

EZ-Probe Vero Residual DNA Quantitation Kit (ROX1)

说明书

Cat. No.: EZ3602-R1

一、产品简介

EZ-Probe Vero Residual DNA Quantitation Kit (ROX1)是用于进行定量检测各种生物制品的中间品、半成品和成品中的残留 Vero 宿主细胞 DNA 的试剂盒。本试剂盒采用探针法 qPCR，可对样本中残留的 Vero 宿主细胞 DNA 进行专一快速的定量检测，其最低检测限可以达到 fg 级别。本试剂盒可与宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒配套使用。

二、产品组分

组分	货号（规格）	EZ3602-R11 (50 Rxns)	EZ3602-R12 (100 Rxns)	EZ3602-R13 (5,00 Rxns)
Vero DNA control (30 ng/μl)		25 μl × 1 tube	50 μl × 1 tube	50 μl × 5 tubes
Vero qPCR Mix (ROX1)*1		1 ml × 1 tube	1 ml × 2 tubes	1 ml × 10 tubes
DNA Dilution Buffer		1.5 ml × 2 tubes	1.5 ml × 3 tubes	1.5 ml × 15 tubes

注：*1：本试剂盒包含特异性的引物和探针、dNTPs、热启动 DNA 聚合酶、高浓度的 ROX1 和高度优化的缓冲液。

三、试剂保存条件

本试剂盒建议置于-20℃ 避光保存。

四、适用的仪器型号（如果仪器不在下表中，请使用 EZ3602-R2）

ABI 5700, 7000, 7300, 7700, 7900HT, 7900HT Fast; StepOne™, StepOne Plus™. (选择检测参比荧光为 ROX)
Bio-Rad CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, MiniOpticon™, Opticon®, Opticon 2, Chromo4™; Roche LightCycler™ 96, Roche LightCycler™ 480; Eppendorf Mastercycler® ep realplex, realplex 2s; Illumina Eco qPCR; Qiagen/Corbett Rotor-Gene® Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000; Thermo Scientific PikoReal Cyclyer; Analytikjena qTOWER 3G; Cepheid SmartCycler®; Bioer Linegene 9600; HONGSHI SLAN®-96P. (选择检测参比荧光为 None)

五、注意事项

- 使用前，将各个组分从-20℃ 冰箱中取出，室温放置 5 ~ 10 分钟或用手紧握试剂管使之充分融化，上下颠倒 10 次使之充分混匀（非常重要），然后使用离心机短暂离心至管底，放在冰上备用。
- 配液和加样步骤尽量都在冰上操作。

六、简要操作步骤

1. Vero DNA control 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 control 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。

具体操作如下:

1.1 将试剂盒中的 Vero DNA control 和 DNA Dilution Buffer 置于冰上融化, 待完全融化后, 上下颠倒 10 次使之充分混匀, 低速离心 10 sec。

1.2 取 7 支洁净的 1.5 ml 离心管, 分别标记为①, ②, ③, ④, ⑤, ⑥, ⑦。

1.3 在标记为①的 1.5 ml 离心管中加入 90 μ l DNA Dilution Buffer 和 10 μ l Vero DNA control, 即稀释为 3 ng/ μ l, 充分振荡混匀后低速离心 10 sec。

1.4 在②, ③, ④, ⑤, ⑥, ⑦ 管中先分别加入 90 μ l DNA Dilution Buffer, 再按下表进行梯度稀释, 稀释操作步骤同 1.3。

稀释管	稀释体积	终浓度
②	10 μ l ① + 90 μ l DNA Dilution Buffer	300 pg/ μ l
③	10 μ l ② + 90 μ l DNA Dilution Buffer	30 pg/ μ l
④	10 μ l ③ + 90 μ l DNA Dilution Buffer	3 pg/ μ l
⑤	10 μ l ④ + 90 μ l DNA Dilution Buffer	300 fg/ μ l
⑥	10 μ l ⑤ + 90 μ l DNA Dilution Buffer	30 fg/ μ l
⑦	10 μ l ⑥ + 90 μ l DNA Dilution Buffer	3 fg/ μ l

备注:

1. 每个浓度做 3 个复孔, 该试剂可测试 3 fg/ μ l ~ 300 pg/ μ l 线性范围。如有需要, 可适当扩大或缩小线性范围。
2. 为减少反复冻融次数和避免污染, 建议初次使用时将 Vero DNA control 分装储存于-80°C。
3. 已融化未使用的 DNA Dilution Buffer 可于 2 ~ 8°C 保存 7 天, 若长时间不使用, 请放置于-20°C。

2. 无模板对照 NTC 的制备

根据实验设置无模板对照 NTC, 具体操作如下:

2.1 无模板对照 NTC 无需进行样本前处理, 在 qPCR 法检测残留 DNA 含量阶段开始配制即可。

2.2 每管或孔中的 NTC 样本为 20 μ l Vero qPCR Mix (ROX1)+10 μ l DNA Dilution Buffer。

3. qPCR 反应体系的配制与加样

按照如下表格进行 qPCR 反应体系的配制:

组分	体积
Vero qPCR Mix (ROX1)	20 μ l
DNA template	10 μ l
总体积	30 μ l

备注:

1. 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 个重复孔/样。
$$\text{反应孔数} = (\text{6 个浓度梯度的标准曲线} + \text{1 个无模板对照 NTC} + \text{待测样本}) \times 3$$
2. 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR Mix 总量: Vero qPCR Mix (ROX1) = (反应孔数 + 2) $\times$ 20 μ l (含有 2 孔的损失量)。
3. 加样完成后, 盖上封板膜并封紧, 用离心机 1000 rpm 离心 1 分钟, 将液体离心至 qPCR 孔板底部, 如有气泡, 需将气泡排尽。
4. DNA Template 包括 6 个浓度梯度的 Vero DNA 标准曲线 (② ~ ⑦)、1 个无模板对照 NTC、待测样本。每个检测做 3 个重复孔。

4. qPCR 反应程序如下:

Step	1	2	
	热启动酶活化	PCR 反应	
		循环数 (40 cycles)	
		解链	退火&延伸 (采集荧光信号)
温度	95°C	95°C	60°C
时间	5 min	10 sec	30 sec

注意: 1. 95°C 反应 5 分钟的目的是活化热启动酶, 此步骤为必须步骤, 因此不能省略; 2. 在退火&延伸这一步骤需要进行荧光信号的采集; 3. 不需要跑熔解曲线; 4. 设置程序时选择探针报告荧光基团为 FAM, 淬灭荧光基团为 BHQ1。

七、qPCR 结果分析

- 待上机结束, 正确设置各项数据后即可读取标准曲线的 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 3.4 左右。
- 无模板对照 NTC 的检测结果显示为 Undetermined 或 Ct 值 ≥ 35 。