-S2、ERC-S3 是分别对应的加标回收质控 ERC 样本。

5、将 96 孔板用光学膜封闭或者 qPCR 反应管盖上管盖，轻微震荡混匀后并快速离心 10 sec，放入 qPCR 仪。

● qPCR 反应程序设置参数设置

以 ABI 7500 Fast 为例，qPCR 反应程序参数设置步骤如下：

- 1、在 Setup 下的 Plate Setup 面板中，创建 FAM 探针，选择荧光报告基团为 FAM，荧光猝灭基团为 none；选择检测参比荧光为 ROX（可选择）。
- 2、在 Setup 下的 Plate Setup 面板中，将标准曲线样本对应的孔的 Task 一栏设置为 Standard，并且在 Quantity 一栏分别赋值为 3000、300、30、3、0.3（每孔中加入的 DNA

量, 以 pg 为单位) , 在 sample name 一栏中分别命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC, 将阴性质控 NCS 孔、待测样品孔、样品 ERC 孔的 Task 一栏设置为 Unknown, 并且在相应的 sample name 一栏中命名为 NTC、NEC、S、ERC。

3、在 Setup 下的 Run Method 面板中, 设置反应程序如下表 6: volume 选择 30 μ L。保存设置, 点击 “START” 按钮开始 qPCR 反应程序。

表 6 qPCR 反应程序

预变性	95 $^{\circ}$ C	5 min
循环反应 (40 cycles)	95 $^{\circ}$ C	10 sec
	60 $^{\circ}$ C	30 sec

● 结果分析

1、在 Analysis 下的 Amplification Plot 面板中, 系统会自动给出阈值线 “Threshold” , 有时阈值线接近于基线, 导致 Ct 值相差较大, 此时可选择 Auto Baseline, 手动调节阈值线 “Threshold” 并点击 Analyze, 可初步查看扩增曲线的形态是否正常。

2、在 Analysis 下的 “Standard Curve” 面板下, 可对读取标准曲线的 R^2 值、扩增效率 (Eff%)、斜率 (Slope)、截距 (Intercept) 等。正常的标准曲线应满足下列条件: $R^2 \geq 0.99$, 扩增效率在 90%~110% 之间, Slope 值在 -3.6~-3.1 之间。

3、在 Analysis 下的 Amplification Plot 面板中, “View Well Table” 中的 Mean Quantity 一栏可读取无模板对照 NTC、阴性提取质控 NEC、待测样品、样品 ERC 的检测值, 单位为 pg/8 μ L。后续可在检测报告中将单位换算为 pg/ μ L 或 pg/mL。

4、根据待测样本 S 和加标回收质控 ERC 样本的检测结果, 计算加标回收率。加标回收率的计算公式如下: 回收率 (%) = { (加标样品测定值 - 样品测定值) / 加标 DNA 标准品理论值} * 100%。注意: 每个加标样品的回收率应在 50%~150% 之间, RSD \leq 30%。

5、阴性提取质控 NEC 的 Ct 值应大于标曲最低浓度 Ct 均值。

6、无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值 \geq 38。