

Vero Host Cell Residue DNA Size Analysis Kit

Vero 宿主细胞残留 DNA 片段分析试剂盒

产品简介

Vero 宿主细胞残留 DNA 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、半成品和成品中不同长度的 Vero 残留 DNA 含量的试剂盒。

本试剂盒采用 qPCR 荧光探针原理，专一快速的检测 200 bp 以下及以上的 Vero DNA 残留，其定量限可以达到 3 fg/ μ L 水平，且配套有 Vero DNA Control（DNA 定量参考品）。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。

产品信息

货号	41314ES70 / 41314ES74
规格	4 \times 50 T / 4 \times 100 T

组分信息

组分编号	组分名称	41314ES70	41314ES74
41314-A	Vero qPCR Mix	0.75 mL \times 4 管	1.5 mL \times 4 管
41314-B1	Vero Primer&Probe Mix-97	200 μ L \times 1 管	400 μ L \times 1 管
41314-B2	Vero Primer&Probe Mix-154	200 μ L \times 1 管	400 μ L \times 1 管
41314-B3	Vero Primer&Probe Mix-219	200 μ L \times 1 管	400 μ L \times 1 管
41314-B4	Vero Primer&Probe Mix-507	200 μ L \times 1 管	400 μ L \times 1 管
41314-C	DNA Dilution Buffer	1.8 mL \times 2 管	1.8 mL \times 4 管
41314-D	Vero DNA Control (30 ng/ μ L)	25 μ L \times 1 管	50 μ L \times 1 管
41314-E	IC	200 μ L \times 1 管	400 μ L \times 1 管

储存条件

1. 所有组分均干冰运输，-25~-15 $^{\circ}$ C 保存，有效期 2 年。其中 A 组分和 B1、B2、B3、B4 组分均需避光保存。
2. 收到货后，请检查共 8 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. 本产品仅作科研用途。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
3. 使用本试剂盒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。
4. 每个组分在使用前都应充分震荡混匀，低速离心。

适用机型

包含但不限于以下仪器：

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

使用说明

1. Vero DNA Control 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

Vero 片段分析试剂盒中含有四种不同长度的扩增片段, 分别为: 97 bp、154 bp、219 bp、507 bp。在建立标曲时, 需分别对不同的扩增片段设置标曲, 并根据对应扩增片段的标曲来计算其残留量和分布相对量。

用试剂盒中提供的 DNA Dilution Buffer (DNA 稀释液) 将 Vero DNA Control 定量参考品进行梯度稀释, 稀释浓度依次为 3 ng/ μ L、300 pg/ μ L、30 pg/ μ L、3 pg/ μ L、300 fg/ μ L、30 fg/ μ L。具体操作如下:

- 1) 将试剂盒中的 Vero DNA Control 和 DNA Dilution Buffer 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 6 支洁净的 1.5 mL 离心管, 分别标记为 Std0、Std1、Std2、Std3、Std4、Std5。
- 3) 在标记为 Std0 的 1.5 mL 离心管中加 90 μ L DNA Dilution Buffer 和 10 μ L Vero DNA Control, 即稀释为 3 ng/ μ L, 振荡混匀后低速离心 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 Std1、Std2、Std3、Std4、Std5 离心管中先分别加入 90 μ L DNA Dilution Buffer^{***}, 再进行梯度稀释^{****}, 具体稀释方法如下:

稀释管	稀释比例	终浓度
Std1	10 μ L Std0 + 90 μ L DNA Dilution Buffer	300 pg/ μ L
Std2	10 μ L Std1 + 90 μ L DNA Dilution Buffer	30 pg/ μ L
Std3	10 μ L Std2 + 90 μ L DNA Dilution Buffer	3 pg/ μ L
Std4	10 μ L Std3 + 90 μ L DNA Dilution Buffer	300 fg/ μ L
Std5	10 μ L Std4 + 90 μ L DNA Dilution Buffer	30 fg/ μ L

表 1 标准品梯度稀释

^{*}每个浓度做 3 个复孔, 该试剂是可以测试 300 pg/ μ L-3 fg/ μ L 线性范围的。若需要, 可适当扩大或缩小线性范围。

^{**}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。

^{***}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。

^{****}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。

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 μ L 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) 为了满足同步进行四个不同扩增长度的片段分析检测需求, 前处理后的待测样品量需 \geq 120 μ L, 因此建议每个样品同时准备 2 管进行前处理, 提取完成后混匀使用。

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 μ L 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 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。
- 3) 为了满足同步进行四个不同扩增长度的片段分析检测需求, 前处理后的 NCS 样品量需 \geq 120 μ L, 因此建议每个样品同时准备 2 管进行前处理, 提取完成后混匀使用。

4. 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 NTC 样本为 20 μL Mix 混合液（即 15 μL Vero qPCR Mix + 4 μL 对应 Vero Primer&Probe Mix + 1 μL IC）+ 10 μL DNA Dilution Buffer，建议配置 3 个重复孔的量。

5. 反应体系

97 bp 反应体系	体积(μL)
Vero qPCR Mix [*]	15
Vero Primer&Probe Mix-97	4
IC	1
DNA Template ^{**}	10
总体积 ^{***}	30

表 2 97 bp 扩增片段的反应体系

154 bp 反应体系	体积(μL)
Vero qPCR Mix [*]	15
Vero Primer&Probe Mix-154	4
IC	1
DNA Template ^{**}	10
总体积 ^{***}	30

表 3 154 bp 扩增片段的反应体系

219 bp 反应体系	体积(μL)
Vero qPCR Mix [*]	15
Vero Primer&Probe Mix-219	4
IC	1
DNA Template ^{**}	10
总体积 ^{***}	30

表 4 219 bp 扩增片段的反应体系

507 bp 反应体系	体积(μL)
Vero qPCR Mix [*]	15
Vero Primer&Probe Mix-507	4
IC	1
DNA Template ^{**}	10
总体积 ^{***}	30

表 5 507 bp 扩增片段的反应体系

^{*}根据反应孔数计算本次所需 Mix 混合液总量：Mix 混合液=（反应孔数+2） \times （15+4+1） μL （含有 2 孔的损失量）。通常，每个样本做 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 个阴性抽提质控 NCS+N 个待测样 TS） \times 3。

NTC (No Template Control): DNA Dilution Buffer

NCS (Negative Control Solution): 样本基质溶液或 DNA Dilution Buffer 进行样本前处理后，所得纯化液为 NCS

TS (Test Sample): 待测样本

“加样完成密封好管子后, 请低速离心 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。

下表为参考板位:

	97 bp			154 bp			219 bp			507 bp		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std1	Std1	Std1	Std1	Std1	Std1	Std1	Std1	Std1	Std1	Std1	Std1
B	Std2	Std2	Std2	Std2	Std2	Std2	Std2	Std2	Std2	Std2	Std2	Std2
C	Std3	Std3	Std3	Std3	Std3	Std3	Std3	Std3	Std3	Std3	Std3	Std3
D	Std4	Std4	Std4	Std4	Std4	Std4	Std4	Std4	Std4	Std4	Std4	Std4
E	Std5	Std5	Std5	Std5	Std5	Std5	Std5	Std5	Std5	Std5	Std5	Std5
F	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS
G	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
H	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC

表 6 上机参考板位

该示例是对 Vero 残留 DNA 各扩增片段分析的 qPCR 法检测操作的展示, 检测样本均包括: 5 个浓度梯度的 Vero DNA 标准曲线、1 个待测样本 TS、1 个阴性质控 NCS、1 个无模板对照 NTC。建议每个样本做 3 个重复孔。

6. 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)

- 1) 创建空白新程序, 选择绝对定量检测模板。
- 2) 针对四种不同长度的扩增片段创建新检测探针, 分别命名为“Vero-97”、“Vero-154”、“Vero-219”、“Vero-507”, 选择报告荧光基团为“FAM”, 猝灭荧光基团为“none”; 再创建 1 个检测探针, 命名为“IC”, 选择报告荧光基团为“CY5”, 猝灭荧光基团为“none”; 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”, 之后点击“Start Run”, 开始仪器运行。
- 4) 扩增程序设置: 设置三步法扩增程序, 反应体积 30 μL。

循环步骤	温度 (°C)	时间	循环数
预变性	95°C	5 min	1
变性	95°C	15 sec	45
退火 (收集荧光)	60°C	30 sec	
延伸	72°C	30 sec	

表 7 扩增程序

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 -3.6~-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/ μ L，后续可在检测报告中单位换算。
 - 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 Ct 值 ≥ 35 。