

巴斯德毕赤酵母细胞基因组DNA残留探针法qPCR试剂盒（含内参）***Pichia pastoris* Cell Residual Genomic DNA Probe qPCR Kit**

CAT#:BN64207

低温运输，-20℃保存

产品及特点

巴斯德毕赤酵母（*Pichia pastoris*）是一种甲醇营养型酵母，它能以甲醇作为唯一碳源进行生长。这种酵母可以在简单培养基中达到高密度生长，同时对外源基因具有较高的表达能力，使得它成为工业上重组蛋白生产的极佳宿主。此外，毕赤酵母在细胞内能够完成某些真核细胞特有的翻译后修饰（如二硫键形成和部分糖基化），从而提高了表达蛋白正确折叠的可能性和活性。在毕赤酵母表达系统中，经过细胞破碎、离心、过滤、色谱等纯化步骤后，通常难以将所有宿主细胞内的基因组DNA完全去除。残留的基因组DNA通常以片段化或部分降解的形式存在，其量虽然极低，但依然是产品质控中的重要指标。因此快速检测巴斯德毕赤酵母细胞基因组DNA残留具有重要的意义。本产品就是以探针法qPCR技术为基础开发的专门检测巴斯德毕赤酵母细胞基因组DNA残留的试剂盒，它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供样品DNA模板
2. 引物和探针经过优化，分析灵敏性高，可以达到0.001 pg/μL。
3. 提供阳性对照，便于制备标准曲线和用作扩增对照，排除假阴性结果。
4. 含识别内源性内参的引物和探针，便于排除PCR假阴性结果。
5. 特异性高，靶分子的引物和探针是根据巴斯德毕赤酵母细胞基因组DNA残留DNA高度保守区设计，不会跟其他生物的DNA发生交叉反应。
6. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。定量检测时线性范围至少为5个数量级。
7. 本产品足够50次20 μL体系的探针法PCR反应。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

成分	编号	规格	包装
2×Probe qPCR MasterMix	60001	500 μL	0.5 mL
荧光PCR专用模板稀释液	60002	1 mL	1.5 mL
超纯水	60003	1 mL	1.5 mL
巴斯德毕赤酵母细胞 基因组DNA残留qPCR 引物-探针干粉(含内参引物探针)	64207-4	50次	0.5 mL

	巴斯德毕赤酵母细胞 基因组DNA残留qPCR 阳性对照(100 pg/μL)	64207-5	50 μL	0.5 mL
	注意：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入220 μL超纯水充分混匀后得到引物-探针混合液再使用，未用完的需要-20℃保存。			
运输及保存	低温运输，-20℃保存，保存期限为12个月。			
自备物品	样品DNA。			
使用方法	一、稀释标准曲线样品（以100 pg-0.001 pg/μL这6个10倍稀释度为例）。 1. 标记6个离心管，分别为6、5、4、3、2、1。 2. 用带芯枪头分别加入45 μL荧光PCR专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同）。 3. 在6号管中加入5 μL 1×100 pg/μL的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡1分钟，得1×10 pg/μL的标准曲线样品。放冰上待用。 4. 换枪头，在5号管中加入5 μL 1×10 pg/μL的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡1分钟，得1 pg/μL的标准曲线样品。放冰上待用。 5. 重复上面的操作直到得到从100 pg/μL到1 ng/μL共6个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。 二、样品DNA的制备 6. 如果有N个样品，最好设置N+2个提取，多出的一个是制备PC（样品制备阳性对照），一个是制备NC（样品制备阴性对照）。可以用确认是阳性的样本作为阳性对照，用确认是阴性的样本作为阴性对照。 7. 用自选方法纯化样品的DNA，本试剂盒跟市场上大多数DNA提取试剂盒兼容，也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。 三、Probe qPCR反应（20 μL体系，在样品制备室进行） 8. 如果做定量分析并且只做1次重复，则标记N+9个PCR管，其中N+2个用于上步得到的N+2个样品，1个用于PCR阴性对照（用水做模板），6个用于标准曲线。如果做定性分析并且只做1次重复，则标记N+4个PCR管，其中N+2个用于上步得到的N+2个样品，1个用于PCR阴性对照（用水做模板），1个用于PCR阳性对照（直接用第5步第4号管的阳性对照稀释液做模板）。下面只以定量分析为例描述操作步骤。 9. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复）：			

成分	样品管 N+2个	PCR 阴性对照	标准曲线样品管 (1-6管)
2×Probe qPCR MasterMix	各10 μL	10 μL	各10 μL
巴斯德毕赤酵母细胞 基因组DNA残留qPCR 引物-探针混合液(含内参引物探针)	各4 μL	4 μL	4 μL
N+2个待测样 (含内源性内参)	各6 μL	不加	不加
超纯水	不加	6 μL	不加
第5步所得标准曲线样品稀释液 (含 内参, 1-6号)	不加	不加	各6 μL

10. 盖上盖子后上机, 按下面参数进行PCR:

过程	温度	时间
预变性	95℃	4 min
PCR反应 (40个循环)	95℃	15 sec
	X℃	15 sec
	72℃	45 sec (采集FAM通道和Cy5通道的 荧光信号, 淬灭基团均为BHQ)

四、数据处理

- 阴性阳性判断: 没有Ct读数, 或Ct大于40判为阴性结果。有Ct读数, Ct值小于40, 荧光信号有对数增长, 有典型扩增曲线判为阳性结果。每个样本需要对FAM通道和Cy5通道的结果分别进行判定, 得到两个结果。
- 实验有效性判断: 如果扩增阳性对照或制备阳性对照FAM通道结果为阴性则整个实验无效, 不需要分析数据, 需要分析原因, 可能是操作、仪器和试剂三方面的原因, 重做扩增或制备或跟仪器和试剂厂家联系。如果扩增阴性对照或制备阴性对照FAM通道结果为阳性, 说明环境污染, 则整个实验无效, 不需要分析数据, 需要分析失败原因, 直到污染消除。如果阳性对照和阴性对照正常, 则进入下一步分析样本的有效性。
- 样本有效性判断: 如果样本FAM通道的结果为阳性, 则无论内参Cy5通道的结果是阴性还是阳性, 样本的结果均有效。如果样本结果为阴性, 内参通道结果也为阴性, 则此样品的阴性结果无效。此样品需要重新提取核酸和进行扩增。
- 如果把本试剂盒用于定量检测, 则以阳性对照浓度的log值为横轴, 分别以阳性对照FAM通道和内参Cy5通道的Ct值为纵轴, 绘制标准曲线, 阳性对照FAM通道读

数的标准曲线为斜线， r^2 必须大于0.95，内参Cy5通道读数的标准曲线为一条跟X轴平行的横线。再以待测样品的Ct值从阳性对照FAM通道读数的标准曲线上推算出样品DNA浓度的log值，再推算出其浓度。

15. 如果用于定性实验，对待测样品，如果其FAM通道的Ct没有读数、或Ct大于或等于40则均为阴性，如果小于40则为阳性。对任何FAM通道结果为阴性的待测样本，如果其对应的内参Cy5通道也为阴性，则此样品的阴性结果无效，此样品需要重复实验。