

## Vero Host Cell DNA Residue Detection Kit

### Vero 宿主细胞 DNA 残留检测试剂盒

#### 产品信息

产品名称	产品编号	规格
Vero Host Cell DNA Residue Detection Kit	41303ES50	50T
Vero 宿主细胞 DNA 残留检测试剂盒	41303ES60	100T

#### 产品描述

Vero 宿主细胞 DNA 残留检测试剂盒是用于定量分析检测各种生物制品的中间品、半成品和成品中的 Vero 残留 DNA 含量的试剂盒。

本试剂盒采用探针法荧光定量 PCR 原理，可专一快速的检测 Vero 细胞的残留 DNA，其最低检测限可以达到 fg 水平。该试剂盒可与本公司的磁珠法残留 DNA 样本前处理试剂盒（Cat#18461ES/18462ES）配套使用。

#### 产品组分

组分编号	组分名称	产品编号/规格	
		41303ES50 (50T)	41303ES60 (100T)
41303-A	Vero qPCR mix	0.8 mL	1.6 mL
41303-B	Vero Primer&probe mix	200 $\mu$ L	400 $\mu$ L
41303-C	DNA Dilution Buffer	2 $\times$ 2 mL	4 $\times$ 2 mL
41303-D	Vero DNA Control (30 ng/ $\mu$ L)	25 $\mu$ L	50 $\mu$ L

【注】：本试剂盒不含 ROX 参比染料，若您目前使用的 Real Time PCR 扩增仪需要添加 ROX 参比染料，推荐您购买本公司的 50 $\times$  ROX Reference Dye (Cat#10200ES)。

#### 运输和保存方法

1. 所有组分均干冰运输，-20 $^{\circ}$ C 保存，有效期 2 年。
2. 收到货后，请检查共 4 个组分是否齐全，并立即放入对应的保存温度中储存。

#### 注意事项

1. 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。
2. 加样和配液步骤尽量都在冰上操作。
3. 每个组分在使用前都应充分震荡混匀，低速离心。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
5. 本产品仅作科研用途。

#### 适用机型

包含但不限于以下仪器：

Bio-Rad: CFX96 Optic Module;

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

## 使用方法

### 一、Vero 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 DNA 定量参考品进行梯度稀释，稀释浓度依次为 300 pg/μL、30 pg/μL、3 pg/μL、300 fg/μL、30 fg/μL、3 fg/μL。

具体操作如下：

1. 将试剂盒中的 DNA 定量参考品和 DNA 稀释液置于冰上融化，待完全融化后，轻微振荡混匀，低速离心 10 sec。
2. 取 7 支洁净的 1.5 mL 离心管，分别标记为 3 ng/μL，①，②，③，④，⑤，⑥。
3. 在标记为 3 ng/μL 的 1.5 mL 离心管中加 90 μL DNA 稀释液和 10 μL DNA 定量参考品（30 ng/μL），即稀释为 3 ng/μL，振荡混匀后短时间快速离心 10 sec，该浓度可分装置于-20°C短期保存（不超过 3 个月），使用时避免反复冻融。
4. 在①，②，③，④，⑤，⑥ 管中先分别加入 90 μL DNA 稀释液，再进行梯度稀释，稀释方法如下：

稀释管	稀释比例	终浓度
①	10 μL 3 ng/μL+90 μL DNA Dilution Buffer	300 pg/μL
②	10 μL ①+90 μL DNA Dilution Buffer	30 pg/μL
③	10 μL ②+90 μL DNA Dilution Buffer	3 pg/μL
④	10 μL ③+90 μL DNA Dilution Buffer	300 fg/μL
⑤	10 μL ④+90 μL DNA Dilution Buffer	30 fg/μL
⑥	10 μL ⑤+90 μL DNA Dilution Buffer	3 fg/μL

#### 【注】：

1. 每个浓度做 3 个复孔，该试剂可测试 3 fg/μL-300 pg/μL 线性范围。若需要，可适当扩大或缩小线性范围。
2. 为减少反复冻融次数和避免污染，建议初次使用时将 DNA 定量参考品分装储存于-20°C。
3. 已融化未使用的 DNA 稀释液可保存于 2-8 °C 7 天，若长时间不用，请放置于-20°C。
4. 为确保模板完全混匀，每个梯度稀释时需轻微震荡混匀约 1 min。

### 二、样本加标回收质控 QC 的制备

根据需要设 QC 中的 Vero DNA 标准品浓度（以制备加 3 pg/μL DNA 量的样本加标回收为例），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，再加入 10 μL 溶液③，混匀，标记为样本加标回收 QC。
2. 加标回收 QC 和同批待测样本一起进行样本前处理，制备加标回收 QC 纯化液。

### 三、标准品回收质控 QC 的制备（可选）

根据需要设 QC 中的 Vero DNA 标准品浓度（以制备加 3 pg/μL DNA 量的样本加标回收为例），具体操作如下：

1. 取 100 μL 溶液③加入 1.5 mL 洁净的离心管中，标记为标准品回收 QC。
2. 标准品回收 QC 和同批待测样本一起进行样本前处理，制备标准品回收 QC 纯化液。

### 四、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 样本基质溶液（或 DNA 稀释液）加入 1.5 mL 洁净的离心管中，标记为阴性质控 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。

### 五、无模板对照 NTC 的制备

根据实验设置无模板对照 NTC，具体操作如下：

1. 无模板对照 NTC 无需进行样本前处理，在 qPCR 法检测残留 DNA 含量阶段开始配置即可。
2. 每管或孔中的 NTC 样本为 20 μL Mix 混合液（即 16 μL Vero qPCR mix + 4 μL Vero Primer&probe mix）+ 20 μL DNA Dilution Buffer，建议配置 3 个重复孔的量。

## 六、反应体系

组分	体积 (μL)
Vero qPCR mix	16
Vero Primer&probe mix	4
DNA template	20
总体积	40

### 【注】:

- 根据反应孔数计算本次所需的 Mix 混合液总量:  $\text{Mix 混合液} = (\text{反应孔数} + 2) \times (16 + 4) \mu\text{L}$  (含有 2 孔的损失量)。通常, 每个样本做 3 个重复孔。
- 加样完成密封好管子后, 请先低速离心 10 sec 将管壁的液体离心收集至管底, 再震荡混匀 5 sec 以上, 完全混匀反应液, 再低速离心 10 sec 将管壁的液体离心收集至管底, 如有气泡, 需将气泡排尽。

下图为参考板位:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC		标准曲线①	标准曲线①	标准曲线①		加样回收QC1	加样回收QC1	加样回收QC1	待测样本1	待测样本1	待测样本1
B	NTC		标准曲线②	标准曲线②	标准曲线②		加样回收QC2	加样回收QC2	加样回收QC2	待测样本2	待测样本2	待测样本2
C	NTC		标准曲线③	标准曲线③	标准曲线③		加样回收QC3	加样回收QC3	加样回收QC3	待测样本3	待测样本3	待测样本3
D			标准曲线④	标准曲线④	标准曲线④							
E			标准曲线⑤	标准曲线⑤	标准曲线⑤		标准品回收QC1	标准品回收QC1	标准品回收QC1	阴性质控NC1	阴性质控NC1	阴性质控NC1
F			标准曲线⑥	标准曲线⑥	标准曲线⑥		标准品回收QC2	标准品回收QC2	标准品回收QC2	阴性质控NC2	阴性质控NC2	阴性质控NC2
G							标准品回收QC3	标准品回收QC3	标准品回收QC3	阴性质控NC3	阴性质控NC3	阴性质控NC3
H												

该示例是对 Vero 残留 DNA qPCR 法检测操作的展示, 检测样本包括: 1 个无模板对照 NTC、6 个浓度梯度的 DNA 标准曲线、3 个样本加标回收 QC (即加样回收 QC)、3 个待测样本、3 个标准品回收 QC (可选)、3 个阴性质控 NCS (1 个即可)。建议每个样本做 3 个重复孔。

## 七、扩增程序参数设置 (两步法) (以 ABI 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 2.0 为例)

- 创建空白新程序, 选择绝对定量检测模板。
- 创建 1 个检测探针, 命名为“Vero-DNA”, 选择报告荧光基团为“FAM”, 猝灭荧光基团为“none”。
- 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”、“3” (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”、“3 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、待测样本孔、样本加标回收 QC 孔的“Task”一栏设置为“Unknown”, 并在相应“Sample Name”一栏中分别命名为“NCS”、“TS”、“QC”, 之后点击“Start Run”, 开始仪器运行。
- 扩增程序设置: 设置反应体积 40 μL。

循环步骤	温度 (°C)	时间	循环数
预变性	95°C	10 min	1
变性	95°C	15 sec	40
退火/延伸 (收集荧光)	60°C	30 sec	

## 八、qPCR 结果分析

- 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。
- 在“Analysis”的“Standard Curve”面板中, 可读取标准曲线的 R<sup>2</sup>、扩增效率 (Eff%)、斜率 (Slope)、截距 (Intercept) 等。正常的标曲: R<sup>2</sup> > 0.99; 扩增效率在 90% ≤ Eff% ≤ 110% 范围内; Slope 在 -3.4 左右。
- 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、样本加标回收 QC 的检测值, 单位为 fg/μL, 后续可在检测报告中将单位换算成 pg/μL 或 pg/mL。