



# Verob残留DNA检测试剂盒 (PCR荧光探针法)

HEK293 residual DNA quantitative kit  
(Q-PCR based) Instructions

✉ [info@ezassay.com](mailto:info@ezassay.com)

🌐 [www.ezassay.com](http://www.ezassay.com)

深圳易致生物科技有限公司

目录编码:VERO-DNA-PCR-100

# 目录 CONTENTS

内容	页码
产品简介	1
试剂盒组成	1
储存	1
需要但未提供的试剂	1
相关设备	2
检测步骤	2

## 产品简介

### Product Introduction

基于实时荧光定量PCR技术，本试剂盒快速可靠地定量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 Vero 宿主细胞 DNA。最低检测限可以达到fg级别，线性范围3 fg/ml~300 pg/ml。试剂盒含有 Vero细胞 DNA 定量参考品，已溯源至国家标准品。为了获得更好的 DNA 回收率，建议搭配使用易致生物宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒（货号：MB-WG-GN-100），可准确定量样品中残留的微量 Vero 细胞 DNA。

## 试剂盒组成

### Materials supplied

组分	货号：VERO-DNA-PCR-100 体积(规格：100T)
Vero qPCR Mix	750 $\mu$ L *2
Vero Primer & Probe Mix	250 $\mu$ L*2
Vero DNA Standard (30ng/ $\mu$ L)	25 $\mu$ L*2
DNA Dilution Buffer	1500 $\mu$ L *4

## 储存

### Storage

-20°C避光保存，有效期2年。

## 需要但未提供的试剂

### Other materials required

- 1、1.5 mL 或 2.0 mL 无菌低吸附离心管
- 2、八联管或 96 孔 qPCR 板
- 3、1000  $\mu$ L，100  $\mu$ L，10  $\mu$ L 无菌低吸附带滤芯枪头
- 4、PCR 水

## 相关设备

### Related Equipment

- 1、荧光定量 PCR 仪
- 2、超净台或生物安全柜
- 3、迷你离心机
- 4、微孔板离心机
- 5、漩涡振荡器
- 6、移液枪

适用机型（包括但不限于）

Bio-Rad: CFX96 Optic Module;

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

杭州博日科技: LineGene 9600 定量 PCR 系统

## 检测步骤

### Assay procedure

#### 一、Vero DNA 定量参考品（Vero DNA Standard）的稀释和标准曲线的制备

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

- 1、将试剂盒中的Vero DNA定量参考品（Vero DNA Standard）和DNA Dilution Buffer置于冰上或2-8 $^{\circ}$ C条件下融化，待完全融化后，轻弹数下混匀，短时间快速离心3~5 s，如此重复3次。
- 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。
- 3、在ST0管中用DNA Dilution Buffer将Vero DNA定量参考品（Vero DNA Standard）稀释至3 ng/ $\mu$ L，振荡混匀后短时间快速离心3~5s，重复3次以确保定量参考品（Vero DNA Standard）与DNA Dilution Buffer充分混匀。
- 4、在ST1，ST2，ST3，ST4，ST5，ST6管中分别加入90  $\mu$ L DNA Dilution Buffer。
- 5、按下表依次进行6次稀释操作。

稀释管	稀释体积	浓度
ST1	10 $\mu$ L ST0+90 $\mu$ L DNA Dilution Buffer	300 pg/ $\mu$ L
ST2	10 $\mu$ L ST1+90 $\mu$ L DNA Dilution Buffer	30 pg/ $\mu$ L

ST3	10 $\mu$ L ST2+90 $\mu$ L DNA Dilution Buffer	3 pg/ $\mu$ L
ST4	10 $\mu$ L ST3+90 $\mu$ L DNA Dilution Buffer	300 fg/ $\mu$ L
ST5	10 $\mu$ L ST4+90 $\mu$ L DNA Dilution Buffer	30 fg/ $\mu$ L
ST6	10 $\mu$ L ST5+90 $\mu$ L DNA Dilution Buffer	3 fg/ $\mu$ L

注：

\*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（Vero DNA Standard）分装储存于-20°C。

\*已融化未使用的DNA Dilution Buffer可保存于 2-8°C

\*稀释后的ST1可于-20°C保存6个月，ST2 - ST6可于-20°C保存1周；

\*为确保模板完全混匀，每个梯度稀释时需轻微震荡混匀充分。

\*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。若有需要，每个浓度点可做 3 个复孔，该试剂可测试 3 fg/ $\mu$ L-300 pg/ $\mu$ L 线性范围。若需要，可适当扩大或缩小线性范围。

\*已稀释的DNA容易降解，需现配现用。

## 二、提取效率控制(Extraction Recovery Control, ERC)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：

- 1、取100  $\mu$ L待测样品加入1.5 mL干净离心管；
- 2、加入10  $\mu$ L ST3，混匀，标记为样品ERC。
- 3、样本ERC和同批待测样本一起进行样本前处理，制备成样本ERC纯化液。

## 三、空白提取对照(Negative Extraction Control, NEC)的制备

根据实验设置空白提取对照NEC，具体操作如下：

- 1.取 100  $\mu$ L 样本基质溶液（或 DNA Dilution Buffer）加入 1.5 mL 洁净的离心管中，标记为空白提取对照NEC。
- 2.空白提取对照NEC和同批待测样本一起进行样本前处理，制备成空白提取对照NEC 纯化液。

## 四、根据实验设置无模板对照 NTC:

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PCR水或DNA Dilution Buffer作为无模板对照 NTC即可。

## 五、qPCR 反应液的准备

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=（6 个浓度梯度的标准曲线+ 1 个无模板对照 NTC+ 1 个空白提取对照 NEC + 待测样品×2）×3；

（待测样品×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）；

2、各试剂放在冰上或 2~8 °C 条件下融化，并根据下表所示准备 qPCR 反应液

组分	单孔反应
Vero qPCR mix	15 μL
Vero Primer & probe mix	5 μL
总体积	20 μL

3、根据反应孔数计算本次所需的 qPCR 反应液总量（含有 2 孔的损失量）

qPCR 反应液总量=（反应孔数+2）× 20 μL

4、各试剂置于冰上，轻微振荡混匀，按下表所示加样

标准曲线	20 μL Vero qPCR 反应液 + 10 μL ST1/ST2/ST3/ST4/ST5/ST6
NTC	20 μL Vero qPCR 反应液 + 10 μL DNA Dilution Buffer
NEC	20 μL Vero qPCR 反应液 + 10 μL NEC 纯化液
待测样品	20 μL Vero qPCR 反应液 + 10 μL 待测样品纯化液
样品 ERC	20 μL Vero qPCR 反应液+ 10 μL 样品 ERC 纯化液

加样完成后每孔总体积为 30 μL，完全混匀，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。

## 5、孔板排版示例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC		S1	S1	S1	S1	S1	S1		ST5	ST5	ST5
						ERC	ERC	ERC				
B	NTC		S2	S2	S2	S2	S2	S2		ST4	ST4	ST4
						ERC	ERC	ERC				
C	NTC		S3	S3	S3	S3	S3	S3		ST3	ST3	ST3
						ERC	ERC	ERC				
D			S4	S4	S4	S4	S4	S4		ST2	ST2	ST2
						ERC	ERC	ERC				
E	NEC		S5	S5	S5	S5	S5	S5		ST1	ST1	ST1
						ERC	ERC	ERC				
F	NEC											
G	NEC											
H												

S=Sample; NTC=No Template Control; ERC=Extraction/Recovery Control; NEC= Negative Extraction Control ST1~ST6= standard

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 个空白提取对照 NEC、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，参照此示例进行 96 孔板排版加样。

6、将 96 孔板用光学膜封闭，轻微震荡混匀，短时间快速离心 10 s 后放入 qPCR 仪。

7、qPCR 扩增程序参数设置 (两步法) (具体设置方法请参考使用的 qPCR 仪器说明)

① 创建空白新程序，选择绝对定量检测模板。

② 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，检测参比荧光为 ROX (可选)。

③ 扩增程序设置反应体积为 30  $\mu$ L，并设置循环条件如下：

步骤	温度	时间	循环数	备注
1	95°C	10 分钟	1×	/
2	95°C 60°C	15 秒 1 分钟	40×	/ 收集荧光

④ 设置完成后，保存文件，运行程序。

## 六、qPCR结果与分析

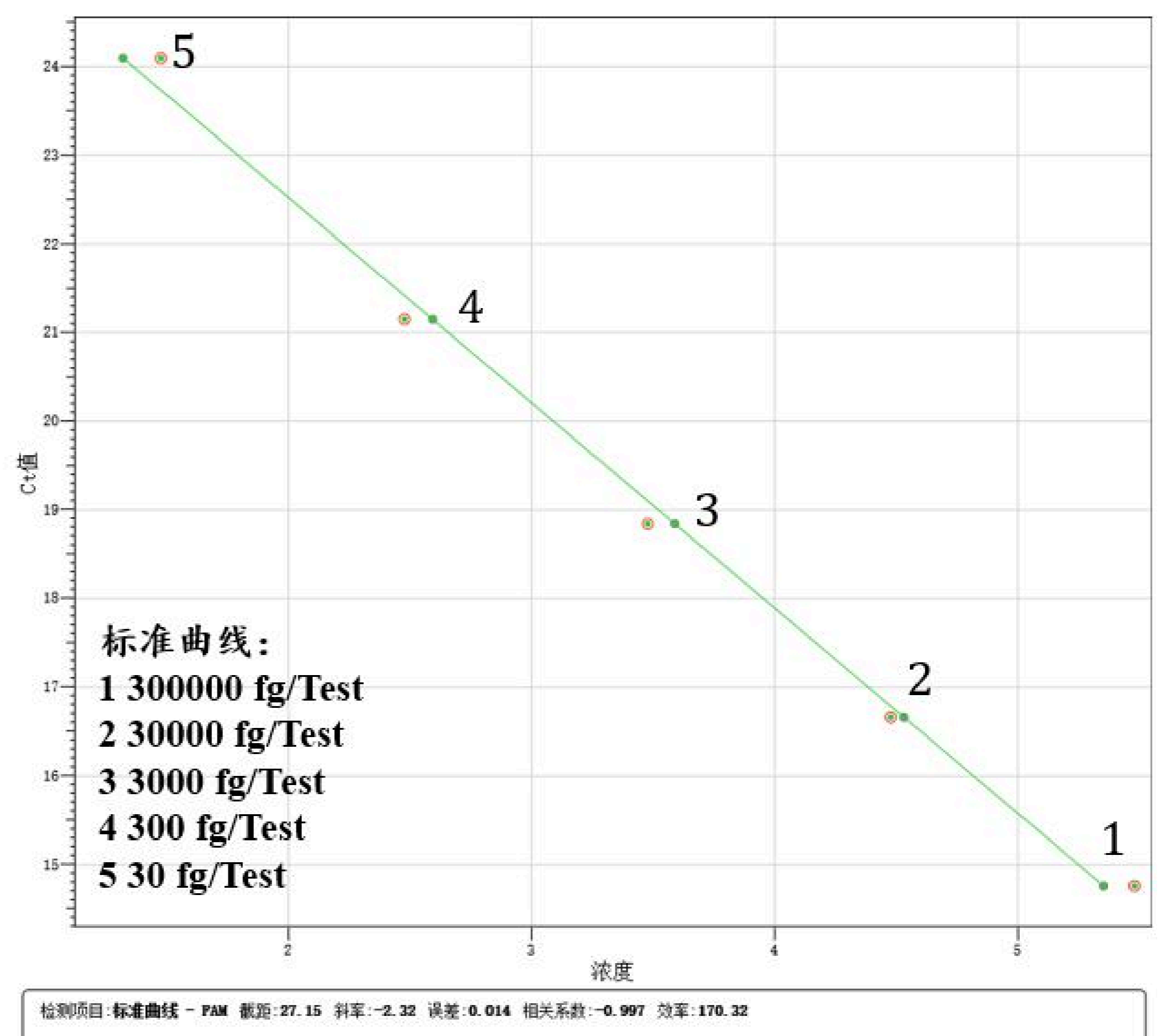
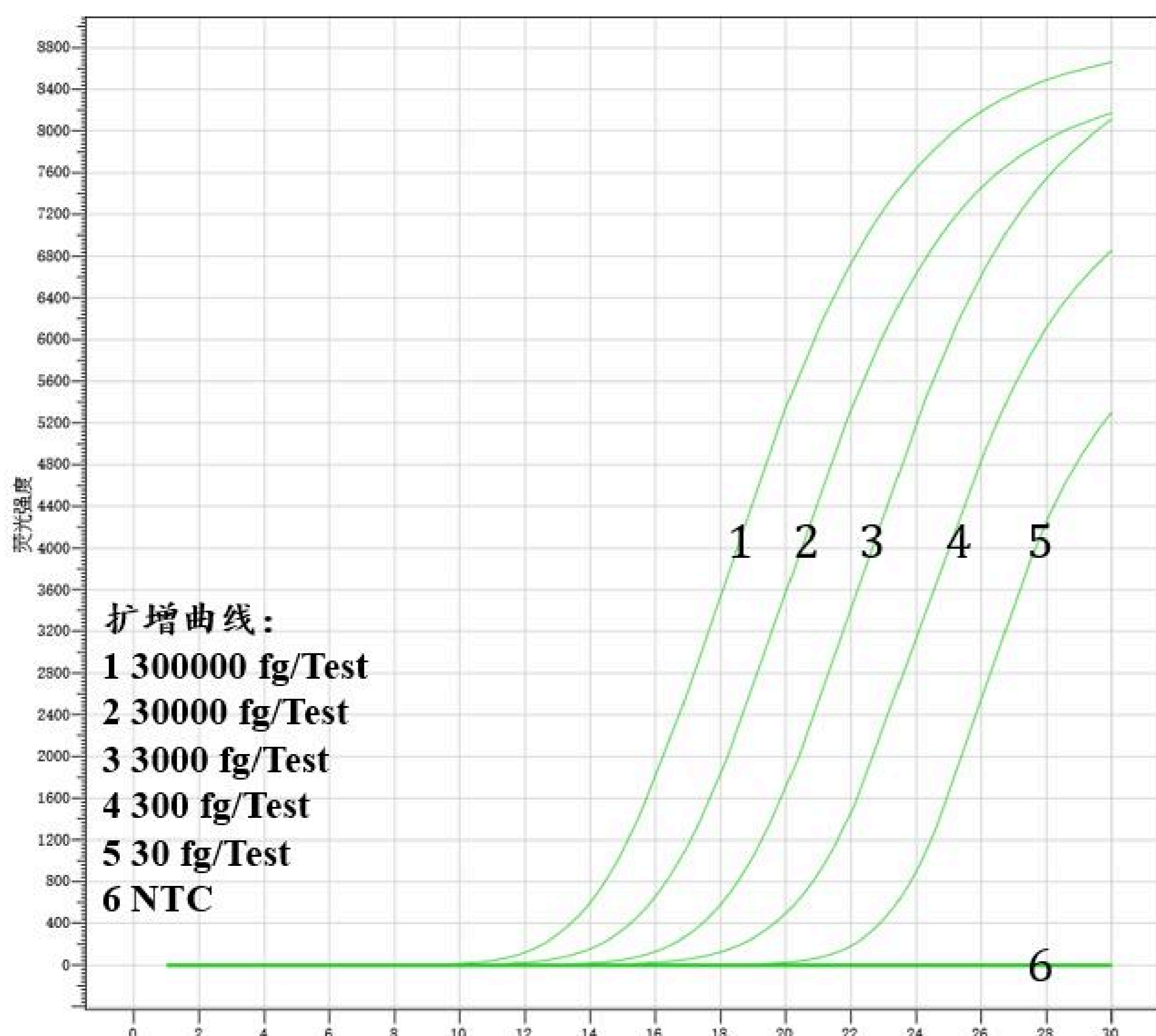
以 7500 Real-Time PCR System、软件版本 1.4 为例。

1. 在 Results 的 Amplification Plot 面板中，将 Threshold 设置为 0.02或0.2，点击 Analyze，或手动调节到正好位于阴性对照扩增曲线的最高点上方。此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常。若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”。
2. 在 Results 的 Plate 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 3000、300、30、3、0.3、0.03（含义为每孔的 DNA 总量，单位为 pg），并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。
3. 在 Results 的 Plate 面板中，将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC，将空白提取对照 NEC 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、NEC、S、ERC，之后点击。
4. 在 Results 的 Standard Curve 面板中，可读取标准曲线的斜率（Slope）、截距（Intercept）、R2。
5. 在 Results 的 Report 面板中，Mean Quantity 一栏可读取无模板对照 NTC、空白提取对照 NEC、待测样品、样品 ERC 的检测值，单位为 pg/10  $\mu$ L。后续可在检测报告中将单位换算为 pg/ $\mu$ L 或 pg/mL。

注：

- \*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。
- \*空白提取对照NEC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 NEC 的检测值应小于定量限浓度。
- \*无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undetermined 或 Ct 值  $\geq 35$ ，或根据实验室自身验证结果设定具体标准。
- \*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。

## 七、qPCR结果与标准曲线图示例



核酸与蛋白产品专业提供商  
Professional supplier of point-of-care test products

 深圳易致生物科技有限公司

 [www.ezassay.com](http://www.ezassay.com)  
 [info@ezassay.com](mailto:info@ezassay.com)