



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

货 号:

TRS0401-100(100T)

TRS0401-020S(20T)



一、试剂盒简介

E.coli 总 RNA 检测试剂盒是一款专为定量检测各种生物制品的中间品、半成品及成品中 E.coli 宿主细胞残留 RNA 而设计的专用试剂盒。

本试剂盒采用了荧光探针技术，将逆转录和荧光探针 qPCR 技术相结合，实现一步法定量检测 E.coli 的总 RNA 残留。检测快速、灵敏度高、特异性强，最低检测限可以达到 fg 水平。试剂盒配套有 E.coli 定量参考品，准确度高。本试剂盒包含有外源性靶标的引物、探针和 RNA 模板，通过外源性靶标检测结果来监测样本提取及试剂配制过程，避免假阴性结果。

二、储存条件及有效期

1. 在避光-20±5℃条件下储存，有效期 12 个月。
2. 泡沫盒/箱加干冰或冰盒运输，开瓶后避光-20±5℃储存。
3. 产品批号、生产日期见外包装盒。

三、试剂盒规格及组分

组分名称	TRS0401-100 (100T)	TRS0401-020S (20T)	保存
E.coli RNA 定量参考品 (10ng/μL)	20μL	20μL	-20±5℃
2×RT-qPCR reaction buffer	1200μL	240μL	-20±5℃
20×Enzyme Mix	120μL	24μL	-20±5℃
IPC RNA mix	150μL	150μL	-20±5℃，避光
E.coli RNA primer&probe mix	400μL	40μL	-20±5℃，避光
RNase-Free H ₂ O	1.5mL×2	1.5 mL	-20±5℃

四、适用机型（包括但不限于）

ABI 7500 Real-Time PCR System

SLAN-96P/S 全自动医用 PCR 分析系统

五、相关设备耗材

一次性无尘手套、1.5ml 无菌低吸附离心管、qPCR 专用无菌无酶八联排管或 96 孔板、1000μL、100μL、10μL 移液器和无菌低吸附带滤芯枪头、荧光定量 PCR 仪、掌式离心机、涡旋混匀仪。

六、检测方法

(一) 参考品与质控品制备（样本处理区）

1. E.coli RNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

用试剂盒内的 RNase-Free H₂O 将 E.coli RNA 定量参考品(10ng/μL)进行稀释，稀释 5 倍作为 ST0 (2ng/μL)，再稀释梯度依次为 200pg/μL、20pg/μL、2pg/μL、200fg/μL、20fg/μL、2 fg/μL，依次命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。具体操作如下：

- (1) 将试剂盒内的 E.coli RNA 定量参考品置于冰上或 2~8℃下融化，待完全融化后充分混匀，瞬时离心，置于冰上备用。
- (2) 取 7 支干净的低吸附离心管，分别标记为 ST0、ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。
- (3) 将试剂盒内的 E.coli RNA 定量参考品瞬时离心，在涡旋混匀仪上振荡 10s 混合均匀后，再次瞬时离心。
- (4) 在 ST0 管中加入 45 μL RNase-Free H₂O，取 E.coli RNA 定量参考品 5 μL 加入到 ST0 管中，混合均匀备用。
- (5) 在 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5 管中分别加入 45μLRNase-Free H₂O，按表 1 进行稀释操作

表 1 E.coli RNA 定量参考品稀释

稀释管	稀释体积	浓度
ST1	5 μL ST0+45μL RNase-Free H ₂ O	200pg/μL
ST2	5 μL ST1+45μL RNase-Free H ₂ O	20pg/μL
ST3	5 μL ST2+45μL RNase-Free H ₂ O	2pg/μL
ST4	5 μL ST3+45μL RNase-Free H ₂ O	200fg/μL
ST5	5 μL ST4+45μL RNase-Free H ₂ O	20fg/μL
ST6	5 μL ST5+45μL RNase-Free H ₂ O	2fg/μL

2. 加样回收质控 ERC 的制备

根据需要设置回收质控 ERC,ERC 中 E.coli RNA 的加样浓度(以制备加 20pg E.coli RNA 量的样本 ERC 为例)，具体操作如下：

- (1) 取 100μL 待测样品加入 1.5mL 低吸附离心管中。
- (2) 再加入 10μL ST3，混匀，标记为样本 ERC。

注：样本 ERC 和同批待测样本一起进行前处理，制备成样本 ERC 纯化液。

3. 阴性质控 NCS 的制备

取 100 μ L RNase-Free H₂O 加入 1.5mL 低吸附离心管中，标记为阴性质控 NCS。

注：阴性质控 NCS 和同批待测样本一起进行前处理，制备成阴性质控 NCS 纯化液。

4. 将提取后的待测样本、ERC、NCS 进行 DNase 处理，消化体系参考下表。

表 2. 样品 DNase 消化体系

组分	单孔体积
10 \times DNase I Buffer	4 μ L
DNase I (5 U/ μ L)	4 μ L
提取后的待测样本/ERC/NCS	4 μ L
RNase inhibitor(可选)	终浓度 0.2-1U/ μ L
Add RNase-Free H ₂ O to	40 μ L

消化条件：37 $^{\circ}$ C，处理 30 min-60 min（消化条件根据实际经验确定）

注意：质粒 DNA 样品建议浓度不要过高，一般质粒样品在反应体系的终浓度 \leq 100ng/ μ L 时，对应 DNaseI 的终浓度为 0.2-2U/ μ L，消化体系中的 DNase 具体用量需要根据实际情况进行优化

（二）qPCR 反应体系配置（试剂准备区）

1. 根据所要检测的定量参考品及待测样品的数量，计算所需反应孔数，一般每个样做 3 个重复孔。

反应孔数=(梯度定量参考品*6+阴性质控 NCS*1+无模板对照 NTC*1+待测样品 +回收质控 ERC) \times 3+2

注：推荐每个待测样品检测时都应同时做该样本 ERC，以测定该样本的回收率；移液器误差需要多计算 2 孔的损失量。

2. qPCR 体系配置：各试剂置于冰上融化，充分融化后混匀，按表 2 配置，加入到每个反应孔中。

表 3 RT-PCR 反应体系

组分	单孔体积
2 \times RT-qPCR reaction buffer	10 μ L
20 \times Enzyme Mix	1 μ L
E.coli RNA primer&probe mix	3 μ L
RNase-Free H ₂ O	1 μ L
样本 RNA (定量参考品/ERC /NCS /NTC /待测样品)	5 μ L

3. IPC 组反应液的制备和加样

如已设置加标样品，则 IPC 组作为可选项执行。

表 4 IPC RT-PCR 反应体系

组分	单孔体积
2×RT-qPCR reaction buffer	10μL
20×Enzyme Mix	1μL
IPC RNA mix	3μL
RNase-Free H ₂ O	1μL
NCS/待测样品 S1/待测样品 S2	5μL

(三) 加样（样本处理区）

1. 在分装好 PCR 反应液的 PCR 反应管中分别加入 10μL 处理好的样本 RNA、ERC、NCS、NTC、梯度定量参考品，表 3 为样品反应板示例。
2. 贴好封板膜，稍做离心。
3. 转移到检测区，放入相应的荧光 PCR 检测仪内，记录样本摆放顺序。

表 5 样品反应版设置示例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ST1	ST1	ST1			S1	S1	S1	S1(ERC)	S1(ERC)	S1(ERC)	
B	ST2	ST2	ST2			S2	S2	S2	S2(ERC)	S2(ERC)	S2(ERC)	
C	ST3	ST3	ST3			S3	S3	S3	S3(ERC)	S3(ERC)	S3(ERC)	
D	ST4	ST4	ST4									
E	ST5	ST5	ST5						IPC-NCS	IPC-NCS	IPC-NCS	
F	ST6	ST6	ST6						IPC-S1	IPC-S1	IPC-S1	
G						NCS	NCS	NCS	IPC-S2	IPC-S2	IPC-S2	
H						NTC	NTC	NTC				

注：该示例中 ST1~ST5 表示检测的 5 个浓度的 E.coli RNA 标准曲线，NCS 为 1 个阴性质控，NTC 为 1 个无模板对照，S1~S3 为待测样本和每个样本的 ERC。每个检测做 3 个重复孔。

(四) PCR 扩增（检测区）

1. RT-qPCR 程序设置

以 ABI7500 为例：

- (1) 新建实验，选择“Absolute Quantification”。
- (2) 输入实验名称，选择标曲定量模式，TaqMan reagents 和 Standard 模式。

- (3) 选择 E.coli 报告荧光基团为 FAM，淬灭基团为 None。
- (4) 选择 IPC（可选）报告荧光基团为 VIC，淬灭基团为 None。
- (5) 参比荧光为 ROX（可选）。
- (6) 荧光 PCR 仪上，按表 4 设置如下程序，反应体积选择 30 μ L，开始运行。

表 6 qPCR 反应程序

阶段	温度	时间	循环数
逆转录	55°C	10min	1
预变性	95°C	1 min	1
循环	95°C	15s	40
	60°C	1min	

注：①各实验室可根据所用机型进行设置反应程序。
②IPC 主要监测试剂的有效性及其抑制剂等影响因素，可根据实验室情况选择是否设置。

（五）结果分析

以 ABI7500，软件版本 2.4 为例：

1. 分析设定：设置阈值(Threshold=0.2)，基线(baseline)为 3~15 循环或仪器默认基线，查看扩增曲线是否正常。
2. 在 Plate 面板将标准曲线孔设置为“S”，并在 Quantity 分别设置稀释梯度为：2000000、200000、20000、2000、200、20，单位为 fg。根据标准曲线计算待测样本浓度单位为 fg/10 μ L，可在检测报告中换算为 pg/ μ L，或 fg/ μ L。
3. 查看标准曲线 R² 与扩增效率是否符合标准。标准曲线判定标准为：R²≥0.98，扩增效率 Eff%：90%~110%。
4. 复孔间 Ct 值偏差≤0.5，相邻的 RNA 标准品之间的 Δ CT 值应在 3.1 至 3.6 的范围内。为确保准确性，可以根据 RNA 标准品的原始 CT 值进行数据过滤。
5. 对于无模板对照 NTC 和阴性质控 NCS 的检测，其 FAM 通道结果应该是未检出（Undermined）或者大于最小标准曲线（如 ST5）的 CT 值+2。
6. 若 Ct (S6) +2>Ct (NTC)，表明体系存在污染，需重新实验。

注：结果分析的参数设置仅供参考，具体需依据实验室机型及使用的软件版本进行设定。

七、注意事项

1. 本试剂盒仅供科研使用，不用于临床诊断，使用前请仔细阅读说明书并必须严格按照说明书进行操作；
2. 应由具备专业经验或经培训合格的人员进行操作；
3. 实验室应按试剂准备区、样本处理区、反应液配置区、扩增检测分析区分隔使用。工作流程：操作过程应工作服、帽、鞋、手套等穿戴齐全，各区物品均为专用，不得交叉使用，避免污染；
4. 反应液分装时应尽量避免产生气泡，并注意防止泄露，以免荧光物质污染仪器；
5. 实验过程中若出现标本及试剂污染工作台及移液器，应及时用 10%次氯酸钠或 75%酒精处理。实验结束后应立即清洁工作台，并定期对工作台及各种实验用品进行消毒；
6. 不要使用超过有效期的试剂，不同批次的产品不能混用；
7. 加样所用的加样器需要定期检测，保证加样的准确性；
8. 为了避免样本中任何潜在的生物危险，检测样本应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤和黏膜；样本的处理建议在可防止气雾外流的生物安全柜中操作，样本制备区用过的试管、吸头需打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃；样本操作和处理均需符合相关法规要求；卫生部《微生物生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。

八、免责声明

试剂盒仅供研究使用，不得用于临床实验或人体实验，否则所产生的一切后果，由实验者承担，本公司概不负责。严格按照说明书操作，实验者违反说明书操作，后果由实验者承担。