

GNM Vero 宿主细胞残留DNA 片段分析试剂盒

说明书

货 号:

HCD0603-100(100T)

一、试剂盒简介

GNM Vero 宿主细胞残留 DNA 片段分析试剂盒（双重 qPCR-荧光探针法）是专门为定量检测各类生物制品的中间品、半成品以及成品中 Vero 宿主细胞残留 DNA 片段大小分布而设计的一款专用试剂盒。

本试剂盒运用了多重 qPCR 荧光探针技术，设计了四种不同的扩增片段（85bp、137bp、263bp、519bp），用于定量检测和分析样品中 Vero 残留 DNA 片段的大小分布状况。其具备检测迅速、灵敏度高、特异性强的特性，最低检测限可达 fg 水平。该试剂盒所配套的 Vero 定量参考品已溯源至国家标准品，具有极高的准确性。本试剂盒中包含外源性靶标的引物、探针和模板，通过外源性靶标检测结果能够对样本提取以及试剂配制过程进行监控，以避免假阴性结果的出现。

本试剂盒能够与本公司的宿主细胞残留 DNA 样品前处理试剂盒（磁珠法）配套使用，从而实现对样品中 Vero 残留 DNA 的精准定量。

二、储存条件及有效期

1. 在避光-20±5℃条件下储存，有效期 12 个月。
2. 泡沫盒/箱加干冰或冰盒运输，开瓶后避光-20±5℃储存。
3. 产品批号、生产日期见外包装盒。

三、试剂盒规格及组分

| 组分名称 | HCD0603-100 (100T) | 保存 |
|-----------------------------|--------------------|------------|
| Vero DNA 定量参考品 (3ng/μL) | 40μL | -20±5℃ |
| 2×qPCR reaction buffer | 800μL×8 | -20±5℃ |
| IC mix | 150μL | -20±5℃, 避光 |
| Vero-85bp primer&probe mix | 400μL | -20±5℃, 避光 |
| Vero-137bp primer&probe mix | 400μL | -20±5℃, 避光 |
| Vero-263bp primer&probe mix | 400μL | -20±5℃, 避光 |
| Vero-519bp primer&probe mix | 400μL | -20±5℃, 避光 |
| DNA 稀释液 | 1.5mL×4 | -20±5℃ |

四、适用机型（包括但不限于）

ABI 7500 Real-Time PCR System

SLAN-96P/S 全自动医用 PCR 分析系统

五、相关设备耗材

一次性无尘手套、1.5ml 无菌低吸附离心管、qPCR 专用无菌无酶八联排管或 96 孔板、1000μL、100μL、10μL 移液器和无菌低吸附带滤芯枪头、荧光定量 PCR 仪、掌式离心机、涡旋混匀仪。

六、检测方法

(一) 参考品与质控品制备（样本处理区）

1. Vero DNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

片段分析试剂盒中含有四种不同长度的扩增片段，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。

用试剂盒内的DNA 稀释液将 Vero DNA 定量参考品(3ng/μL)进行梯度稀释，稀释梯度依次为 300pg/μL、30pg/μL、3pg/μL、300fg/μL、30fg/μL、3fg/ μL，依次命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。操作如下：

- (1) 将试剂盒内的 Vero DNA 定量参考品置于冰上或 2~8℃下融化，待完全融化后充分混匀，瞬时离心，置于冰上备用。
- (2) 取 6 支干净的低吸附离心管，分别标记为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。
- (3) 将试剂盒内的 Vero DNA 定量参考品标记为 ST0，瞬时离心，在涡旋混匀仪上振荡 10s 混合均匀后，再次瞬时离心。
- (4) 在 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6 管中分别加入 180μLDNA 稀释液，按表 1 进行稀释操作

表 1 Vero DNA 定量参考品稀释

| 稀释管 | 稀释体积 | 浓度 |
|-----|-------------------------|----------|
| ST1 | 20 μL ST0+180μL DNA 稀释液 | 300pg/μL |
| ST2 | 20 μL ST1+180μL DNA 稀释液 | 30pg/μL |
| ST3 | 20 μL ST2+180μL DNA 稀释液 | 3pg/μL |
| ST4 | 20 μL ST3+180μL DNA 稀释液 | 300fg/μL |
| ST5 | 20 μL ST4+180μL DNA 稀释液 | 30fg/μL |
| ST6 | 20 μL ST5+180μL DNA 稀释液 | 3fg/μL |

注：配制的标准品溶液 4℃最多可存储一天。

2. 阴性质控 NCS 的制备

取 100μL DNA 稀释液加入 1.5mL 低吸附离心管中，标记为阴性质控 NCS。

注：阴性质控 NCS 和同批待测样本一起进行前处理，制备成阴性质控 NCS 纯化液。

(二) qPCR 反应体系配置 (试剂准备区)

1. 根据所要检测的定量参考品及待测样品的数量, 计算所需反应孔数, 一般每个样做 3 个重复孔。
反应孔数= (梯度定量参考品*6 + 阴性质控 NCS*1 + 无模板对照 NTC*1 + 待测样品)*3+2
2. qPCR 体系配置: 各试剂置于冰上融化, 充分融化后混匀, 按下表配置, 加入到每个反应孔中。

表 2 qPCR Vero -85 反应体系

| 组分 | 单孔体积 |
|--------------------------------|------|
| 2×qPCR reaction buffer | 15μL |
| Vero-85 primer&probe mix | 3μL |
| IC mix /DNA 稀释液 | 2μL |
| 样本 DNA (定量参考品 /NCS /NTC /待测样品) | 10μL |

表 3 qPCR Vero -137 反应体系

| 组分 | 单孔体积 |
|--------------------------------|------|
| 2×qPCR reaction buffer | 15μL |
| Vero-137 primer&probe mix | 3μL |
| IC mix /DNA 稀释液 | 2μL |
| 样本 DNA (定量参考品 /NCS /NTC /待测样品) | 10μL |

表 4 qPCR Vero -263 反应体系

| 组分 | 单孔体积 |
|--------------------------------|------|
| 2×qPCR reaction buffer | 15μL |
| Vero-263 primer&probe mix | 3μL |
| IC mix /DNA 稀释液 | 2μL |
| 样本 DNA (定量参考品 /NCS /NTC /待测样品) | 10μL |

表 5 qPCR Vero -519 反应体系

| 组分 | 单孔体积 |
|--------------------------------|------|
| 2×qPCR reaction buffer | 15μL |
| Vero-519 primer&probe mix | 3μL |
| IC mix /DNA 稀释液 | 2μL |
| 样本 DNA (定量参考品 /NCS /NTC /待测样品) | 10μL |

注: 内对照 IC 主要监控样本中是否含有 PCR 反应抑制物, 可根据需要加入。如未加 IC mix, 可用稀释液或超纯水补足相应体积。

(三) 加样（样本处理区）

1. 在分装好 PCR 反应液的 PCR 反应管中分别加入 10 μ L 处理好的样本 DNA、NCS、NTC、梯度定量参考品，表 6 为样品反应板示例。
2. 贴好封板膜，稍做离心。
3. 转移到检测区，放入相应的荧光 PCR 检测仪内，记录样本摆放顺序。

表 6 样品反应版设置示例

板 1

| | MIX-85 | | | | | | MIX-137 | | | | | |
|---|--------|-----|-----|-----|-----|-----|---------|-----|-----|-----|-----|-----|
| A | ST1 | ST1 | ST1 | S1 | S1 | S1 | ST1 | ST1 | ST1 | S1 | S1 | S1 |
| B | ST2 | ST2 | ST2 | S2 | S2 | S2 | ST2 | ST2 | ST2 | S2 | S2 | S2 |
| C | ST3 | ST3 | ST3 | S3 | S3 | S3 | ST3 | ST3 | ST3 | S3 | S3 | S3 |
| D | ST4 | ST4 | ST4 | S4 | S4 | S4 | ST4 | ST4 | ST4 | S4 | S4 | S4 |
| E | ST5 | ST5 | ST5 | | | | ST5 | ST5 | ST5 | | | |
| F | ST6 | ST6 | ST6 | | | | ST6 | ST6 | ST6 | | | |
| G | | | | NCS | NCS | NCS | | | | NCS | NCS | NCS |
| H | | | | NTC | NTC | NTC | | | | NTC | NTC | NTC |

板 2

| | MIX-263 | | | | | | MIX-519 | | | | | |
|---|---------|-----|-----|-----|-----|-----|---------|-----|-----|-----|-----|-----|
| A | ST1 | ST1 | ST1 | S1 | S1 | S1 | ST1 | ST1 | ST1 | S1 | S1 | S1 |
| B | ST2 | ST2 | ST2 | S2 | S2 | S2 | ST2 | ST2 | ST2 | S2 | S2 | S2 |
| C | ST3 | ST3 | ST3 | S3 | S3 | S3 | ST3 | ST3 | ST3 | S3 | S3 | S3 |
| D | ST4 | ST4 | ST4 | S4 | S4 | S4 | ST4 | ST4 | ST4 | S4 | S4 | S4 |
| E | ST5 | ST5 | ST5 | | | | ST5 | ST5 | ST5 | | | |
| F | ST6 | ST6 | ST6 | | | | ST6 | ST6 | ST6 | | | |
| G | | | | NCS | NCS | NCS | | | | NCS | NCS | NCS |
| H | | | | NTC | NTC | NTC | | | | NTC | NTC | NTC |

注：该示例中 ST1~ST6 表示检测的6个浓度的 Vero DNA 标准曲线，NCS 为 1 个阴性质控，NTC 为 1 个无模板对照，S1~S4 为待测样本。每个检测做 3 个重复孔。

（四）PCR 扩增（检测区）

1.qPCR 程序设置

以 ABI7500 为例：

- (1) 新建实验，选择“Absolute Quantification”。
- (2) 输入实验名称，选择标曲定量模式，TaqMan reagents 和 Standard 模式。
- (3) 选择 Vero 报告荧光基团为 FAM，淬灭基团为 None。
- (4) 选择 IC（可选）报告荧光基团为 VIC，淬灭基团为 None。
- (5) 参比荧光为 ROX（可选）。
- (6) 荧光 PCR 仪上，按表 7 设置如下程序，反应体积选择 30 μ L，开始运行。

表 7 qPCR 反应程序

| 阶段 | 温度 | 时间 | 循环数 |
|-----|------|-------|-----|
| 预变性 | 95°C | 10min | 1 |
| 循环 | 95°C | 15s | 40 |
| | 60°C | 30 s | |
| | 72°C | 1min | |

注：①各实验室可根据所用机型进行设置反应程序。
 ②IC 主要监测试剂的有效性及其抑制剂等影响因素，可根据实验室情况选择是否设置。
 ③靶标 Vero 在高浓度下，由于 PCR 扩增的竞争效应，内标 IC 的 CT 值会增大，偏离正常值。

（五）结果分析

以 ABI7500，软件版本 2.4 为例：

1. 分析设定：设置阈值(Threshold=0.2)，基线(baseline)为 3~15 循环或仪器默认基线，查看扩增曲线是否正常。
2. 在 Plate 面板将标准曲线孔设置为“S”，并在 Quantity 分别设置稀释梯度为：3000000、300000、30000、3000、300、30，单位为 fg。根据标准曲线计算待测样本浓度单位为 fg/10 μ L，可在检测报告中换算为 pg/ μ L，或 fg/ μ L。
3. 查看标准曲线 R² 与扩增效率是否符合标准。标准曲线判定标准为：R²≥0.98，扩增效率 Eff%：90%~110%。
4. 复孔间 Ct 值偏差≤0.5，相邻的 DNA 标准品之间的 Δ CT 值应在 3.1 至 3.6 的范围内。为确保准确性，可以根据 DNA 标准品的原始 CT 值进行数据过滤。
5. 对于无模板对照 NTC 和阴性质控 NCS 的检测，其 FAM 通道结果应该是未检出（Undermined）或者大于最小标准曲线（如 ST6）的 CT 值+3。
6. 若 Ct（S6）+3>Ct（NTC），表明体系存在污染，需重新实验。

注：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。

七、注意事项

1. 本试剂盒仅供科研使用，不用于临床诊断，使用前请详细阅读说明书并必须严格按照说明书进行操作；
2. 应由具备专业经验或经培训合格的人员进行操作；
3. 实验室应按试剂准备区、样本处理区、反应液配置区、扩增检测分析区分隔使用。工作流程：操作过程 应工作服、帽、鞋、手套等穿戴齐全，各区物品均为专用，不得交叉使用，避免污染；
4. 反应液分装时应尽量避免产生气泡，并注意防止泄露，以免荧光物质污染仪器；
5. 实验过程中若出现标本及试剂污染工作台及移液器，应及时用 10%次氯酸钠或 75%酒精处理。实验结束后应立即清洁工作台，并定期对工作台及各种实验用品进行消毒；
6. 不要使用超过有效期的试剂，不同批次的产品不能混用；
7. 加样所用的加样器需要定期检测，保证加样的准确性；
8. 为了避免样本中任何潜在的生物危险，检测样本应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤和黏膜；样本 的处理建议在可防止气雾外流的生物安全柜中操作，样本制备区用过的试管、吸头需打入盛有消毒剂的容 器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃；样本操作和处理均需符合相关法规要求；卫生部《微生物生物医学实 验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。

八、免责声明

试剂盒仅供研究使用，不得用于临床实验或人体实验，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司 概不负责。严格按照说明书操作，实验者违反说明书操作，后果由实验者承担。