

# *E.coli* 总 RNA 残留检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 说明书

## 产品简介

*E.coli* 总RNA残留检测试剂盒采用qPCR荧光探针法原理，用于定量检测生物制品中残留的大肠杆菌总RNA。适用的生物制品类型包括核酸、细胞、细胞培养上清、质粒收获液、蛋白制品等。

本试剂盒通过对目标物种设计特异性引物和探针，结合反转录和荧光探针 qPCR 检测技术，实现一步法定量检测。试剂盒经完整性能验证，达到专一且快速检测 *E.coli* 总 RNA 残留的目的。

## 试剂盒组分

表 1 试剂盒组分

组分	30 反应装量	100 反应装量
<i>E.coli</i> RNA 定量标准品	10 $\mu\text{L}$ ×1 管	50 $\mu\text{L}$ ×1 管
qPCR Reaction Buffer	150 $\mu\text{L}$ ×1 管	500 $\mu\text{L}$ ×1 管
qPCR Reaction Enzyme MIX	30 $\mu\text{L}$ ×1 管	100 $\mu\text{L}$ ×1 管
<i>E.coli</i> RNA Primer&Probe MIX	60 $\mu\text{L}$ ×1 管	200 $\mu\text{L}$ ×1 管
R-IPC MIX	30 $\mu\text{L}$ ×1 管	100 $\mu\text{L}$ ×1 管
50×ROX Low	15 $\mu\text{L}$ ×1 管	50 $\mu\text{L}$ ×1 管
50×ROX High	15 $\mu\text{L}$ ×1 管	50 $\mu\text{L}$ ×1 管
RNA 稀释液	1.8 mL×1 管	1.8 mL×2 管

## 包装与规格

货号 10903008 30 反应/盒

货号 10903007 100 反应/盒

## 储存条件及有效期

储存条件：-20°C±5°C避光保存。

有效期：12 个月。

试剂盒反复冻融5次内有效。

## 适配机型（包括但不限于）

- Thermo Scientific: ABI 7500 Real-Time PCR System (ROX Low)
- ABI Quant Studio 6 (ROX High)
- 杭州博日科技: FQD-96A (No ROX)

## 需要额外准备的耗材与设备

实验前请准备好下列耗材与设备：

- 1.5ml 或 2mL 无菌低吸附离心管
- 与 PCR 仪适配的 96 孔 qPCR 板或八联排管
- 1000μl, 200μl, 10μl 无菌低吸附带滤芯枪头
- 荧光定量 PCR 仪
- 离心机
- 震荡器
- 各规格移液器（如 1000μl, 200μl, 10μl, 2.5μl 等）

## 实验操作流程

### 1. *E.coli* RNA 定量标准品稀释和标准曲线制备

使用试剂盒中的 RNA 稀释液将 *E.coli* RNA 定量标准品进行梯度稀释，具体操作如下：

- 1) 将试剂盒中的 *E.coli* RNA 和 RNA 稀释液置于冰上或 2-8°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 3~5s，如此重复 3 次。
- 2) 取 7 支洁净的 1.5 mL 离心管，分别标记为 ST、ST0、ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。

- 1) 在 ST 管中取 5 $\mu$ L *E.coli* RNA 定量标准品加 20 $\mu$ L RNA 稀释液稀释至 2ng/ $\mu$ L，得到 ST，振荡混匀后快速离心 3~5 sec，重复 3 次以确保定量标准品与 RNA 稀释液充分混匀。
- 2) 在 ST0，ST1，ST2，ST3，ST4，ST5 管中分别加入 45  $\mu$ L RNA 稀释液。
- 3) 按表 2 依次进行 6 次稀释操作，每次稀释后重复震荡离心 3 次，确保充分混匀后再进行下一个梯度的稀释。

表 2 标准品梯度稀释

稀释管	稀释体积	终浓度 (pg/ $\mu$ L)
ST0	5 $\mu$ L ST + 45 $\mu$ L RNA 稀释液	200
ST1	5 $\mu$ L ST0 + 45 $\mu$ L RNA 稀释液	20
ST2	5 $\mu$ L ST1 + 45 $\mu$ L RNA 稀释液	2
ST3	5 $\mu$ L ST2 + 45 $\mu$ L RNA 稀释液	0.2
ST4	5 $\mu$ L ST3 + 45 $\mu$ L RNA 稀释液	0.02
ST5	5 $\mu$ L ST4 + 45 $\mu$ L RNA 稀释液	0.002

- 每个浓度做 3 个复孔，标准曲线浓度梯度可根据实际验证结果选择，应至少有 5 个浓度梯度。
- 为减少反复冻融次数和避免污染，建议初次使用时将 *E.coli* RNA 定量标准品分装储存于 -20 $^{\circ}$ C $\pm$ 5 $^{\circ}$ C。
- 标准品的稀释应在每次实验前重新制备，不可使用前一次或前一日制备的标准品。
- 已融化未使用的 RNA 稀释液可保存于 2-8 $^{\circ}$ C 7 天，若长时间不用，请放置于 -20 $^{\circ}$ C $\pm$ 5 $^{\circ}$ C。

## 2. 待测样本 S 的制备

根据实验设置待测样本 S，具体操作如下：

- 1) 取 100  $\mu$ L 待测样本加入 1.5 mL 洁净的离心管中，标记为 S，进行样本前处理，制备待测样本 S 纯化液。
  - 待测样本在检测前需进行 DNase I 处理以消除 gDNA 对检测的影响。DNase I 用量和消化条件需按实际样本优化。
- 2) 建议设置加标样品（ERC），与待测样品进行同步处理，作为回收率考察。

一般建议样品加标量设置为样品 *E.coli* RNA 实际残留量的 2-10 倍。若样品 *E.coli* RNA 实际残留量低于本试剂盒的定量限，加标量应设置在定量限范围之内，保证检测结果的准确性。

### 3. 阴性质控 NCS 的制备

根据实验设置阴性抽提质控 NCS，具体操作如下：

- 1) 取 100  $\mu\text{L}$  样本基质溶液（或 RNA 稀释液）加入 1.5 mL 洁净的离心管中，标记为 NCS。
- 2) 阴性质控 NCS 和同批待测样本一起进行样本前处理，制备成阴性质控 NCS 纯化液。

### 4. 反应体系混合液（qPCR MIX）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 = (5 个浓度梯度的标准曲线 + 1 个无模板对照 NTC + 1 个阴性质控 NCS + 待测样品数)  $\times$  3

- 2) 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 MIX = (反应孔数 + 2)  $\times$  15  $\mu\text{L}$

- 3) 各试剂放在冰上或 2-8 $^{\circ}\text{C}$  条件下充分融化后，轻微震荡混匀，参照表 3 所示配制反应 MIX。

表 3 qRT-PCR MIX 配制表

组分	单孔反应 ( $\mu\text{L}$ )
qPCR Reaction Buffer	5
qPCR Reaction Enzyme MIX	1
<i>E.coli</i> RNA Primer&Probe MIX	2
ROX	0.5
RNA 稀释液	6.5
总体积	15

### 5. 加样

- 1) 上述各试剂置于冰上融化，轻微振荡混匀，按照表 4 所示加样：

表 4 各反应孔加样示例

标准曲线	15 $\mu$ L qPCR MIX+10 $\mu$ L ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	15 $\mu$ L qPCR MIX+10 $\mu$ L RNA 稀释液
NCS	15 $\mu$ L qPCR MIX+10 $\mu$ L NCS 纯化液
待测样品	15 $\mu$ L qPCR MIX+10 $\mu$ L 待测样品纯化液

加样完成后每孔总体积为 25  $\mu$ L。

## 6. IPC 组配制反应液的制备和加样

- 1) 每次实验需做一个阴性质控 (IPC-NCS) 和各个待测样品的 IPC (IPC-S) 检测, 根据表 5 和表 6 配制。

表 5 IPC qRT-PCR MIX 配制表

组分	单孔反应 ( $\mu$ L)
qPCR Reaction Buffer	5
qPCR Reaction Enzyme MIX	1
R-IPC MIX	2
ROX	0.5
RNA 稀释液	6.5
总体积	15

表 6 IPC-MIX 各反应孔加样示例

IPC-NCS	15 $\mu$ L IPC-qPCR MIX+10 $\mu$ L NCS 纯化液
IPS-S	15 $\mu$ L IPC-qPCR MIX+10 $\mu$ L 待测样品 S

加样完成后每孔总体积为 25  $\mu$ L。

表 7 96 孔板排版示例

	1	2	3	4	5	6	7
A	ST1	ST1	ST1		S1	S1	S1
B	ST2	ST2	ST2		S2	S2	S2
C	ST3	ST3	ST3		S3	S3	S3
D	ST4	ST4	ST4				

E	ST5	ST5	ST5		IPC-NCS	IPC-NCS	IPC-NCS
F					IPC-S1	IPC-S1	IPC-S1
G	NCS	NCS	NCS		IPC-S2	IPC-S2	IPC-S2
H	NTC	NTC	NTC		IPC-S3	IPC-S3	IPC-S3

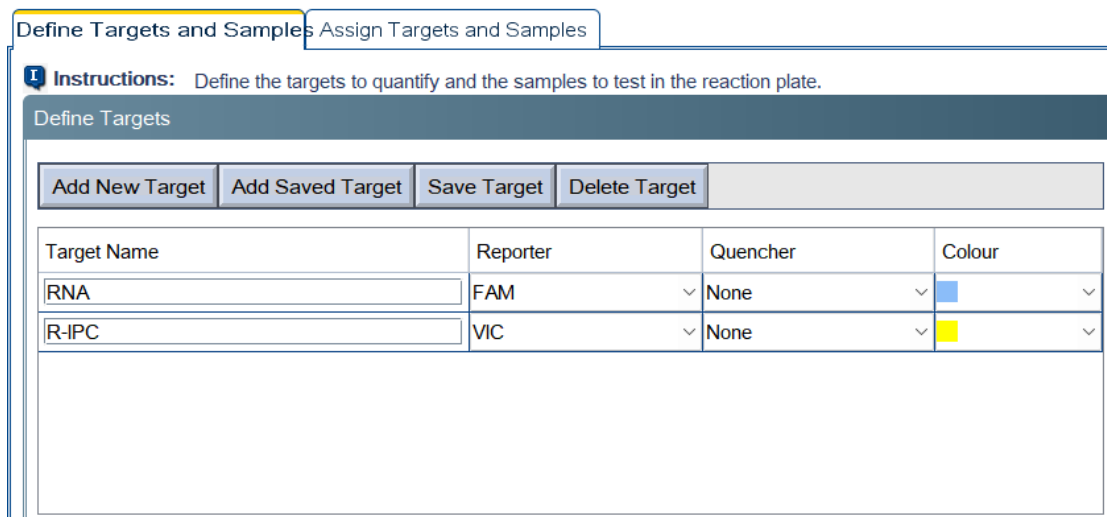
该示例表示的是 5 个浓度梯度的标准曲线（ST1~5）、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控 NCS、3 个待测样品（S1~S3）。针对 IPC 的阴性质控（IPC-NCS）和待测样品的 IPC（IPC-S1, IPC-S2, IPC-S3）。每个检测做 3 个重复孔。实际检测时可根据样品多少，参照表 7 示例进行 96 孔板排版加样。

2) 加样完成后，将 96 孔板用光学膜封闭，轻微震荡混匀，短时间快速离心 10 sec 后放入 qPCR 仪，如有气泡，需将气泡排尽。

## 7. 扩增程序参数设置

以 ABI 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 2.3 为例

1) 创建空白新程序，选择绝对定量检测模板。创建新检测探针，命名为“*E.coli* RNA”，选择报告荧光基团为“FAM”，猝灭荧光基团为 none；创建新检测探针，命名为 RNA IPC，选择报告荧光基团为 VIC，猝灭荧光基团为 none；检测参比荧光为 ROX（可选,参比荧光可根据仪器型号等情况，选择是否需要添加）。



2) 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“20”、“2”、“0.2”、“0.02”、“0.002”（含义为每孔的 RNA 浓度，单位为 pg/μL），并且在相应的“Sample Name”一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。

- 3) 将无模板对照 NTC 孔的“Task”一栏设置为“NTC”；将阴性质控 NCS 孔、待测样本 S 孔的“Task”一栏设置为“Unknown”，并且在相应的“Sample Name”一栏中分别命名为“NCS”、“S”。
- 4) 扩增程序设置：设置两步法扩增程序，反应体积 25  $\mu\text{L}$ 。

表 8 qPCR 扩增程序

循环步骤	温度 ( $^{\circ}\text{C}$ )	时间	循环数
逆转录	55	5 min	1
预变性	95	30 sec	1
变性	95	5 sec	45
退火/延伸 (收集荧光)	60	30 sec (采 光)	

- 5) 之后点击“Start Run”，开始仪器运行。

## 8. qPCR 结果分析

- 1) 在“Analysis”的“Amplification Plot”面板中，系统会自动给出“Threshold”，有时系统给出的“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”。此时可在“Multicomponent Plot”初步查看扩增曲线的形态是否正常。
- 2) 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 -3.8~-3.1。
- 3) 在“Analysis”的“View well table”面板中，“Quantity”一栏可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样本 S 的检测值，单位为  $\text{pg}/\mu\text{L}$ ，后续可在检测报告中进行单位换算。
- 4) 结果分析的参数设置需依据具体的机型及使用的软件版本，一般也可由仪器自动判读。
- 5) 基于实际样品基质与 NCS 基质存在差异，请优先考虑样品回收率结果；如未测试加标样品，则样品的 Ct -IPC 值应该与 NCS 的 Ct -IPC 值一致或  $\pm 1$ ，如样品的 Ct -IPC 值与 NCS 的 Ct -IPC 值相比明显增大，则表明样品可能存在明显抑制。
- 6) 阴性质控 NCS 的 Ct 值应大于标曲最低浓度 Ct 的均值。

- 7) 无模板对照 NTC 的检测结果应为 Undetermined 或大于标准曲线最低浓度点 2 个 Ct 值以上。

## 注意事项

1. 本产品仅作科研用途，不用于临床诊断。
2. 本试剂盒需在有效期内使用。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
4. 注意在不同加样步骤间及时更换吸头、避免交叉污染，避免长时开盖。
5. 使用本试剂前请仔细阅读本说明书，实验应规范操作，包括样本处理、反应体系的配制及加样。
6. 试剂盒内所有组分建议在低温环境融化后使用，且使用前每个组分请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。
7. 避免反复冻融本品，反复冻融可能使产品性能下降。
8. 本产品长期保存可置于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 避光保存。如果在短期内需要频繁使用，可在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存。

## 【基本信息】

生产企业名称：北京阅微基因技术股份有限公司

住所：北京市海淀区三里河路 17 号 10 层 1005 至 1010

售后服务单位名称：北京阅微基因技术股份有限公司

生产地址：北京市昌平区中关村科技园区白浮泉北街 1 号院 1 号楼-1 至 6 层 101 三层及六层 601