

大肠杆菌总 RNA 残留探针法 qPCR 试剂盒

E.coli Residual Total RNA Detection Kit

目录号: [ml104241](#)

使 用 说 明 书

产品及特点

大肠杆菌是生物制品生产中应用较为广泛的宿主细胞之一。理论上,存在于生物制品中的微量大肠杆菌 RNA 残留都可能转导到人体细胞, 可能导致癌变或其他病理变化。因此, 宿主细胞 RNA 残留量的控制是生物制品质量控制中非常重要的环节, 对残留 RNA 检测具有重要的意义。为此本公司, 开发了基于荧光定量 RT-PCR 技术的、专门用于检测样品中大肠杆菌总 RNA 残留的本产品,

它有下列特点:

1. 即开即用, 用户只需要提供样品。
2. 引物和探针经过优化, 分析灵敏性高, 可以达到 0.001pg/μL。
3. 提供阳性对照, 便于区分假阴性样品。
4. 特异性高, 引物和探针是根据大肠杆菌 RNA 高度保守区设计, 不会跟其他生物的 RNA 发生交

	叉反应。 5. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。用于定量检测时线性范围至少为 5 个数量级。 6. 本产品足够 50 次 20μL 体系的探针法荧光定量 RT-PCR 反应。 7. 本产品只能用于科研。		
规格及成分	成分	规格	包装
	探针法 qRT-PCR 缓冲液	0.5mL	0.5 mL 绿盖管
	探针法 qRT-PCR 酶混合液 V2.0	0.5mL	0.5mL 红盖管
	荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿色盖
	大肠杆菌 qPCR 引物-探针混合液	150 μ L	0.5mL 棕色管
	大肠杆菌 RT-PCR 阳性对照(100pg/ μ L)	50 μ L	0.5mL 黄色盖
	使用手册	1 份	1 份
	本产品采用五孔盒包装		
使用方法	一、稀释标准曲线样品 (以 100pg-0.001pg/μL 这 6 个 10 倍稀释度为例)。由于标准品浓度非常高，因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行，千万不能污染样品或本试剂盒的其他成分)。 1. 标记 6 个离心管，分别为 6, 5, 4, 3, 2, 1。 2. 用带芯枪头分别加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，用带芯枪头，下同)。 3. 在 6 号管中加入 5 μL 1$\times$100pg/μL 的阳性对照(试剂盒提供)，充分震荡 1 分钟，得 1$\times$10pg/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。 4. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 1$\times$10pg/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 1pg/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。 5. 换枪头，在 4 号管中加入 5 μL 1pg/μL 的阳性对照(上步稀释所得)，充分震荡 1 分钟，得 100ng/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。		

6. 重复上面的操作直到得到从 100pg/μL 到 1ng/μL 共 6 个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

二、样品 RNA 的制备

7. 如果有 N 个样品，设置 N+2 个提取，多出的一个是 PC（样品制备阳性对照），一个是 NC（样品制备阴性对照）。可以用 10μL 上步所得 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟核酸纯化试剂盒所要求的其实样本体积相同。NC 可以用水替代。本试剂盒跟市场上大多数核酸纯化试剂盒兼容。

三、Probe qRT-PCR 反应 (20μL 体系，在样品制备室进行)

8. 如果做定量分析并且只做 1 次重复，则标记 N+9 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 RT-PCR 阴性对照（用水做模板），6 个用于标准曲线。如果做定性分析并且只做 1 次重复，则标记 N+4 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 RT-PCR 阴性对照（用水做模板），1 个用于 RT-PCR 阳性对照（直接用第 6 步第 4 号管的阳性对照稀释液做模板）。下面只以定量分析为例描述操作步骤。

9. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复。样品管和阴性对照设置完毕后才设置阳性对照，并且阳性对照样品要等所有管子盖上盖子储存好后加）：

成分	样品管 N+2 个	RT-PCR 阴性对照	标准曲线样品管(1-6 管)
探针法 qRT-PCR 缓冲液	各 10μL	10μL	各 10μL
探针法 qRT-PCR 酶混合液 v2	各 1μL	1μL	各 1μL
大肠杆菌 qRT-PCR 引物-探针混合液	各 3μL	3μL	各 3μL
N+2 个待测 RNA 样本	各 7μL	不加	不加
超纯水	不加	7μL	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液(1-6 号)	不加	不加	各 7μL

10. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 RT-PCR：

过程	温度	时间
----	----	----

	逆转录	50℃	15min
	预变性	95℃	10min
	PCR 反应 (45 个循环)	95℃	20sec
		60℃	30sec (采集 FAM 通道的荧光信号, TAMRA 为淬灭基团)
四、数据处理 11. 如果扩增阳性对照(包括标曲样本)或样本制备阳性对照结果为阴性, 则整个扩增或制备实验无效, 不需要分析数据, 需要重做扩增或制备或跟厂家联系。如果 RT-PCR 阴性对照或样本制备阴性对照结果为阳性, 说明环境污染, 则整个扩增或制备实验无效, 不需要分析数据, 需要跟厂家联系。 12. 如果阴性对照和阳性对照正常, 则实验有效, 可以进入后续分析。 13. 对定量检测, 以标曲样本浓度的 log 值为横轴, 分别以阳性标准曲线样本的 Ct 值 (FAM 通道) 为纵轴, 绘制标准曲线, r2 必须大于 0.95。再以待测样品的 Ct 值从标准曲线上推算出 RNA 浓度的 log 值, 再推算出 RNA 的浓度。 14. 对定性检测, 只判断阳性或阴性, 则阴性对照 FAM 通道的 Ct 必须大于或等于 40。阳性对照 FAM 通道的荧光信号必须有对数增长, 有典型扩增曲线, Ct 值应该小于或等于 35。对待测样品, 如果其 FAM 通道的 Ct 大于或等于 40 则为阴性, 如果小于或等于 35 则为阳性。如果其 HEX 通道的 Ct 大于或等于 40 则为阴性, 如果小于或等于 35 则为阳性。如果在 35-40 之间, 则重复一次。重复实验的 Ct 值如果大于或等于 40 则为阴性, 如果小于 40, 则为阳性。			
自备试剂	样品 RNA。		
运输及保存	低温运输, -20℃保存, 有效期 1 年。		