

Vero DNA 残留片段分析试剂盒

(PCR-荧光探针法) 说明书

产品简介

Vero DNA残留片段分析试剂盒是用于定量分析检测各种生物制品的中间品、半成品和成品中Vero宿主细胞DNA残留片段大小分布的专用试剂盒。

本试剂盒采用qPCR荧光探针法原理，设计了三种不同的扩增片段（85 bp、195 bp、399 bp），用试剂盒配套的Vero DNA定量标准品分别对不同的扩增片段制作标准曲线，以此来定量检测分析样品中Vero细胞宿主残留DNA片段分布情况。本试剂盒检测快速，专一性强，性能可靠，最低检测限可以达到fg水平。

试剂盒组分

表 1 试剂盒组分

组分	3*30 反应装量	3*100 反应装量
Vero DNA 定量标准品	15 μl ×1 管	50 μl ×1 管
qPCR Reaction Buffer	1125 μl ×1 管	1250 μl ×3 管
Vero Primer&Probe MIX-85	30 μl ×1 管	100 μl ×1 管
Vero Primer&Probe MIX-195	30 μl ×1 管	100 μl ×1 管
Vero Primer&Probe MIX-399	30 μl ×1 管	100 μl ×1 管
IPC MIX	90 μl ×1 管	300 μl ×1 管
50×ROX Low	45 μl ×1 管	150 μl ×1 管
50×ROX High	45 μl ×1 管	150 μl ×1 管
标准品稀释液	1500 μl ×1 管	1500 μl ×3 管

包装与规格

货号/规格：10903013 3*100 反应/盒

货号/规格：10903014 3*30 反应/盒

储存条件及有效期

储存条件：-20°C±5°C避光保存。

有效期：12 个月。

试剂盒反复冻融5次内有效。

适配机型：（包括但不限于）

- Thermo Scientific: ABI 7500 Real-Time PCR System
- Thermo Scientific: ABI QuantStudio 6
- 杭州博日科技: FQD-96A

需要额外准备的耗材与设备

实验前请准备好下列耗材与设备：

- 1.5ml 或 2mL 无菌低吸附离心管
- 与 PCR 仪适配的 96 孔 qPCR 板或八联排管
- 1000μl, 200μl, 10μl 无菌低吸附带滤芯枪头
- 荧光定量 PCR 仪
- 离心机
- 震荡器
- 各规格移液器（如 1000μl, 200μl, 10μl, 2.5μl 等）

实验操作流程：

1. Vero DNA 定量标准品的稀释和标准曲线的制备

Vero 片段分析试剂盒中含有三种不同长度的扩增片段，分别为：85 bp、195 bp、399 bp。在建立标准曲线时，需分别对不同的扩增片段设置标准曲线，并根据对应扩增片段的标准曲线来计算其残留量和分布相对量。

用试剂盒中提供的标准品稀释液将 Vero DNA 定量标准品进行梯度稀释，稀释浓度依次为 3 ng/μL、300 pg/μL、30 pg/μL、3 pg/μL、300 fg/μL、30 fg/μL。具体实验操作如下：

1) 将试剂盒中的 Vero DNA 定量标准品和标准品稀释液置于冰上或 2-8℃ 条件下融化，待完全融化后，轻微振荡混匀，低速离心 10 sec。

2) 取 6 支洁净的 1.5 mL 离心管，分别标记为 ST0、ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。

3) 在标记为 ST0 的 1.5 mL 离心管中加 90 μL 标准品稀释液和 10 μL Vero DNA 定量标准品，即稀释为 3 ng/μL，振荡混匀后低速离心 10 sec，该浓度可分装置于 -20℃±5℃ 短期保存（不超过 3 个月），使用时避免反复冻融。

4) 在 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5 离心管中先分别加入 90 μL 标准品稀释液，再进行梯度稀释，具体稀释方法如下：

表 2 标准品梯度稀释

稀释管	稀释体积	终浓度 (pg/μL)
ST1	10 μL ST0 + 90 μL 标准品稀释液	300
ST2	10 μL ST1 + 90 μL 标准品稀释液	30
ST3	10 μL ST2 + 90 μL 标准品稀释液	3
ST4	10 μL ST3 + 90 μL 标准品稀释液	0.3
ST5	10 μL ST4 + 90 μL 标准品稀释液	0.03

每个浓度做 3 个复孔，该试剂是可以测试 300 pg/μL-30 fg/μL 线性范围的。若需要，可适当扩大或缩小线性范围，但应至少有 5 个连续的浓度梯度。

为减少反复冻融次数和避免污染，建议初次使用时将 Vero DNA 定量标准品分装储存于 -20℃±5℃。

已融化未使用的标准品稀释液可保存于 2-8℃ 7 天，若长时间不用，请放置于 -20℃±5℃。

标准品的稀释应在每次实验前重新制备，不可使用前一次或前一日制备的标准品。

2. 待测样本 TS 的制备

根据实验设置待测样本 TS，具体操作如下：

1) 取 100 μL 待测样本加入 1.5 mL 洁净的离心管中，标记为 TS，进行样本前处理，制备待测样本 TS 纯化液。

2) 建议设置加标样品（ERC），与待测样品进行同步处理，作为回收率考察。

✚ 一般建议样品加标量设置为样品 Vero DNA 实际残留量的 2-10 倍。若样品 Vero DNA 实际残留量低于本试剂盒的定量限，加标量应设置在定量限范围之内，保证检测结果的准确性。

3. 阴性抽提质控 NCS 的制备

根据实验设置阴性抽提质控 NCS，具体操作如下：

- 1) 取 100 μL 样本基质溶液（或标准品稀释液）加入 1.5 mL 洁净的离心管中，标记为 NCS。
- 2) 阴性质控 NCS 和同批待测样本一起进行样本前处理，制备成阴性质控 NCS 纯化液。

4. 反应体系混合液（qPCR MIX）的准备

- 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) \times 3

- 2) 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR 反应体系混合液总量（含有 2 孔的损失量）：

qPCR MIX = (反应孔数 + 2) \times 15 μL

- 3) 各试剂放在冰上或 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下融化，轻微震荡混匀，并参考表 3、表 4、表 5 所示配置对应扩增片段的 qPCR MIX：

表 3 85 bp 扩增片段的反应体系混合液（qPCR MIX-85）配制表

85 bp 反应体系组分	体积(μL)
qPCR Reaction Buffer	12.5
ROX	0.5
Vero Primer&Probe Mix-85	1
IPC	1
总体积	15

表 4 195 bp 扩增片段的反应体系混合液（qPCR MIX-195）配制表

195 bp 反应体系组分	体积(μL)
qPCR Reaction Buffer	12.5

ROX	0.5
Vero Primer&Probe Mix-195	1
IPC	1
总体积	15

表 5 399 bp 扩增片段的反应体系混合液（qPCR MIX-399）配制表

399 bp 反应体系组分	体积(μL)
qPCR Reaction Buffer	12.5
ROX	0.5
Vero Primer&Probe Mix-399	1
IPC	1
总体积	15

✚ 为了满足同步进行三个不同扩增长度的片段分析检测需求，样品前处理中的 DNA 洗脱体积需要 $\geq 100 \mu\text{L}$ 。

5. 加样

- 1) 各试剂置于冰上，轻微振荡混匀，选择对应扩增片段参考表 6、表 7、表 8 所示加样：

表 6 MIX-85 各反应孔加样示例

ST-85	15 μL qPCR MIX-85+10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	15 μL qPCR MIX-85+10 μL 标准品稀释液
NCS	15 μL qPCR MIX-85+10 μL 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	15 μL qPCR MIX-85+10 μL 待测样品纯化液

表 7 MIX-195 各反应孔加样示例

ST-195	15 μL qPCR MIX-195+10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	15 μL qPCR MIX-195+10 μL 标准品稀释液
NCS	15 μL qPCR MIX-195+10 μL 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	15 μL qPCR MIX-195+10 μL 待测样品纯化液

表 8 MIX-399 各反应孔加样示例

ST-399	15 μL qPCR MIX-399+10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
--------	--

NTC	15 μ L qPCR MIX-399+10 μ L 标准品稀释液
NCS	15 μ L qPCR MIX-399+10 μ L 阴性质控 NCS 纯化液
待测样品	15 μ L qPCR MIX-399+10 μ L 待测样品纯化液

表 9 96 孔板排版示例

	85 bp			195 bp			399 bp		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1	ST1
B	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2	ST2
C	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3	ST3
D	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4	ST4
E	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5	ST5
F	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS
G	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
H	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC

- 该示例表示的是检测 5 个浓度梯度的 DNA 标准曲线 (ST1~5)、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、1 个待测样品。每个检测做 3 个重复孔。其中 1~3 列为 qPCR MIX-85, 4~6 列为 qPCR MIX-195, 7~9 列为 qPCR MIX-399。
 - 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。
- 2) 加样完成后, 将 96 孔板用光学膜封闭, 轻微震荡混匀, 短时间快速离心 10 sec 后放入 qPCR 仪, 如有气泡, 需将气泡排尽。

6. 扩增程序参数设置

ABI 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 2.3 为例

- 1) 创建空白新程序, 选择绝对定量检测模板。
- 2) 针对三种不同长度的扩增片段创建新检测探针, 分别命名为“Vero-85”、“Vero-195”、“Vero-399”, 选择报告荧光基团为“FAM”, 猝灭荧光基团为“NFQ-MGB”; 再创建 1 个检测探针, 命名为“IPC”, 选择报告荧光基团为“VIC”, 猝灭荧光基团为“NFQ-MGB”; 检测参比荧光为“ROX” (参比荧光可根据仪器型号等情况, 选择是否需要添加)。

- 3) 在“Assign target (s) to the selected wells”面板中，将标准曲线孔的“Task”一栏设置为“Standard”，并且在“Quantity”一栏分别赋值为“300000”、“30000”、“3000”、“300”、“30”（含义为每孔的 DNA 浓度，单位为 fg/μL），并且在相应的“Sample Name”一栏中命名为“300 pg/μL”、“30 pg/μL”、“3 pg/μL”、“300 fg/μL”、“30 fg/μL”；将无模板对照 NTC 孔的“Task”一栏设置为“NTC”；将阴性质控 NCS 孔、待测样本 TS 孔的“Task”一栏设置为“Unknown”，并且在相应的“Sample Name”一栏中分别命名为“NCS”、“TS”。
- 4) 扩增程序设置：设置两步法扩增程序，反应体积 25 μL，之后点击“Start Run”，开始仪器运行。

表 10 qPCR 扩增程序

循环步骤	温度 (°C)	时间	循环数
UNG 消化	37	2 min	1
预变性	95	30 sec	1
变性	95	10 sec	45
退火/延伸（收集荧光）	60	30 sec	

7. qPCR 结果分析

- 1) 在“Analysis”的“Amplification Plot”面板中，系统会自动给出“Threshold”，有时系统给出的“Threshold”离基线太近，导致复孔之间 Ct 相差甚远，可手动调节“Threshold”至合适位置，点击“Analyze”。此时可在“Multicomponent Plot”初步查看扩增曲线的形态是否正常。
- 2) 在“Analysis”的“Standard Curve”面板中，可读取标准曲线的 R^2 、扩增效率(Eff%)、斜率(Slope)、截距(Intercept)等。正常的标曲： $R^2 > 0.99$ ，扩增效率在 $90\% \leq \text{Eff}\% \leq 110\%$ 范围内，Slope 在 -3.8~-3.1。
- 3) 在“Analysis”的“View well table”面板中，“Quantity”一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样本 TS 的检测值，单位为 fg/μL，后续可在检测报告中
进行单位换算。
- 4) 结果分析的参数设置需依据具体的机型及使用的软件版本，一般也可由仪器自动判读。
- 5) 阴性质控 NCS 的 Ct 值应大于标曲最低浓度 Ct 的均值。

- 6) 无模板对照 NTC 的检测结果应为 **Undetermined** 或大于标准曲线最低浓度点 2 个 Ct 值以上。

注意事项

1. 本产品仅作科研用途，不用于临床诊断。
2. 本试剂盒需在有效期内使用。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
4. 注意在不同加样步骤间及时更换吸头、避免交叉污染，避免长时开盖。
5. 注意为避免污染，应当使用带滤芯的无菌吸头。
6. 使用本试剂前请仔细阅读本说明书，实验应规范操作，包括样本处理、反应体系的配制及加样。
7. 试剂盒内所有组分建议在低温环境融化后使用，且使用前每个组分请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。
8. 避免反复冻融本品，反复冻融可能使产品性能下降。
9. 本产品长期保存可置于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 避光保存。如果在短期内需要频繁使用，可在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存。

基本信息

生产企业名称：北京阅微基因技术股份有限公司

住所：北京市海淀区三里河路 17 号 10 层 1005 至 1010

售后服务单位名称：北京阅微基因技术股份有限公司

生产地址：北京市昌平区中关村科技园区白浮泉北街 1 号院 1 号楼-1 至 6 层 101 三层及六层 601