



VeriQuant™ Guide

USER GUIDE

本Guide同样适用于20 μ L体系和50 μ L体系，为降低移液误差提高实验成功率，新用户强烈建议使用50 μ L体系。

目录 CONTENTS

01 产品信息

产品描述	_____	03
实验原理	_____	03
产品组分和存储条件	_____	03
实验流程	_____	04

02 实验详情

注意事项	_____	05
试剂准备	_____	06
运行实验	_____	08
数据分析	_____	09
Troubleshooting	_____	09



产品描述

VeriQuant™免疫分析试剂盒是基于qPCR，在体外对特异性目标蛋白的进行定量分析。该试剂盒具有宽检测范围和高灵敏度，样品量使用量极少的特点。工作流程简化，且无需复杂的洗涤步骤。由于其在高灵敏度、无洗涤、无振荡且检测所需样本量最少等各方面突破了界限，因此为了获得良好试验结果，需要特别注意移液的准确性和实验过程中的混匀步骤。

实验原理

两种识别目标蛋白不同表位的抗体分别偶联特异性的寡核苷酸。当两种抗体同时结合到同一目标蛋白时，两个寡核苷酸靠近。随后通过Synthesis Enzymes连接并作为模板，通过特异性引物和TaqMan探针进行实时定量PCR（qPCR）扩增。荧光信号强度与循环阈值（Ct值）呈负相关，从而实现目标蛋白的高特异性和高灵敏度定量检测。

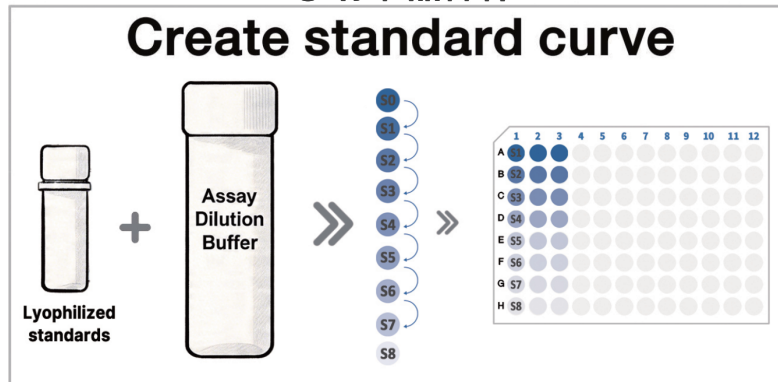
产品组分和存储条件

VeriQuant™免疫分析试剂盒使用低温相变材料运输。收到后，将试剂盒整体保存在-20°C。每个试剂盒都配有整个试验所需的所有试剂。

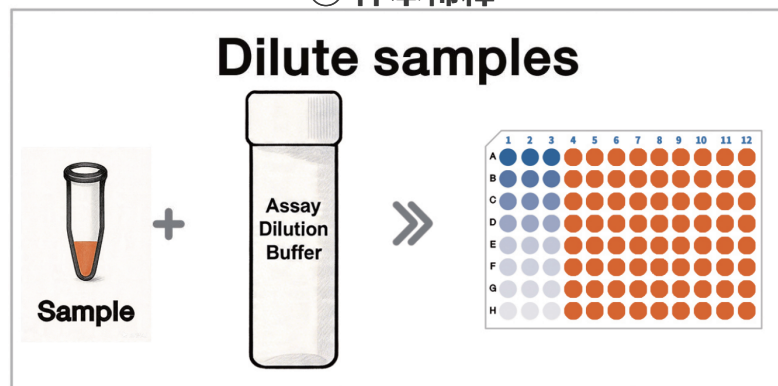
未提供但实验所需耗材

- 实时荧光定量 PCR 仪
- 2块96孔0.2mL PCR板（可以用PCR八联管，PCR单管替代）
- 高精度移液器，离心管及低吸附一次性吸头：0.5-10 μ L, 2-20 μ L, 20-200 μ L, 200-1000 μ L
- 恒温箱
- 双蒸水或去离子水
- 荧光定量PCR封板膜（压敏高粘型）和封板膜刮板或滚轮
- 5mL加样槽*2个
- 96孔低温金属冰盒
- 无酶、无热源的1.5 mL离心管
- 微孔板离心机

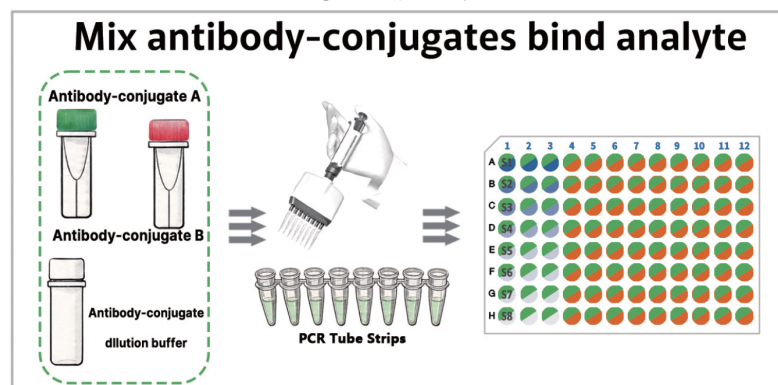
① 标准品稀释



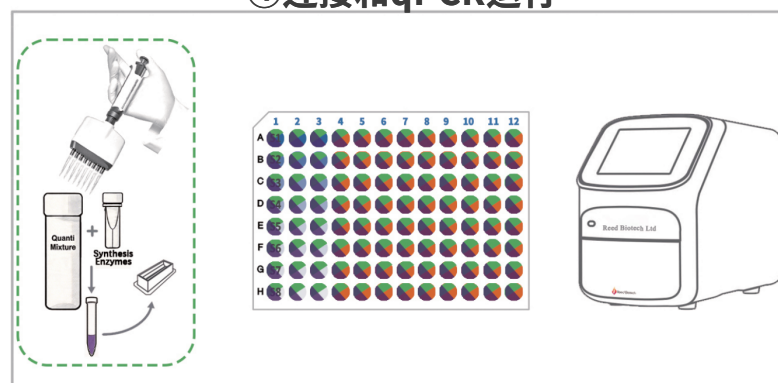
② 样本稀释



③ 免疫反应



④ 连接和qPCR运行





⊕ 注意事项

- 实验开始前戴上手套，使用无DNase/无RNase/无热源的塑料容器，并练习正确的DNA处理技术。
- 使用封板膜专用刮板或滚轮，以确保荧光定量PCR封板膜完全粘附在PCR板上，避免任何蒸发或污染。
- 使用最佳移液操作来减小CV值。
- 实验开始时准备2块PCR板，分别命名为**PCR板1**（便于使用多通道移液器，用于临时储存所有配置好的试剂）和**PCR板2**（用于正式实验的反应板）
- 使用板架来固定PCR板2，以避免在打开封板膜时液体溅出。
- 建议试验做三重复，这样异常值更容易识别。
- 确保使用与qPCR仪器和模块兼容合适的PCR板。
- PCR板不要涡旋。
- 稀释或混匀试剂对实验结果至关重要。可以通过小心地上下移液10次来完成，或者用手掌或实验室工作台等固定物体撞击板子的一侧
- 反应前使用微孔板离心机低速短暂离心，将管盖和管壁的残留液体收集至管或板底。操作时尽量避免气泡产生。这一步非常重要，不混匀或者混匀不彻底会影响基线平稳。

检测前试剂处理

- 移液前对试剂管进行离心，以确保管内液体全部汇集至管底。
- Synthesis Enzymes无需解冻。将Synthesis Enzymes始终保存在-20°C或冰上。Synthesis Enzymes黏度较高，移液时需精准取样，且切勿产生气泡。
- 除Synthesis Enzymes外，所有试剂在室温下解冻。
- 操作加样时将Synthesis Enzymes和解冻试剂保存在冰上。
- 在准备过程中，PCR板1使用冷藏的96孔低温金属冰盒来保持所有试剂处于低温状态。如果没有96孔低温金属冰盒，请将PCR板1放在冰上。
- 如果样品中存在任何颗粒物质，在进行检测之前对样品进行离心或过滤。

稀释处理须知

- 在处理样本稀释时，良好的操作规范对于获得最佳CV值至关重要
- 确保移液器已校准。使用合适量程的高精度移液器，如2μL或20μL。强烈推荐使用多通道移液器使实验操作更容易，并最大限度地降低CV值。
- 使用低吸附吸头。
- 封板膜必须紧密贴合PCR板，尤其是在板边缘使用封板膜刮板或滚轮使封板膜贴合。这将防止任何液体蒸发，并避免在混合时板孔之间污染。
- 使用专为微量移液设计的低吸附加样槽，方便多通道移液器使用。

标准曲线制作须知

- 确保复溶与梯度稀释的计算设置及步骤均已正确执行。
- 确保标准品的复溶操作正确无误。
- 确保在梯度稀释步骤中充分混匀，且每一步均更换移液器吸头（使用后丢弃）。
- 检查标准曲线数据，排查是否存在异常值。默认异常值为：任何回收率超出标准值 70%–130%，或重复数据的CV（变异系数）大于15%的数值。

▶ 试剂准备

试剂解冻

Synthesis Enzymes为液态无需解冻。除Synthesis Enzymes外，所有试剂在室温下解冻，将Synthesis Enzymes和解冻试剂保存在冰上操作。

样本准备

1. 为了尽量减少样本基质对实验的影响，所有样本检测前均需稀释**10倍**，在PCR板1的每个检测孔中加入相应体积的样本和Assay Dilution Buffer。可根据实际样本用量调整终体积。

组分	体积
待测样品	5 μL
Assay Dilution Buffer	45 μL

2. 用移液器反复吹打，混匀检测孔内的液体。

混合Antibody-conjugates

根据实际使用的检测孔数及反应体系体积，来计算需要配置的**抗体偶联物混合液**，根据反应体系按比例调整用量，考虑到移液的损耗，实际配置的体积应该比理论用量多30%以上。若采用 20 μL 反应体系，每孔需加入 2 μL 抗体结合物混合液。若采用 50 μL 反应体系，每孔需加入 5 μL 抗体结合物混合液。下表是按照96T的用量来推荐的配置体系。

1. 将向 1.5 mL 微量离心管中加入下列组分（1:1:98），然后通过移液器反复吹打混匀。

组分	20 μL 体系	50 μL 体系
Antibody-conjugate A	3 μL	7 μL
Antibody-conjugate B	3 μL	7 μL
Antibody-conjugate Dilution Buffer	294 μL	686 μL

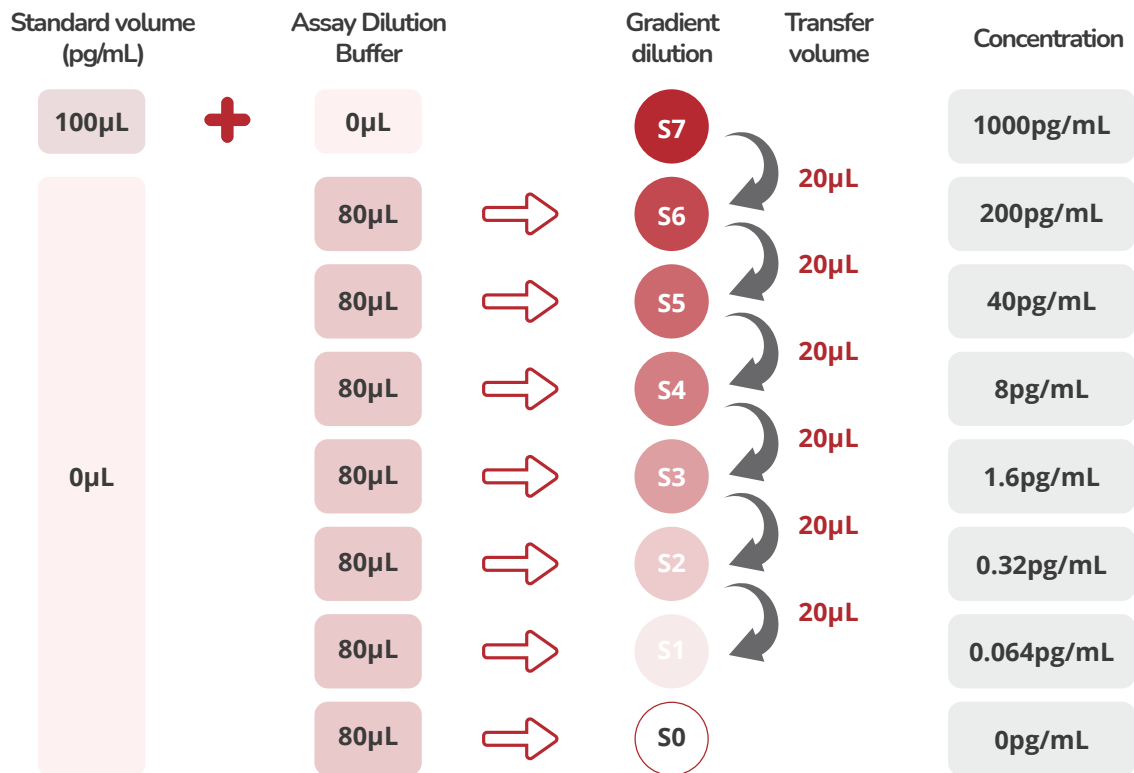
2. 向PCR板1用于储存抗体偶联物混合液的一列每个孔中加入的量根据体系来确定，以便于8通道移液器的操作，20 μL 体系的每孔加入量需 $\geq 32 \mu\text{L}$ （同一行的12列的理论用量为 $2 \times 12 = 24 \mu\text{L}$ ），50 μL 体系的每孔加入量需 $\geq 80 \mu\text{L}$ （同一行的12列的理论用量为 $5 \times 12 = 60 \mu\text{L}$ ）。

标准品复溶 (以Mouse IL-6为例, 标准品为1000pg冻干粉)

1. 加入1mL Assay Dilution Buffer复溶一支标准品, 1000pg/mL。轻轻颠倒混匀 5 次, **切勿涡旋振荡**。(注意: 请勿使用移液器吹打混匀, 因为结晶粉末可能会吸附在移液器吸头内。若数分钟后粉末仍未完全溶解, 可重复颠倒操作)
2. 在室温下静置15分钟。

配置标准曲线

3. 准备PCR板1 (用于临时储存所有已经配好的工作液, 方便后续多通道移液器操作, 标曲稀释需在同一列中进行。PCR板1实验全程需放置在低温金属冰盒上)
4. **5倍梯度稀释**: 在PCR板1的标准品列中, 从**第二孔开始**, 每孔加入80μL检测试剂稀释缓冲液(Assay Dilution Buffer)。从复溶好的标准品工作液中吸取100μL至第一孔, 记为**S7**。从第一孔吸取20μL至第二孔, 混匀得到孔浓度为200pg/mL标准品, 记为**S6**, 依此逐步稀释至倒数第二孔**S1**。最后一孔则作为**S0**空白孔, 不需要再从**S1**管中吸取液体。标准品工作液需现配现用。
5. 使用刮板或滚轮均匀刮压封板膜, 确保PCR板密封完好。用手掌轻轻拍打板子侧面三次充分混匀。将PCR板放入微孔板离心机中, 3000g离心 1 分钟。



运行实验

A. 结合待测物 (37°C 孵育 1 小时)

1. 使用多通道移液器，根据反应体系体积，从 PCR 板 1 中吸取适量抗体偶联物混合液和标准品或稀释后样品，加入 PCR 板 2 的检测孔中。下表是不同反应体系的试剂加样体积。

反应体系	20 μ L 体系	50 μ L 体系
抗体偶联物混合液	2 μ L	5 μ L
标准品或稀释后样品	2 μ L	5 μ L

2. 用荧光定量 PCR 封板膜密封 PCR 板 2，用手掌轻轻拍打板子侧面三次充分混匀。以 3000 \times g 离心 1 分钟。

3. 将 PCR 板 2 在室温下孵育 1 小时。除混匀或离心步骤外，将 PCR 板 2 置于板架上静置。

B. 执行 qPCR

1. 将取 25 μ L **Synthesis Enzymes** 直接加入到 **Quanti Mixture** 管中（管中体积为 5mL，具体需根据实际用量计算，Synthesis Enzymes 与 Quanti Mixture 体积比为 1:200），颠倒 5 次混匀，得到 qPCR 反应混合物（此混匀步骤应在 A 反应完成之前完成，也可转移至加样槽中，便于下一步使用多通道移液器加样）。

2. A 反应完成后，在 A 反应 PCR 板 2 **所有检测孔** 中都加入 **对应体积** 的 qPCR 反应混合物（**下表是不同反应体系的加样体积**）。轻柔吹打混匀，避免在孔中引入气泡。

反应体系	20 μ L 体系	50 μ L 体系
qPCR 反应混合物	16 μ L	40 μ L

3. 用 PCR 封板膜密封 PCR 板，使用刮板或滚轮确保封板膜完成粘合。

4. 轻轻拍打 PCR 板侧面混匀，3000 g 离心 1 分钟。

5. 在 qPCR 仪上创建一个新的程序。

6. 输入实时荧光定量 PCR (qPCR) 仪器参数。

项目	参数
实验类型	标准曲线或定量标准曲线
报告荧光基团	FAM
淬灭基团	NFQ-MGB *
参比荧光	None
检测孔	全部设为 Unknown
阈值	0.2
基线	15
基准	3-15

* 对于没有此选项的仪器，请输入“无”或“无荧光”

7. 根据模块类型选择合适的程序条件运行 qPCR 板。

Step	Temp($^{\circ}$ C)*	Time	Stage
Ligation	25	20min	Hold
Inactivation	95	2min	Hold
Denaturation	95	15 s	40 cycles
Annealing/extension	60	1min	

* 设置变温速率为 1.6 $^{\circ}$ C/秒

8. 将实验保存为模板，运行模板。**注意：重复使用保存的模板进行后续检测。**

🔍 数据分析

1. 将运行数据以.ed或.sds格式或.csv格式保存。
2. 根据以上得到的实验数据，计算对应标准品复孔的平均Ct值，使用**4PL曲线拟合云计算工具**以标准品浓度为横坐标，Ct值为纵坐标，在双对数坐标轴上拟合四参数逻辑函数的标准曲线及方程。将样本平均Ct值代入标准曲线方程计算得到对应的样本浓度(云计算工具详见www.reedbio.cn)。

🔍 Troubleshooting

现象	可能原因	解决方案
数据文件中没有Ct值	qPCR软件未正确设置	确保将全部 96 个孔均设定为未知样品孔。
		确保已设置各项参数。
		确保是最后一个循环结束后收集数据
标准曲线不佳 (回收率偏低)	梯度稀释操作不当	核实每个孔中检测稀释缓冲液和标准品的用量是否准确 确认稀释梯度范围在试剂盒说明书推荐的范围内。
	孔间存在交叉污染	确保板孔密封严密，避免在混匀和离心过程中发生液体溅出
		确保在不同孔位或样品之间更换移液器吸头。
标准曲线不佳 (变异系数高)	移液操作不当	核实移液器已校准
		确保使用低吸附滤芯吸头，这对于微量移液操作至关重要
		确保在反复吸打液体时，尽量减少气泡产生。
		遵循移液操作规范，例如：将液体加至板孔侧壁，并进行目测检查。
		尽可能使用多通道移液器
		确保每个移液器吸头均已卡紧，并通过目测确认液体吸取量准确
		微量操作时请勿采用反向移液法
	若微量（如 2 μ L）操作存在一致性问题，可尝试将体积增加至 5 μ L	
	混匀操作不当	使用封板膜刮板确认酶标板已密封完好
		在所有加入新试剂的步骤中，确保充分混匀（例如：反复吸打 10 次，或充分敲击板体，使液体在孔内从一侧流至另一侧）
确保在混匀步骤完成后对PCR板进行离心，使所有试剂均沉降于板孔底部。		
微量操作时出现蒸发现象	通过使用PCR板或其他方式尽量缩短操作准备时间，避免微量液体长时间暴露	
重复样本数量不足	样品进行三次重复检测，以便更容易识别异常值	
标准曲线不佳（低浓度端变异系数高）仅在曲线低浓度端变异系数高，而曲线线性段无此现象。	该检测方法已达到检测灵敏度极限	合格数据要求变异系数（CV）小于 20%，超出该区间内的数据不可靠。