

293T 总 RNA 残留检测试剂盒

(RT-PCR 荧光探针法)

说明书

货号：1201202

在实验前请完整阅读本说明书，务必重视注意点！

版本：A/2

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 试剂盒简介

SHENTEK® 293T 总 RNA 残留检测试剂盒 (RT-PCR 荧光探针法) 适用于定量检测生物制品中残留的 293T 细胞总 RNA; 通过设计特异性引物和探针, 将反转录和荧光探针 qPCR 检测技术融合, 实现一步法定量检测总 RNA 残留; 其检测快速, 专一性强, 性能可靠。

该试剂盒仅供研究使用, 不可用于临床。

■ 试剂盒组分

表 1. 试剂盒组分

组分	产品号	装量	储存条件
293T RNA 定量参考品	NNA052	50 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下
One Step qPCR Buffer	NNB008	500 μ L \times 2 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下, 避光
One Step Enzyme MIX	NNC052	100 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下, 避光
293T RNA Primer&Probe MIX	NNC096	400 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下, 避光
RNA IPC Primer&Probe MIX	NNC053	200 μ L \times 1 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下, 避光
RNase-Free H ₂ O	NND008	1.2 mL \times 3 管	-18 $^{\circ}$ C 及以下

■ 规格

100 Reactions。

■ 有效期

规定储存条件下 24 个月, 具体详见试剂盒标签。

■ 适用机型 (包括但不限于)

- SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统
- 7500 Real-Time PCR System
- CFX96 定量 PCR 系统
- Linegene 9600plus 定量 PCR 系统

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 1.5 mL RNase Free 低吸附离心管
- 96 孔 qPCR 板或八联管
- 1000 μ L, 100 μ L, 10 μ L 无菌 RNase Free 低吸附带滤芯枪头

- DNase 及缓冲液

■ 相关设备

- 1000 μL, 100 μL, 10 μL 移液枪

■ 实验操作流程

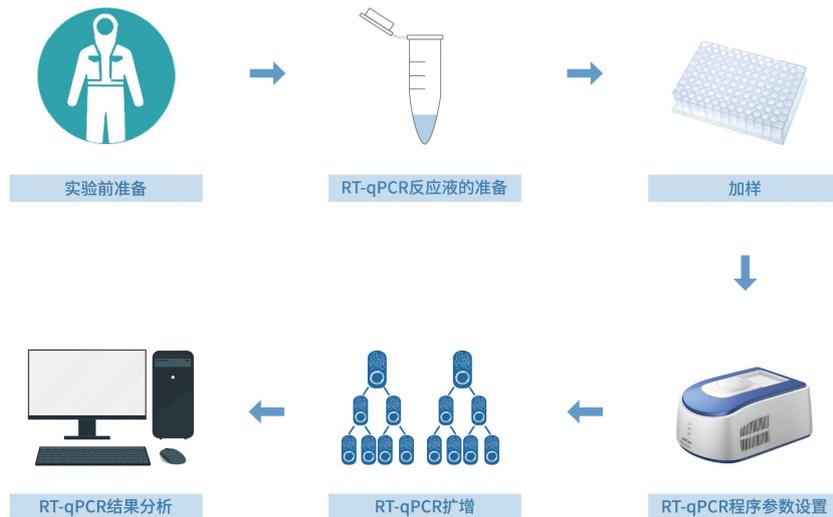


图 1 操作流程示意图

一、试剂、仪器准备

(一) 实验前准备:

1. 穿戴无 DNA 污染的工作服、一次性乳胶手套、一次性无纺布帽子。
2. 工作台面、移液枪及离心管架紫外照射 30 分钟，喷洒 75%酒精并擦干。
3. 将试剂盒从冰箱-18 °C以下区域转移至 **2-8 °C区域或冰上融化**，涡旋振荡混匀并瞬时离心。

(二) qPCR 反应液准备:

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 个阴性质控样品 NCS+待测样品数) ×3

2. MIX 总量计算: 根据反应孔数计算所需 MIX 总量。

$$\text{qRT-PCR MIX} = (\text{反应孔数} + 2) \times 15 \mu\text{L} \text{ (含有 2 孔的损失量)}$$

3. qPCR MIX 配制: 根据表 2 配制表准备各试剂 qPCR MIX 用量。

表 2. qRT-PCR MIX 配制表

组分	单孔用量
One Step qPCR Buffer	10 μL
One Step Enzyme MIX	1 μL
293T RNA Primer&Probe MIX	4 μL
总体积	15 μL

(三) IPC qPCR 反应液准备:

1. 每次实验需做一个阴性质控样品 (IPC-NCS) 和各个待测样品的 IPC (IPC-S) 检测, 根据表 3 及反应孔数配制 IPC qRT-PCR MIX 用量。

表 3. IPC qRT-PCR MIX 配制表

组分	单孔用量
One Step qPCR Buffer	10 μL
One Step Enzyme MIX	1 μL
RNA IPC Primer&Probe MIX	4 μL
总体积	15 μL

二、样品准备

● 293T RNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

293T RNA 定量参考品浓度标注于管壁标签, 请确认后再进行稀释。

用试剂盒中提供的 RNase-Free H₂O 将 293T RNA 定量参考品进行梯度稀释, 具体操作如下:

1. 将试剂盒中的 293T RNA 定量参考品和 RNase-Free H₂O 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 3-5 秒, 如此重复 3 次。
2. 取 7 支干净的 1.5 mL 离心管, 分别标记为 ST, ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5。
3. 在 ST 管用 RNase-Free H₂O 将 293T RNA 定量参考品稀释至 2ng / μL ,

得到 ST, 振荡混匀后短时间快速离心 3-5 秒, 重复 3 次以确保定量参考品与 RNase-Free H₂O 充分混匀。

4. 在 ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5 管中分别加入 45 μ L RNase-Free H₂O。
5. 按表 4 依次进行 6 次稀释操作。

表 4. 293T RNA 定量参考品的稀释

稀释管	稀释体积	浓度
ST0	5 μ L ST + 45 μ L RNase-Free H ₂ O	200 pg/ μ L
ST1	5 μ L ST0 + 45 μ L RNase-Free H ₂ O	20 pg/ μ L
ST2	5 μ L ST1 + 45 μ L RNase-Free H ₂ O	2 pg/ μ L
ST3	5 μ L ST2 + 45 μ L RNase-Free H ₂ O	0.2 pg/ μ L
ST4	5 μ L ST3 + 45 μ L RNase-Free H ₂ O	0.02 pg/ μ L
ST5	5 μ L ST4 + 45 μ L RNase-Free H ₂ O	0.002 pg/ μ L

已融化未使用的 RNase-Free H₂O 可保存于 2-8 °C。

●待测样品的前处理

样品中残留 RNA 的提取纯化可采用 SHENTEK® 宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒 (磁珠法) (货号: SK030203D100), 随行阴性质控样品 (NCS)。待测样品在检测前需要进行 DNase 处理以消除 gDNA 对检测的影响。DNase 用量和消化条件需按实际样品优化, 可咨询湖州申科获取相关建议。

三、操作步骤

(一) 加样

1. 上述各试剂置于冰上, 轻微震荡混匀, 按表 5、6、7 所示加样:

表 5. 各反应孔加样示例

各样品	加样量
标准曲线	15 μ L qRT-PCR MIX + 5 μ L ST1/ST2/ST3/ST4/ST5
NTC	15 μ L qRT-PCR MIX + 5 μ L RNase-Free H ₂ O
NCS	15 μ L qRT-PCR MIX + 5 μ L NCS 纯化液
待测样品	15 μ L qRT-PCR MIX + 5 μ L 待测样品纯化液

表 6. IPC 各反应孔加样示例

各样品	加样量
IPC-NCS	15 μ L IPC qRT-PCR MIX + 5 μ L NCS 纯化液
IPC-S1	15 μ L IPC qRT-PCR MIX + 5 μ L 待测样品 S1 纯化液
IPC-S2	15 μ L IPC qRT-PCR MIX + 5 μ L 待测样品 S2 纯化液
IPC-S3	15 μ L IPC qRT-PCR MIX + 5 μ L 待测样品 S3 纯化液

表 7. 96 孔板排版示例

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

✧ 该示例表示的是检测 5 个浓度梯度的标准曲线 (ST1~ST5)、1 个无模板对照 NTC、1 个阴性质控样品 NCS、3 个待测样品 (S1~S3)。针对阴性质控样品的 IPC (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. 将 96 孔板用光学膜封闭, 轻微震荡混匀, 短时间快速离心 10 秒后放入 qPCR 仪。

(二) qPCR 程序设置

● SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统、软件版本 8.2.2 为例。

1. 点击“实验向导”。
2. “孔板编辑”页面中选择检测荧光基团 FAM 样品反应孔, 选择步骤 2 项目中的“293T 残留 RNA-FAM”程序; 选择检测荧光基团 VIC 样品反应孔, 选择步骤 2 项目中的“293T 残留 RNA-IPC”程序;

3. “实验运行”页面中点击“开始”运行程序。
 - 其他定量 PCR 系统程序设置如下:
 1. 创建空白新程序, 选择绝对定量检测模板。
 2. 创建新检测探针, 命名为 293T 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. 设置反应程序:
 - 50 °C, 15 分钟;**
 - 95 °C 预变性 30 秒;**
 - 95 °C 10 秒, 60 °C 40 秒 (读取荧光), 45 个循环; 反应体积 20 μL。**

四、结果计算与判断

(一) 结果计算 (根据实际填写)

- 以 **SHENTEK-96S 实时荧光 PCR 检测系统**、软件版本 8.2.2 为例:
 1. “孔板编辑”页面中步骤 3: 定义反应孔, 将标准曲线孔的选择样品类型设置为标准品, 并在标品赋值中分别根据表 2 赋值, “293T 残留 RNA-FAM” 分别设为 20、2、0.2、0.02、0.002, 并且在相应的“样品名称”中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5。
 2. 待测样品将样品类型设置为待测样品, NTC 将样品类型设置为无模板对照。
 3. 在“实验分析”页面点击 , 可读取标准曲线的斜率、截距、相关系数、扩增效率。
 4. 在“反应孔信息表中”可读取无模板对照 NTC、阴性质控 NCS、待测样品的检测值, 单位为 pg/μL。
- 以 **7500 Real-Time PCR System**、软件版本 1.4 为例:
 1. 在 Results 的 Amplification Plot 面板中, 将 Threshold 设置为 0.02, 点击 Analyze, 此时可初步查看扩增曲线的形态是否正常。
 2. 在 Results 的 Plate 面板中, 将标准曲线孔的 Task 一栏设置为 Standard, 并且在 Quantity 一栏分别根据表 2 赋值, 设为 20、2、0.2、0.02、0.002 (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. 在 Results 的 Plate 面板中, 将 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC, 将 NCS 孔的 Task 一栏设置为 NCS, 将待测样品孔的 Task 一栏设置为 Unknown, 并且在相应的 Sample Name 一栏中命名为 NTC、NCS、S 之后点击 .
4. 在 Results 的 Standard Curve 面板中, 可读取标准曲线的斜率 (Slope)、截距 (Intercept)、 R^2 。
5. 在 Results 的 Report 面板中, Mean Quantity 一栏可读取 NTC、NCS、待测样品的 293T RNA 的检测值, 单位为 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 。

(二) 结果判断

1. 无模板对照 NTC 的 Ct 均值应大于标准曲线最低浓度点 2 个 Ct 值以上。
 2. NCS 检测结果应大于标准曲线最低浓度点 Ct 值。
 3. 分析 IPC 的 Ct 值, 正常情况下样品的 Ct-IPC 值应该与 NCS 的 Ct-IPC 值一致或 ± 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。如同时测试加标样品, 则优先考虑样品回收率结果, IPC 结果作为参考。
-  上述示例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, 一般也可由仪器自动判读。

修订日期: 2023 年 07 月 05 日

生效日期: 2023 年 07 月 14 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址: 浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话: 0572-2165910