

**ResiDNA Precise Quantitative
Vero DNA Detection Kit**

RD103



使用说明书

Version 23.1

目录 Contents

01/产品概述	02
02/产品组分	02
03/保存条件	02
04/适用范围	02
05/适用机型	02
06/注意事项	02
07/实验流程	03
08/常见问题与解决方案	05

01/产品概述

ResiDNA Precise Quantitative Vero DNA Detection Kit是一款利用探针法定量检测Vero宿主细胞残留DNA的试剂盒，可用于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的专用试剂盒，具有特异性强、灵敏度高(可检测fg级)、稳定性好及操作便捷等特点。本试剂盒可搭配ResiDNA Hunter Residual DNA Sample Preparation Kit (Vazyme #RD101)使用，用于Vero宿主细胞残留DNA的精准检测。

02/产品组分

组分	RD103-01 (100 rxns)
■ 2 × Vero qPCR Mix ^a	2 × 750 μl
10 × Vero Primer & Probe Mix	300 μl
■ Vero DNA Template (30 ng/μl)	40 μl
□ DNA Dilution Buffer	7 × 1 ml
■ Negative Control	1 ml

a. 包含dNTP Mix，Mg²⁺，热启动Taq酶，通用型校正染料等，该组分在拆包装后需避光保存。

03/保存条件

-30 ~ -15℃保存，≤0℃运输。

04/适用范围

适用于从Vero细胞表达的生物制品中获得的Vero DNA残留检测。

05/适用机型

本产品适用但不限于以下仪器：
ABI QuantStudio 3, ABI QuantStudio 5, ABI 7500, ABI StepOnePlus, Bio-Rad CFX 96, Roche LightCycler 96, 博日 QuantGene 9600。

06/注意事项

本产品仅供科学研究使用，不得用于临床医学诊断及其他非合理用途。

07/实验流程

1. Vero DNA定量参考品即Vero DNA Template (30 ng/μl)的稀释及标准曲线制备：
用试剂盒中提供的DNA Dilution Buffer将Vero DNA定量参考品进行梯度稀释，稀释浓度依次为300 pg/μl、30 pg/μl、3 pg/μl、300 fg/μl、30 fg/μl、3 fg/μl。具体操作如下：
- a. 将试剂盒中的Vero DNA定量参考品和DNA Dilution Buffer置于冰上融化，待完全融化后，轻微振荡混匀，瞬时离心5 sec。
 - b. 取6支1.5 ml Nuclease-free离心管，分别标记为SD 1，SD 2，SD 3，SD 4，SD 5，SD 6，具体稀释方法见Table 1。
 - c. DNA定量参考品与DNA Dilution Buffer混合后，涡旋30 sec混匀，瞬时离心10 sec。

Table 1. Vero DNA定量参考品稀释方法

稀释管	稀释体积	终浓度
SD 1	10 μl DNA定量参考品 + 990 μl DNA Dilution Buffer	300 pg/μl
SD 2	50 μl SD 1 + 450 μl DNA Dilution Buffer	30 pg/μl
SD 3	50 μl SD 2 + 450 μl DNA Dilution Buffer	3 pg/μl
SD 4	50 μl SD 3 + 450 μl DNA Dilution Buffer	300 fg/μl
SD 5	50 μl SD 4 + 450 μl DNA Dilution Buffer	30 fg/μl
SD 6	50 μl SD 5 + 450 μl DNA Dilution Buffer	3 fg/μl

- ▲该标准曲线的线性范围为3 fg/μl - 300 pg/μl，如需要，可扩大或缩小范围；
- ▲稀释后的SD 1可于-20℃保存6个月，SD 2 - SD 6可于-20℃保存1周；
- ▲每个梯度稀释时注意加样体积准确，涡旋振荡30 sec，以确保模板充分混匀，呈现良好的线性关系。

2. 提取效率控制(Extraction Recovery Control, ERC)制备：
根据需要设置ERC中的Vero DNA加样浓度(以制备加3 pg Vero DNA量的样本ERC为例)，具体操作如下：
- a. 取100 μl待测样本加入1.5 ml Nuclease-free离心管中。再加入10 μl SD 4，混匀，标记为样本ERC。
 - b. 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。
3. 空白提取对照(Negative Extraction Control, NEC)制备：
根据实验设置NEC，具体操作如下：
- a. 取100 μl样本基质溶液(或DNA稀释液)加入至1.5 ml Nuclease-free离心管中标记为NEC。
 - b. NEC和同批待测样本一起进行样本前处理，制备成NEC纯化液。
4. qPCR反应液准备
- a. 根据所要检测的标准曲线及待测样本数量，计算所需反应孔数，一般做3个复孔。
 - b. 将各试剂置于冰上融化，轻微涡旋混匀，瞬时离心收集至管底后，按下表在管中配制qPCR扩增反应液：

组分	体积
2 × Vero qPCR Mix	15 μl 
10 × Vero Primer & Probe Mix	3 μl
Negative Control	2 μl 
DNA Template*	10 μl
Total	30 μl

* DNA Template包括标准曲线(SD 1 - SD 6)、NTC(Negative Control)、NEC纯化液、样本ERC纯化液和待测样本TS;

▲ 建议先配置反应液(除DNA Template的所有组分), 减少孔间移液差异, 可按照120%的比例配制, 如50个反应配制60个反应所需的反应液(产品实际体积大于标注体积, 可满足20%的移液损耗);

▲ 加样完毕, 涡旋混匀, 并去除气泡, 瞬时离心收集至管底。

c. 下表为参考版位:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC		NEC		SD 1	SD 1	SD 1		待测样本1	待测样本1	待测样本1	
B	NTC		NEC		SD 2	SD 2	SD 2		待测样本2	待测样本2	待测样本2	
C	NTC		NEC		SD 3	SD 3	SD 3					
D					SD 4	SD 4	SD 4		待测样本1 ERC	待测样本1 ERC	待测样本1 ERC	
E					SD 5	SD 5	SD 5		待测样本2 ERC	待测样本2 ERC	待测样本2 ERC	
F					SD 6	SD 6	SD 6					
G												
H												

5. 扩增反应程序参数设置(以ABI公司7500 qPCR仪、软件版本2.4为例):

- a. 建空白新程序, 选择绝对定量检测模板(Quantitation-Standard Curve)。
- b. 创建新检测探针, 命名为Vero-DNA, 选择报告荧光基团为FAM, 淬灭荧光基团为none, 检测参比荧光为ROX。
- c. 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“3000”、“300”、“30”、“3”、“0.3”、“0.03”(含义为每孔的DNA的总量, 单位为pg), 并且在相应的“Sample Name”一栏中命名为“SD 1”、“SD 2”、“SD 3”、“SD 4”、“SD 5”、“SD 6”; 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、待测样本TS孔、提取效率控制ERC孔的“Task”一栏设置为“Unknown”, 并在相应“Sample Name”一栏中分别命名为“NTC”、“NEC”、“TS”、“ERC”。

d. 设置扩增程序(两步法):

Stage 1	预变性	Rep: 1	95℃	10 min
Stage 2	循环反应	Reps: 40	95℃ 60℃	15 sec 1 min*

*采集FAM通道信号。

e. 运行程序:

程序设置完成之后, 点击“Start Run”, 开始仪器运行。

6. qPCR结果分析:

- 在“Analysis”的“Amplification Plot”面板中, 可初步查看扩增曲线的形态是否正常, 若系统给出的Threshold离基线太近, 导致复孔之间 C_T 相差甚远, 可手动调节Threshold至合适位置, 点击“Analyze”。
- 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-3.1 ~ -3.6左右。
- 在“Analysis”的“View well table”面板中, “Quantity”一栏可读取无模板对照NTC、空白提取对照NEC、待测样本TS、提取效率控制ERC的检测值, 单位为pg/10 μl , 后续可在检测报告中将单位换算成pg/ μl 或pg/ml。

08/常见问题与解决方案

◇扩增效率偏出90% - 110%范围

- ① 如 $C_T(\text{NTC}) - C_T(\text{SD } 6) < 3$ 或 $C_T(\text{SD } 6) - C_T(\text{SD } 5) < 3.1$, 且计算扩增效率超过100%, 提示反应体系有污染。绘制标准曲线时, 应先根据 $C_T(\text{NTC})$ 确定标准曲线有效 C_T 值范围, 舍弃受污染影响的 C_T , 使用剩余的 C_T 绘制。
- ② 不恰当的基线(Baseline)设置会增大 $C_T(\text{SD } 1)$, 进而影响扩增效率计算。手动调整基线(Baseline)为1 - 3循环。
- ③ 移液精确度差。

◇ $R^2 < 0.99$

- ① 移液精确度差。
- ② 所有试剂在使用前应充分解冻并彻底混匀。

◇标准曲线的扩增曲线分布不均一

- ① $C_T(\text{SD } 2) - C_T(\text{SD } 1) < 3.1$, 提示基线(Baseline)设置不当。手动调整基线(Baseline)为1 - 3循环。
- ② SD 1 - SD 6相邻标准品之间的 $\Delta C_T > 3.6$, 提示扩增效率差。确认所有试剂在使用前都已充分解冻并彻底混匀;
- ③ 确认所有组分浓度正确以及反应程序无误。

◇扩增曲线形状异常

- ① 扩增曲线不光滑：信号太弱，经系统校正后产生；提高模板浓度重复实验。
- ② 扩增曲线断裂或下滑：模板浓度较高，基线的终点值大于 C_T 值。减小基线终点(C_T 值 - 4)，重新分析数据。
- ③ 个别扩增曲线突然骤降：反应管内留有气泡。处理样本时要注意离心，进行扩增反应之前要仔细检查反应管内是否有气泡残留。

◇检测重复性差

- ① 复孔重复性差：由于移液偏差造成的结果偏差大，可使用反向移液法，即移液枪的2档吸取，1档排出反应液。

◇阴性对照出现明显扩增

- ① 反应体系污染：更换新的Mix、Negative Control、引物、探针，重复实验。

◇绝对定量时标准曲线线性关系不佳

- ① 参考品降解：更换新的参考品，重复实验。



Nanjing Vazyme Biotech Co.,Ltd.

Web: www.vazyme.com

Tel: +86-400-600-9335

Sales: sales@vazyme.com

Support: support@vazyme.com

