



# Vero Host Cell DNA Residue Detection Kit

## Vero 残留DNA检测试剂盒

Cat. No. CW3388S

### 产品简介

Vero残留DNA检测试剂盒利用探针法荧光定量PCR的原理,可检测各种生物制品及药品的中间品、半成品和成品中Vero宿主细胞残留DNA。

试剂盒配套有Vero DNA定量参考品,具有特异性强、灵敏度高、准确性高、稳定性好及操作便捷等特点。

试剂盒可搭配康为世纪的磁珠法残留DNA样本前处理试剂盒 (Cat#CW3707S),用于Vero宿主细胞残留DNA的精准检测。

**储存条件:** -30°C~-15°C, 避光保存, 尽量避免反复冻融

**运输条件:** 干冰运输

### 产品特点

灵敏度高, 最低检测限可以达到 fg水平

精密度高, 重复性及中间精密度CV值<15%

稳定性好, 多次反复冻融不影响产品性能

## 产品内容

Component	CW3388S 100 rxns
Vero DNA定量参考品 (30 ng/ $\mu$ L)	50 $\mu$ L
qPCR Reaction Buffer	2 $\times$ 850 $\mu$ L
Vero Primer&Probe MIX	300 $\mu$ L
DNA稀释液	3 $\times$ 1.5 mL

## 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. 本试剂盒已通过稳定性(冻融等因素)的验证, 无需分装。
3. 试剂盒内所有组分建议在低温环境融化后使用, 且需确保其充分溶解, 各组分使用前需充分混匀, 以保证试剂的均一性, 经混匀的试剂需经短暂离心, 以使管壁及盖子上的液体全部集中于管底。若发现DNA稀释液中有析出物, 建议于37  $^{\circ}$ C条件下进行孵育, 使DNA稀释液完全溶解。
4. 阴性样品(qPCR Reaction Buffer、Primer&Probe MIX和DNA稀释液等)和阳性样品(定量参考品和待测样品等)的配制和加样环境需区分区域, 不可在一个区域内操作, 配制人员需穿戴整齐, 戴好口罩、手套和穿好洁净服。
5. 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, 使用移液器移液时, 需避免液体挂壁。
6. 试剂盒必须在有效期内使用, 每次实验均需重新制备相应的标准曲线, 不建议不同标准曲线之间混用, 不建议不同批次的相关试剂混用。
7. 只有严格遵守说明书的操作方法, 全部使用本试剂盒配套的试剂才能保证最佳检测效果。
8. 最终的试验结果与试剂的有效性、操作者的操作方法及试验环境密切相关。

**有效期:** 规定储存条件下24个月, 具体详见试剂盒标签

## 适用机型 (包括但不限于)

ABI 7500 Real-Time PCR System

QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System

CFX96(Bio-Rad)

SLAN-96S (宏石)

## 使用方法

### 1. 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Vero DNA定量参考品进行梯度稀释，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, 3 fg/μL。

注意: Vero DNA定量参考品浓度标注于管壁标签上，请确认浓度后再进行稀释。

具体操作如下:

- 1.1 将试剂盒中的Vero DNA定量参考品和DNA稀释液置于冰上融化。待完全融化后，轻柔振荡混匀并瞬时离心3~5 s，如此重复3次。
- 1.2 取7支干净的1.5 mL离心管，分别标记为 ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6。
- 1.3 在ST0管中用DNA稀释液将Vero DNA定量参考品稀释至3 ng/μL，涡旋混匀后瞬时离心3~5 s，重复3次以确保定量参考品与DNA稀释液充分混匀。
- 1.4 在 ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6管中分别加入90 μL DNA 稀释液。
- 1.5 按下表依次进行 6 次稀释操作

Vero DNA定量参考品的稀释

Component	稀释体积	终浓度
ST1	10 μL ST0+90 μL DNA 稀释液	300 pg/μL
ST2	10 μL ST1+90 μL DNA稀释液	30 pg/μL
ST3	10 μL ST2+90 μL DNA 稀释液	3 pg/μL
ST4	10 μL ST3+90 μL DNA 稀释液	300 fg/μL
ST5	10 μL ST4+90 μL DNA 稀释液	30 fg/μL
ST6	10 μL ST5+90 μL DNA 稀释液	3 fg/μL

注意:

- (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)已融化未使用的DNA稀释液可保存于 2-8℃ 7 天，若长时间不用，请放置于-20℃。
- (3)稀释后的ST0可于-20℃保存6个月，ST1 - ST6可于-20℃保存1周。
- (4)每个梯度稀释时注意加样体积准确，为确保模板完全混匀，每个梯度稀释时需轻微震荡混匀约30s-1 min。
- (5)标准曲线浓度点可根据实际验证结果选择，应至少有 5 个浓度点。

### 2. 加样回收质控ERC (Extraction Recovery Control) 的制备

根据需要设置ERC中的Vero DNA加样浓度 (以制备加30 pg Vero DNA量的样品ERC为例)，具体操作如下:

- 2.1 取100 μL待测样品加入1.5 mL干净的离心管中。
- 2.2 再加入10 μL ST3，混匀，标记为样品ERC。

注意: 加标回收ERC和同批待测样本一起进行样本前处理，制备成加标回收ERC 纯化液。

### 3. 阴性质控NCS (Negative Control Solution) 的制备

根据实验设置阴性质控, 具体操作如下:

3.1. 取100  $\mu\text{L}$  DNA稀释液加入1.5 mL干净的离心管中, 标记为阴性质控NCS。

注意: 阴性质控NCS和同批待测样品一起进行样品前处理, 制备成阴性质控NCS纯化液。

### 4. 无模板对照NTC (No Template Control) 的制备

根据实验设置无模板对照NTC, 具体操作如下:

4.1 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, 使用DNA稀释液代替样本DNA。

### 5. qPCR 反应液 (qPCR MIX) 的准备

将各试剂放在冰上融化, 轻微涡旋混匀, 瞬时离心收集至管底后, 根据下表所示准备qPCR MIX。

qPCR MIX 配制表

组分	单孔反应
qPCR Reaction Buffer	17 $\mu\text{L}$
Vero Primer&Probe MIX	3 $\mu\text{L}$
总体积	20 $\mu\text{L}$

5.1 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 $\times 2$ )  $\times 3$

注意: 待测样品 $\times 2$ 是因为我们推荐每个待测样品检测时都应同时做样品ERC。

5.2 根据反应孔数计算本次所需的qPCR MIX总量 (含有10%的移液损耗):

$$\text{qPCR MIX} = (\text{反应孔数} \times 1.1) \times 20 \mu\text{L}$$

### 6. 加样

6.1 各试剂置于冰上融化, 轻微振荡混匀, 按下表所示加样, 加样完成后每孔总体积为30 $\mu\text{L}$ :

各反应孔加样示例

标准曲线	20 $\mu\text{L}$ qPCR MIX + 10 $\mu\text{L}$ ST1/ST2/ST3/ST4/ST5/ST6
样品ERC	20 $\mu\text{L}$ qPCR MIX + 10 $\mu\text{L}$ 样品ERC纯化液
阴性质控NCS	20 $\mu\text{L}$ qPCR MIX + 10 $\mu\text{L}$ 阴性质控NCS纯化液
无模板对照NTC	20 $\mu\text{L}$ qPCR MIX + 10 $\mu\text{L}$ DNA稀释液
待测样品	20 $\mu\text{L}$ qPCR MIX + 10 $\mu\text{L}$ 待测样品纯化液

## 96孔板排版示例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	S1		S1ERC	S1ERC	S1ERC			ST1	ST1	ST1
B	S2	S2	S2		S2ERC	S2ERC	S2ERC			ST2	ST2	ST2
C	S3	S3	S3		S3ERC	S3ERC	S3ERC			ST3	ST3	ST3
D	S4	S4	S4		S4ERC	S4ERC	S4ERC			ST4	ST4	ST4
E	S5	S5	S5		S5ERC	S5ERC	S5ERC			ST5	ST5	ST5
F										ST6	ST6	ST6
G												
H	NCS	NCS	NCS		NTC	NTC	NTC					

注意: 该示例表示的是检测6个浓度梯度的Vero DNA标准曲线 (ST1~ST6)、1个无模板对照NTC、1个阴性质控NCS、5个待测样品 (S1~S5) 和每个样品的 ERC (S1 ERC~ S5 ERC)。每个检测做3个重复孔。实际检测时可根据样品多少, 参照此示例样。

### 7. qPCR 程序参数设置

以7500 Real-Time PCR System、软件版本 2.4 为例

7.1 建空白新程序, 并在Experiment Properties面板中命名。

7.2 在 Setup 的 Plate Setup面板中, 创建新检测探针, 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 Targets and Samples”中将“Select the dye to use as the passive reference”中的参比荧光设置为“None”。

7.3 在 Setup 的 Plate Setup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 3E+05、3E+04、3E+03、3E+02、3E+01、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 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。

7.4 在Setup的Plate Setup面板中, 将无模板对照NTC孔的Task一栏设置为NTC, 将阴性质控NCS孔、待测样品孔、样品ERC孔的Task一栏设置为 Unknown, 并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 NTC、NCS、S、ERC。

7.5 扩增程序设置 (两步法), 设置反应体积30 μL

步骤	温度	时间	循环
预变性	95°C	10 min	1
变性	95°C	15 s	40
退火/延伸 (收集荧光)	60°C	1 min (读取荧光)	

7.6 运行程序: 程序设置完成之后, 点击“Start Run”, 开始仪器运行。

## 8. qPCR 结果分析

以 7500 Real-Time PCR System、软件版本 2.4 为例。

8.1 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。

注意: 阈值设置原则为在荧光曲线的拐点处略高于阴性对照。

8.2 在Analysis的Standard Curve面板中,可读取标准曲线的斜率(Slope)、截距(Intercept)、 $R^2$ 。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  $-3.6 \sim -3.1$ 。

8.3 在Export Data的Quantity一栏可读取无模板对照NTC、阴性质控 NCS、待测样品、样品ERC的检测值,单位为fg/ $\mu\text{L}$ 。后续可在检测报告中将单位换算为pg/ $\mu\text{L}$ 或pg/mL。

8.4 根据待测样品和样品ERC的检测结果计算加样回收率,加样回收率要求在50%~150%之间。

8.5 NTC的检测结果应为Undetermined或Ct值比ST6大3个Ct,或根据实验室自身验证结果设定具体标准。

8.6 NCS的Ct均值应大于标曲最低浓度Ct均值,若经验证的定量限浓度低于标曲最低浓度,则NCS的检测值应小于定量限浓度。

上述示例结果分析的参数设置仅供参考,具体需依据实验室机型及使用的软件版本进行设定,一般也可由仪器自动判读。

## 常见问题及分析

若实验结果有问题,联系技术支持,也可参考以下信息找出原因。

问题描述	可能原因	相应对策
无CT值	PCR程序设置错误,检测荧光信号的步骤有误	程序中60°C 1min处设置为荧光收集
	引物或探针降解	可通过PAGE电泳检测引物和探针是否降解
	模板量可能降解或上样量不足	如果发生模板降解,应考虑样本准备中杂质的引入及反复冻融的情况
数值不在标准范围内	配制反应体系时计算出现错误	体系配制计算时,多次复核计算结果
样本检测数值异常	样本如果为人源譬如干细胞,存在交叉干扰	人源细胞的DNA残留检测,可依据实际检测结果,依据相关法规,从工艺改进上避开这个问题,如:中间过程如质粒,病毒包装等检测人源细胞DNA残留

标准曲线不佳	DNA定量参考品稀释、混匀或者加样误差, 使得参考品不呈梯度	移液设备应精确, 移液时液体未出现挂壁现象, 液体每一步转移前应充分混匀 (查看扩增曲线是否异常), 稀释倍数应合理, 移液时应注意液体是否有按规定体积转移
	参考品出现降解	参考品反复冻融应在指定次数内
	模板中存在抑制物	查看扩增曲线是否异常, 重新稀释模板
CT值过晚	PCR各种反应成分的降解或加样量的不足	查看扩增曲线是否异常, 琼脂糖凝胶电泳以及PAGE电泳等验证反应成分是否降解, 减少稀释度重复实验
	模板中存在抑制物	查看扩增曲线是否异常, 重新稀释模板
阴性对照扩增有信号	反应体系组分 (如DNA稀释液) 被污染: 标本间的交叉污染或产物污染; 操作环境中气溶胶造成污染; 仪器或PCR管壁有荧光染料残留	实验过程中, 更换新的Mix重复实验; 反应体系在超净工作台内配制; 对实验室进行严格的区分, 减少气溶胶污染; 使用带滤芯的枪头; 建议对操作环境进行处理, 或者更换新的环境、加样器、枪头等; 清洁仪器, 做背景测试和校准; 更换管材, 使用管材应避免荧光染料污染
扩增曲线异常	模板的浓度太高或降解或体系未混匀以及充分溶解; 荧光染料的降解; 液体挥发, 耗材气密性等问题引起液体蒸发, 没有很好地聚集在管子里; 有气泡。操作问题如移液枪加样引起的气泡问题。仪器设置不当引起的曲线异常	查看扩增曲线以及相应多组分图线是否异常, 重新稀释, 上机前确认管材是否密封, 程序结束取出时注意查看液体体积是否异常; 反应管内留有气泡, 由于温度升高后气泡破裂, 使仪器检测到的荧光值突然降低所致; 进行扩增反应之前要仔细检查反应管内是否有气泡残留; 基线设置不当, 如扩增曲线断裂或下滑: 基线的终点值大于Ct值。减小基线终点(Ct值-4), 重新分析数据

<p>扩增效率低</p>	<p>荧光染料是否降解；反应体系中有PCR反应抑制物；DNA定量参考品稀释、混匀或者加样误差</p>	<p>查看扩增曲线以及相应多组分图线是否异常，重新稀释；是加入模板时所引入的，应先把模板适度稀释，再加入反应体系，减少抑制物的影响；移液设备应精确，移液时液体未出现挂壁现象，液体每一步转移前应充分混匀（查看扩增曲线是否异常），稀释倍数应合理，移液时应注意液体是否有按规定体积转移</p>
<p>扩增效率过高</p>	<p>出现非特异扩增，反应体系内模板浓度太高以及模板核酸质量较差，可能导致出现抑制PCR反应的现象</p>	<p>去除模板浓度最高的反应孔并重新分析标准曲线，重新稀释模板</p>
<p>扩增曲线不平滑</p>	<p>试剂未混匀；模板中存在抑制物；荧光信号相互存在一定干扰</p>	<p>液体每一步转移前应充分混匀（查看扩增曲线是否异常）；重新稀释模板；查看机型是否与适用机型匹配以及试剂盒所涉及荧光信号是否与对应机型适配</p>
<p>CT值前后差异大</p>	<p>阈值线设置不一致；仪器不一致</p>	<p>统一阈值线以及仪器比较数据；由于市场上核酸检测类产品靶点以及组分体系选择未统一，故试剂盒标准曲线CT值会存在差异，如有国家标准品可用国家标准品作为内控品比较数值的准确度</p>