

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

本试剂盒专用于科研，而非用于诊断

**Cat. No. HG-ER001**

### 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

### 产品组成

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°C
One Step Enzyme Mix	1	100μL	
<i>E.coli</i> RNA Primer& Probe Mix	1	370μL	
<i>E.coli</i> 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	

### 储存条件与有效期

所有试剂都于 -20°C 避光保存与运输，有效期 18 个月。

### 适用机型

包括但不限于 ABI7500、BioRad CFX96、博日 FQD-96A、Roche Light Cycler 480 等实时定量荧光 PCR 仪器。

配合不同机型使用时，请注意选择适配的参比染料 ROX

表 2. 不同仪器适配的参比染料 ROX

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

## 需要准备的耗材与设备

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

## 实验步骤

一、样品前处理 (需使用我司试剂盒: HG-CL300)

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。可选择使用我司配套的样本前处理试剂盒, 处理方式如下:

表 3. 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 <sub>2</sub>	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°C 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°C 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°C 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 按表 4 进行标准品的梯度稀释, 每次稀释确保充分混匀后再进行下一个梯度的稀释。(表格中的体积仅供参考, 可根据实际实验需求等比例扩大);

表 4. 大肠杆菌 RNA 标准品稀释系

稀释管	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	5 μL ST0 + 45 μL RNA 稀释液	2.00E+04
ST2	5 μL ST1 + 45 μL RNA 稀释液	2.00E+03
ST3	5 μL ST2 + 45 μL RNA 稀释液	2.00E+02
ST4	5 μL ST3 + 45 μL RNA 稀释液	2.00E+01
ST5	5 μL ST4 + 45 μL RNA 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: 详见表 5, 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 5. 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) 和各个待测样品的 IPC (IPC-S) 检测, 根据表 6

表 6. IPC 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 IPC- 样 品 / IPC-NTC
One Step Enzyme Mix	1	
RNA IPC 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, 可将表 7 中 IPC-S 更换为 ERC-S。

### 4. 反应孔排版示例

表 7. 96 孔板排版示例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
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									
F										IPC-S1	IPC-S1	IPC-S1
G					NTC	NTC	NTC			IPC-S2	IPC-S2	IPC-S2
H					IPC-NTC	IPC-NTC	IPC-NTC			IPC-S3	IPC-S3	IPC-S3

备注: 该示例表示的是检测 5 个浓度梯度的 RNA 标准曲线、1 个无模板对照 NTC、3 个待测样本。针对 IPC 的无模板对照 (IPC-NTC) 和待测样本的 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本多少, 参照表 7 示例进行 96 孔板排版加样。

加样完成后将 96 孔板用光学膜封闭, 轻微震荡混匀, 用 96 孔板专用离心机短暂离心将液体全部甩至管底后放入 qPCR 仪中。

### 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表 8: 反应体积 20μL。

表 8. 反应程序

循环步骤	温度	时间	循环数
逆转录	50°C	15min	1
预变性	95°C	30 sec	1
变性	95°C	10sec	45
退火 / 延伸 (收集荧光)	60°C	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）、 $R^2$ 。可接受标准 Effective: 85%~110%， $R^2 \geq 0.98$ ；

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/ $\mu$ L。NTC 的 Ct 值应大于 ST5 的 Ct 值，检测值应低于 2fg/ $\mu$ L。

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  $\pm 2$ 。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

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

## 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。

## 免责声明

在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。

