

ExCell Bio

ResiQuant[®] Vero DNA 残留检测试剂盒（荧光探针 qPCR 法）说明书

本品仅用于科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗

货 号

CRH00-1031S

CRH00-1031

CRH00-1032



I 产品概述

本试剂盒利用Taqman探针定量PCR方法，能快速检测各种生物制品及药品的中间品、半成品和成品中残留的非洲绿猴肾（Vero）宿主细胞DNA。试剂盒中引入了尿嘧啶-N-糖基化酶（uracil-N-glycosylase, UNG）防污染系统，可有效去除PCR产物的残留污染，大大降低了由于扩增产物污染而导致的假阳性。试剂组分中含有内标控制（IC）及参比染料ROX，通过IC的信号表现，监控反应过程是否正常进行，排除样本干扰；ROX适用于ABI荧光定量PCR仪或其他同类设备，起到荧光参比光程校正作用。

本产品适用于以非洲绿猴肾细胞株为宿主生产的生物药原液、成品、半成品、中间品或工艺过程监控样本。为获得定量样本DNA的校准曲线，试剂盒中包含制备校准曲线的DNA校准品Vero DNA Control，用于制备6个稀释梯度的校准点（300 pg/μL至3 fg/μL）。

Vero宿主细胞的残留DNA抽提建议使用本公司配套的通用型宿主DNA残留样本前处理试剂盒。首次使用前建议先完成产品的适用性研究：确认样本或样本基质是否存在干扰或者抑制物，以及选择合适的样本检测稀释条件等。

I 产品应用

本试剂盒适用于生物制药的中间产物到最终成品的不同样本类型，检测结果精确可靠，可定量检测Vero DNA残留，定量检测范围为300 pg/μL至3 fg/μL。

I 产品组分及储存条件

组分	CRH00-1031 (50T)	CRH00-1032 (100T)	CRH00-1031S (50T)
Vero DNA Control	20 μL	40 μL	20 μL
DNA Dilution Buffer	4 mL	4 mL × 2	4 mL
2× Vero qPCR Mix	750 μL	750 μL × 2	750 μL
6× Vero Detection Mix	250 μL	500 μL	250 μL

储存条件：-40 ~ -18℃保存。

有效期：规定储存条件下可保存 12 个月。

运输条件：干冰运输。

适用仪器：适用但不限于 ABI 7500、伯乐 CFX96、安捷伦 Mx3000P。

| 实验准备

仪器及耗材

1. 荧光定量PCR仪（须含有FAM， HEX/VIC通道， 可选ROX通道）；
2. 移液器和对应无菌低吸附带滤芯枪头；
3. 无菌低吸附1.5 mL离心管和八连管（适配荧光定量PCR仪）；
4. 洁净实验服， 一次性手套、口罩等。

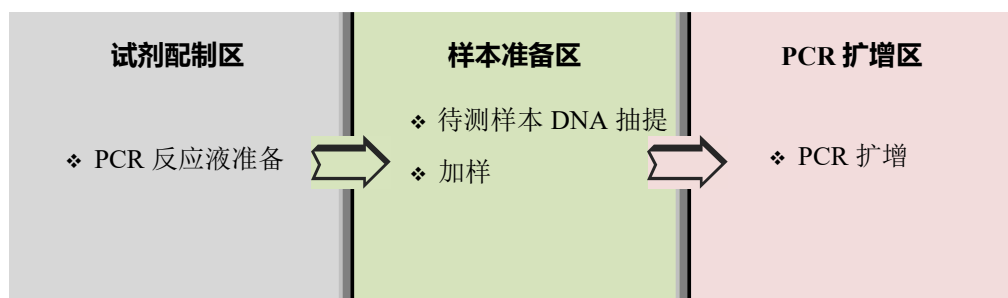
实验区域的划分

建议采用以下分区制度，避免造成交叉污染：

1. 试剂配制区：除了模板之外的所有其他试剂的独立配制区，可为独立的物理隔离区（如超净工作台）；
2. 样本准备区：准备模板的区域，包括提取和稀释样本；
3. PCR扩增区：与前两区域相对独立的进行PCR扩增的区域。

| 实验流程

英文简写	英文全称	名词解释
NTC	No Template Control	阴性对照
NEG	Negative Extraction Control	经前处理的阴性样本
TS	Test Sample	待测样本
ERC	Extraction Recovery Control	加标回收样本



PCR 反应液准备 (试剂配制区)

【注意事项】首次使用前，请将各组份恢复至室温后瞬时离心，确保试剂收集于管底。

1. 在反应前先确定要检测的样本数量和对照数量：

待检数量 = (6个浓度梯度的校准曲线 + 1个无模板对照NTC + 1个阴性质控NEG + 待测样TS个数 +

待测样本对应加标回收ERC个数) × 3;

2. 将6× Vero Detection Mix, 2× Vero qPCR Mix在恢复至室温后，涡旋混匀并快速离心；
3. 根据以下表格中的信息和所需反应数准备PCR反应混合液，每个反应孔中分装20 μL (反应之前放2 ~ 8℃)。

试剂	1 个 30 μL 反应中所需体积
2× Vero qPCR Mix	15 μL
6× Vero Detection Mix	5 μL
Total	20 μL

【注意事项】：根据待检样本数量，适当包含10%的损耗，计算在试剂配制总量内。

样本处理 (样本准备区)

待测样本 DNA 抽提：

建议配套使用本公司的通用型宿主 DNA 残留样本前处理试剂盒，首次使用时，建议先进行产品适用性研究，确认产品适用性（如基质干扰，最小稀释浓度，分析特异性等）。

校准品制备：

1. 取 7 个低吸附的 1.5 mL 离心管，分别标记为 ST0、ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。ST0 为中间稀释过渡管，其余 ST1 至 ST6 依次对应 6 个稀释梯度的校准品；

2. ST1 ~ ST6 的 6 个离心管中均加入 90 μL DNA Dilution Buffer (每加一管均需更换枪头) ;
3. 将 Vero DNA Control 从规定的储存条件中取出, 室温解冻后, 轻微涡旋混匀后快速离心, 使管盖和管壁的液体聚集到离心管底部;
4. 将 Vero DNA Control 稀释至 3 $\text{ng}/\mu\text{L}$: 计算所需的 DNA Dilution Buffer 和 Vero DNA Control 的量, 取一定体积的 DNA Dilution Buffer 加入 ST0 管中, 加入适量的 Vero DNA Control, 充分涡旋混匀, 并快速离心, 使 Vero DNA Control 的终浓度为 3 $\text{ng}/\mu\text{L}$;
5. 再按以下表格依次进行 6 次 10 倍梯度稀释 (每次转移上一管的母液到新管均需更换枪头) :

管号	稀释方法	浓度
ST1	10 μL ST0 + 90 μL DNA Dilution Buffer	300 $\text{pg}/\mu\text{L}$
ST2	10 μL ST1 + 90 μL DNA Dilution Buffer	30 $\text{pg}/\mu\text{L}$
ST3	10 μL ST2 + 90 μL DNA Dilution Buffer	3 $\text{pg}/\mu\text{L}$
ST4	10 μL ST3 + 90 μL DNA Dilution Buffer	300 $\text{fg}/\mu\text{L}$
ST5	10 μL ST4 + 90 μL DNA Dilution Buffer	30 $\text{fg}/\mu\text{L}$
ST6	10 μL ST5 + 90 μL DNA Dilution Buffer	3 $\text{fg}/\mu\text{L}$

【注意事项】: 解冻后未使用完的 DNA Dilution Buffer 可保存于 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 供 2 个月内再次实验使用; 超过 2 个月的建议 -40 ~ -18 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

加样 (样本准备区)

布板示例:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	NTC	NTC		TS1	TS1	TS1		TS1 ERC	TS1 ERC	TS1 ERC	
B					TS2	TS2	TS2		TS2 ERC	TS2 ERC	TS2 ERC	
C	ST6	ST6	ST6		TS3	TS3	TS3		TS3 ERC	TS3 ERC	TS3 ERC	
D	ST5	ST5	ST5									
E	ST4	ST4	ST4									
F	ST3	ST3	ST3						NEG	NEG	NEG	
G	ST2	ST2	ST2									
H	ST1	ST1	ST1									

1. 向已加入 PCR 反应混合液的每个反应孔中分别加入 10 μL 反应模板;

- 妥善盖好管盖或封好 96 孔板的封口膜，快速离心后上机检测。

PCR 扩增 (PCR 扩增区)

以下操作步骤以 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪为例:

- 首先“log in”，进入主界面，点击屏幕左上角“New Experiment”新建实验；
- 依次输入本次实验名称，选择机型“7500 (96 wells) ”、实验类型“Quantitation-Standard Curve”、试剂“TaqMan® Reagents”、实验时长“Standard”；
- 选择“Plate Setup”栏下的“Define Targets and Samples”设定界面，选择报告基团为“FAM”，淬灭基团为“None”，新增报告基团为“VIC”，淬灭基团为“None”；输入样本名称；
- 进入“Assign Targets and Samples”设定界面，选择样本Targets及在96孔板上的位置；在左下角的“Select the dye to use as the passive reference”下拉框选择“ROX”；如果设定校准品的绝对量，则（1）先点击“Assign Targets and Samples”，（2）再点击左侧“Instruction”下面的“Define and Setup Standards”的桔红色按钮（点击后会变为蓝色），（3）在浓度稀释区域里填写对校准品的赋值及稀释倍数等参数，即完成校准品的绝对量赋值。
- 进入“Run Method”设定界面，将反应体系设为30 μ L，按下表设置反应程序：

步骤		温度（℃）	时间（s）	循环数（次）
1	消 化	37	300	1
2	预变性	95	300	1
3	变 性	95	15	40
	退火/延伸（收集荧光）	60	60	
Vero 检测通道：FAM；IC 检测通道：HEX/VIC				

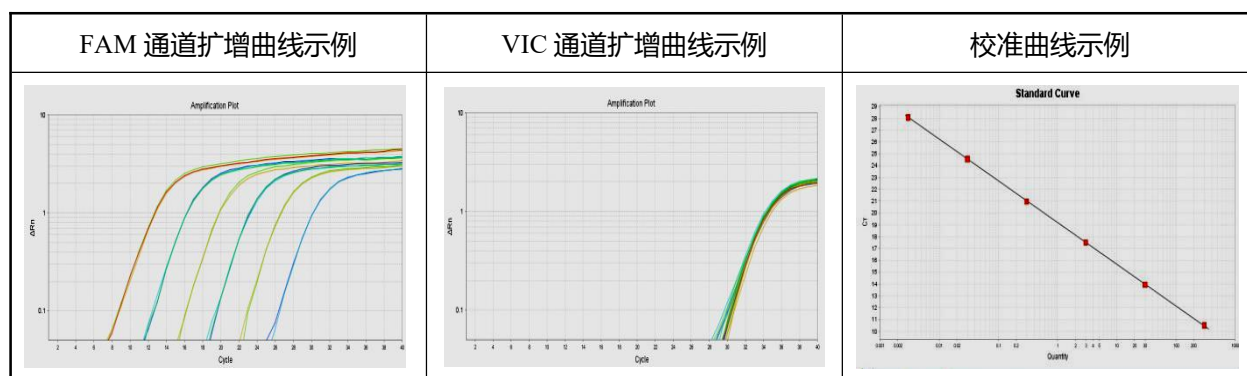
- 全部设定好后，选择界面右上角的绿色按钮“Start Run”开始检测；
- 检测完毕后选择最左侧的选择条“Analysis”，做数据分析；
- 在Amplification Plot界面选择FAM的Threshold为Auto，此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常；
- 在Standard Curve界面，可读取校准曲线的斜率，截距和 R^2 。

质量控制

1. 校准品按十倍梯度稀释, 判定校准曲线为 $R^2 \geq 0.98$, 斜率 (Slope) 为-3.60 ~ -3.10, 扩增效率 (Efficiency) 为90% ~ 110%;
2. 校准曲线中IC的Ct值CV $\leq 5\%$;
3. 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。NTC、NEG的检测结果应为Ct ≥ 32 或No Ct。

检验结果说明

参考示例



结果判读参考

下表中HEX/VIC通道的 ΔCt 为待测样本Ct值与校准曲线Ct均值之差, $C_{\text{样本}}$ 代表检测样本的浓度:

FAM	HEX/VIC	结果判定	结果报告
$Ct_{\text{样本}} < Ct_{\text{ST1}}$	/	$C_{\text{样本}} > 300 \text{ pg}/\mu\text{L}$, 超出定量上限, 需稀释到合适浓度后重新测定	/
$Ct_{\text{ST1}} \leq Ct_{\text{样本}} \leq Ct_{\text{ST6}}$	$\Delta Ct < -1$	反应液分液不均一或存在干扰, 建议重新测试	/
	$-1 \leq \Delta Ct \leq 1$	样本浓度在定量范围内, 根据校准曲线计算浓度	计算浓度
	$\Delta Ct > 1$	反应液分液不均一或存在干扰, 建议重新测试	/
$Ct_{\text{样本}} > Ct_{\text{ST6}}$ 或 No Ct	/	超出定量下限或未检出	$C_{\text{样本}} < 3 \text{ fg}/\mu\text{L}$

操作注意细节

1. 建议使用一次性手套、口罩，洁净的实验服；
2. 使用经校准的移液器；
3. 建议使用带滤芯的低吸附枪头；
4. 在不同的实验区域使用专用的移液枪和枪头及相关设备；
5. 反应制备需要充分涡旋混匀，并瞬时离心将所有液体收集到离心管底部；
6. 为避免交叉污染，请小心开合所有试剂管或反应管；
7. 阴性对照、检测样品、阳性对照使用专用移液器，不得混用，避免污染；
8. 建议加样顺序依次为阴性对照、校准品、待测样品、待测样品加标回收样（见布板示例）；
9. 尽量避免将PCR产物带到试剂配制区及样本准备区；
10. 实验台和仪器表面使用后建议用75%酒精清洁。

| 免责声明

1. 产品应按照说明书指导使用，实验者未按说明书指导操作，本公司不对由此导致的产品性能偏离承担责任；
2. 产品仅用于科学研究及商业化生产，不适用于临床诊断和治疗，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。