

E.coli 残留总 RNA 检测试剂盒 (RT-PCR 荧光探针法) 说明书

【产品简介】

E.coli 残留总 RNA 试剂盒用于定量检测各种生物制品中大肠杆菌总 RNA 的残留情况，辅助进行生物制品的核酸质控。

本试剂盒使用 RT-PCR 荧光探针法原理，将反转录和荧光探针 qPCR 检测技术融合，可实现一步法定量检测。通过在大肠杆菌 含量高、表达稳定的 RNA 靶标上，设计特异性引物和探针，通过绝对定量的方法测定总 RNA 残留。

【规格】

100 Reactions

【储存条件】

储存条件见下表，有效期 18 个月。

【试剂盒组成】

表 1 试剂盒组分

组 分	管数	体积	存储条件
One Step RT-qPCR buffer	1	1ml	-20℃
One Step Enzyme Mix	1	100μl	
E.coli/RNA Primer& Probe Mix	1	370μl	
E.coli/RNA 定量标准品 (2ng/μL)	1	25μl	
RNA IPC Primer&Probe Mix	1	370μl	
ROX High	1	50μl	
ROX Low	1	50μl	
RNA 稀释液	2	1ml	

通用机型（包括但不限于）

- ◆ ABI PRISM 7500
- ◆ CFX96 (Bio-Rad)
- ◆ Linegene 9600plus（博日）

配合不同机型使用时，请注意选择适配的参比染料 ROX。

仪器	ROX 参比染料
Applied Biosystems® 5700, 7000, 7300, 7700, 7900HT, StepOne™, and StepOnePlus™	ROX High
Applied Biosystems® 7500, ViiA™ 7, QuantStudio™ 12K Flex, Agilent Mx3000P™, Mx3005P™, and Mx4000™	ROX Low
Rotor-Gene™, DNA Engine Opticon™, Opticon™ 2, Chromo 4™ Real-Time Detector, Mastercycler® ep realplex, Smart Cycler®, Roche LightCycle®480, Roche LightCycler®Nano, Bio-Rad CFX96, and Illumina Eco™	No ROX

用户自备材料

- ◆ 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
- ◆ 水浴锅 / 金属浴
- ◆ 离心机
- ◆ 振荡器
- ◆ 各规格移液器（如 1000μL, 200μL, 10μL, 2.5μL 等）
- ◆ 磁力架

【操作步骤】

一、样品前处理（自备）

1. 样品中大肠杆菌（*E.coli*）RNA 残留检测作为残留类的检测项目，检测前需要去除供试品中的 DNA，因此需要对供试品进行样本前处理。可对样本进行如下处理：

表 前处理反应体系

组份名称	单反应用量(μL)
DNase I	1
10X Reaction Buffer with MgCl ₂	2
RNase Inhibitor	0.5
无酶去离子水	12.5
供试品	4
总共	20

2. 按照上表方式配置供试品 DNase I 消化液，震荡混匀，离心 5s；
3. 将配置完成的供试品 DNase I 消化液置于 37℃恒温水浴锅中孵育 60min；
4. 取出孵育后供试品 DNase I 消化液，瞬时离心 5s 后置于 65℃干式恒温器中孵育 10min 灭活 DNase I 酶，将灭活后的供试品 DNase I 消化液放置于 2-8℃冰箱暂存。

二、qPCR 操作步骤

1. 定量参考品及 NTC 制备

- 1.1 将试剂盒中的大肠杆菌 RNA 定量标准品和 RNA 稀释液置于冰上，待完全融化后，轻微振荡混匀，短暂离心将液体甩至管底；

- 1.2 取 6 支干净的 1.5mL 离心管，分别标记为 ST0，ST1，ST2，ST3，ST4，ST5；

1.3 标准品稀释过程如下表

标准品代号	稀释体积	浓度 (fg/μl)
ST0	5 μL 定量参考品 + 45 μL RNA 稀释液	2.00E+05
ST1	5μl ST0+45μl RNA 稀释液	2.00E+04

苏州欣协生物科技有限公司

电话：0512-63037851

网址：www.xinbiotech.cn

邮箱：info@szxxbio.com

ST2	5μl ST1+45μl DNA 稀释液	2.00E+03
ST3	5μl ST2+45μl DNA 稀释液	2.00E+02
ST4	5μl ST3+45μl DNA 稀释液	2.00E+01
ST5	5μl ST4+45μl DNA 稀释液	2.00E+00

1.4 NTC 的制备：100uL RNA 稀释液；

2. RT-qPCR 反应液的制备和加样

2.1 从冰箱里取出各试剂置于冰上解冻。

2.2 PCR 反应液配制：详见下表，One Step RT-qPCR buffer、One Step Enzyme Mix、E.coli RNA Primer& Probe Mix、ROX，这 4 种试剂可提前预混成 Mix，再依次加入 5μL 标曲 (ST1/ST2/ST3/ST4/ST5)、NTC、供试品溶液，混匀。每个样各做三个平行。

2.3 根据反应孔数计算本次所需的 Mix 混合液总量：

Mix 混合液 = (反应孔数 +2) × (10+1+3.6+0.4) μL (含有 2 孔的损失量)

加样完成密封好管子后，请先低速离心 10 sec 将管壁的液体离心收集至管底，再震荡混匀 5 sec 以上，完全混匀反应液，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。

表 RT-qPCR 反应液配制表

组分	单孔反应 (μL)	备注
One Step RT-qPCR buffer	10	可以提前预混 Mix，每孔加 15μL mix 再对应加 5μL 标曲 /NTC/ 样品
One Step Enzyme Mix	1	
<i>E.coli</i> /RNA Primer& Probe Mix	3.6	
ROX	0.4	
标曲 /NTC/ 样品	5	
总体积	20	

* 请对应机型选择适配的 ROX；若机型适配为 no ROX，请加入等体积的去离子水（要求无核酸及核酸酶污染级去离子水）。

3.. IPC 组配制反应液的制备和加样（如果在检测中已经有如加标回收等方式，IPC 检测可以取消）

每次实验需做一个无模板对照（IPC-NTC）和各个待测样本的 IPC（IPC-S）检测，根据下表

组分	单孔反应 (μL)	备注
One Step RT-qPCR buffer	10	可以提前预混 Mix，每孔加 15μL mix 再对应加 5μL IPC-样品 / IPC-NTC
One Step Enzyme Mix	1	
<i>E.coli</i> /RNA Primer& Probe Mix	3.6	
ROX	0.4	
IPC-NTC / IPC-样品	5	
总体积	20	

备注：

加标体系 ERC：90μL 样品 +10μL ST3；

加标回收率 =ERC/（0.9* 样品 +0.1*ST3）；（加标回收率质控标准：50%~150%）

加标回收与 IPC 二选一，如选择加标回收，可将 IPC-S 更换为 ERC-S。

三、反应程序和参数设置

以 ABI 公司 7500 qPCR 仪，软件版本 V2.0.6 为例。

1. 创建空白新程序，选择绝对定量检测模板，taqman 探针法。
2. 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。
3. 设置三步法反应程序如下表：反应体积 20μL。

循环步骤	温度	时间	循环数
逆转录	50℃	15min	1
预变性	95℃	30 sec	1
变性	95℃	10sec	45
退火 / 延伸（收集荧光）	60℃	40 sec	

备注：其他型号的设备，如遇问题可咨我司或仪器厂家。

4. 运行 PCR 程序。

四、结果分析

1. 在 Results 的 Amplification Plot 中，可初步查看扩增曲线的形态是否正常。机器通常会自动设置阈值（Threshold）和基线（Baseline），当 target 设置等不同时可能会出现多个阈值，而导致结果分析有误，此时请手动设置阈值线，但需确保设置的阈值线在指数扩增区，如通常 Threshold 设置为 0.15，选择 Auto Baseline，点击 Analyze，可看到调整后的结果。
2. 在 Results 的 Standard Curve 中，可读取标准曲线的斜率（Slope）、截距（Intercept）、R²。可接受标准 Effective：85%~110%，R² ≥ 0.98；
3. 在 Results 的 Report 中，Mean Quantity 一栏可读取无模板对照 NTC、待测样本的检测值，单位为 fg/μL。NTC 的 Ct 值应大于 ST5 的 Ct 值，检测值应低于 2fg/μL。
4. 分析 IPC 的 Ct 值，正常情况下样本的 Ct-IPC 值应该与无模板对照 NTC 的 Ct-IPC 值一致或 ±2。如样本的 Ct-IPC 值与无模板对照 NTC 的 Ct-IPC 值相比明显增大，则表明样本可能存在明显抑制。
5. *E.coli* RNA 残留量计算：

异常数据及检测过程出现意外情况比如管漏液，样本蒸发以及样本加错等，其产生的数据应删除，并在检测记录中说明原因，其他正常的的数据可以继续应用于检测结果的计算中

$$E.coliRNA \text{ 残留量 (fg/ng DNA)} = \frac{E.coliRNA \text{ 残留检测值 (fg/}\mu\text{L)}}{\text{样品浓度 (ng/}\mu\text{L)} / 5}$$

【注意事项】

1. 本试剂盒已通过稳定性（冻融等因素）的验证，无需分装。
2. 阴性样品和阳性样品（参考品和待测样品等）的配制环境需区分区域，不可在一个区域内操作，配制人员需穿戴整齐，戴好口罩、手套和穿好洁净服。
3. 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。

4. 试剂盒必须在有效期内使用。
5. 试剂盒内所有组分建议在低温环境融化后使用。
6. 只有严格遵守说明书的操作方法，全部使用本试剂盒配套的试剂才能保证最佳检测效果。
7. 尽量在当天完成样本前处理纯化后立即进行后续 qPCR 检测，以保证检测结果的准确性。
8. 最终的试验结果与试剂的有效性、操作者的操作方法及试验环境密切相关。
9. 公司只对试剂盒本身负责，不对因使用该试剂盒所造成的样本消耗负责，请使用者使用前充分考虑到样本的可能使用量，预留充足的样本。
10. 本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断。

