

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

货号：1201201

版本：A/4

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® E.coli 总 RNA 残留检测试剂盒适用于定量检测生物制品中残留的大肠杆菌总 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。

## ■ 试剂盒组分

表 1.试剂盒组分

| 组分                          | 产品号    | 装量                       | 储存条件         |
|-----------------------------|--------|--------------------------|--------------|
| E.coli RNA 定量参考品            | NNA011 | 50 $\mu$ L $\times$ 1 管  | -18°C及以下     |
| One Step qPCR Buffer        | NNB008 | 500 $\mu$ L $\times$ 2 管 | -18°C及以下, 避光 |
| One Step Enzyme MIX         | NNC052 | 100 $\mu$ L $\times$ 1 管 | -18°C及以下, 避光 |
| RNA IPC Primer&Probe MIX    | NNC053 | 200 $\mu$ L $\times$ 1 管 | -18°C及以下, 避光 |
| E.coli RNA Primer&Probe MIX | NNC054 | 400 $\mu$ L $\times$ 1 管 | -18°C及以下, 避光 |
| RNase-Free H <sub>2</sub> O | NND008 | 1.2 mL $\times$ 3 管      | -18°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
- Linegene9600plus 定量 PCR 系统
- Roche LightCycler 480II 定量 PCR 系统

## ■ 实验所需但试剂盒中未含材料

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

- DNase 及缓冲液
- RNase inhibitor（可选）
- SHENTEK® 宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒（磁珠法）（货号：SK030203D100，可选）

## ■ 相关设备

- 迷你离心机
- 漩涡振荡器
- 金属浴或水浴锅
- 荧光定量 PCR 仪
- 1000  $\mu\text{L}$ ，100  $\mu\text{L}$ ，10  $\mu\text{L}$  移液枪

## ■ 操作过程

### ❖ E.coli RNA 定量参考品的稀释和标准曲线的制备

**E.coli 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 H<sub>2</sub>O 将 E.coli 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 E.coli RNA 定量参考品和 RNase-Free H<sub>2</sub>O 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 3~5s，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 管中用 RNase-Free H<sub>2</sub>O 将 E.coli RNA 定量参考品稀释至 2 ng/ $\mu\text{L}$ ，得到 ST，振荡混匀后短时间快速离心 3~5 s，重复 3 次以确保定量参考品与 RNase-Free H<sub>2</sub>O 充分混匀。
4. 在 ST0, ST1, ST2, ST3, ST4, ST5 管中分别加入 45  $\mu\text{L}$  RNase-Free H<sub>2</sub>O。
5. 按表 2 依次进行 6 次稀释操作。

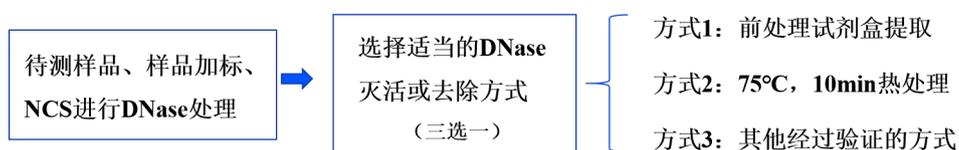
表 2. E.coli RNA 定量参考品的稀释

| 稀释管   | 稀释体积   | 浓度 (pg / $\mu$ L) |
|---|--|-------------------|
| ST  | 用适量 RNase-Free H <sub>2</sub> O 稀释                     | 2000              |
| ST0   | 5 $\mu$ L ST + 45 $\mu$ L RNase-Free H <sub>2</sub> O  | 200               |
| ST1   | 5 $\mu$ L ST0 + 45 $\mu$ L RNase-Free H <sub>2</sub> O | 20                |
| ST2   | 5 $\mu$ L ST1 + 45 $\mu$ L RNase-Free H <sub>2</sub> O | 2                 |
| ST3   | 5 $\mu$ L ST2 + 45 $\mu$ L RNase-Free H <sub>2</sub> O | 0.2               |
| ST4   | 5 $\mu$ L ST3 + 45 $\mu$ L RNase-Free H <sub>2</sub> O | 0.02              |
| ST5   | 5 $\mu$ L ST4 + 45 $\mu$ L RNase-Free H <sub>2</sub> O | 0.002             |
| 已融化未使用的 RNase-Free H <sub>2</sub> O 可保存于 2-8°C, 若长时间不用, 请放置于 -18°C 及以下。 |  |                   |
| 标准曲线浓度点可根据实际验证结果选择, 应至少有 5 个浓度点。  |  |                   |

#### ❖ 待测样品的准备和处理

根据待测样品的类型不同, 将样品的准备和处理分为以下两种情况:

#### ➤ 情况 1: 使用 E.coli 宿主菌进行扩增的质粒 DNA 类样品



1. 将待测样品、样品加标、NCS 进行 DNase 处理, 以消除 gDNA 对检测的影响。

消化体系可参考下表, 具体以实际经验为准:

表 3. 样品 DNase 消化体系

| 试剂组分                                | 单次配制量                             |             |                                  |                        |
|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------|----------------------------------|------------------------|
|                                     | NCS <sup>(2)</sup> ( $\mu$ L) 二选一 |             | 样品 ( $\mu$ L)<br>S               | 样品+标 ( $\mu$ L)<br>ERC |
|                                     | RNase-Free H <sub>2</sub> O       | 样品基质溶液      |                                  |                        |
| 10×DNase I Buffer                   | 4                                 | 4           | 4                                | 2                      |
| DNase I (5 U/ $\mu$ L)              | 4                                 | 4           | 4 <sup>(3)</sup>                 | 2                      |
| 样品或样品基质                             | 0                                 | 4<br>(样品基质) | 4 <sup>(3)</sup><br>(样品 1 mg/mL) | 2                      |
| 标 (E.coli RNA 定量参考品)                | 0                                 | 0           | 0                                | 5 <sup>(1)</sup>       |
| RNase inhibitor <sup>(5)</sup> (可选) | 终浓度 0.2-1U/ $\mu$ L               |             |                                  |                        |
| Add RNase-Free H <sub>2</sub> O to  | 40 <sup>(4)</sup>                 |             |                                  | 20                     |

消化条件：37°C， 处理 30 min-60 min （消化条件根据实际经验确定）

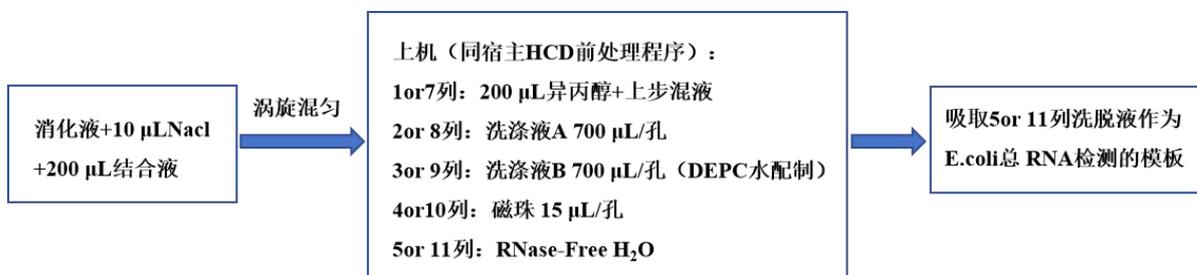
- (1) 加标量需根据实际情况进行调整，一般建议样品加标量设置为样品 E.coli RNA 实际残留量的 2-10 倍。若样品 E.coli RNA 实际残留量低于本试剂盒的定量限，加标量应设置到定量限范围之内，以保证检测结果的准确性。
- (2) NCS 根据实际经验确定（样品基质溶液或 RNase-Free H<sub>2</sub>O）
- (3) 质粒 DNA 样品建议浓度不要过高，一般质粒样品在反应体系的终浓度 ≤ 100 ng/μL 时，对应 DNase I 的终浓度为 0.2-2 U/μL，消化体系中的 DNase 具体用量需要根据实际情况进行优化，具体优化方案可咨询湖州申科获取相关建议；
- (4) NCS 和样品的消化体积取决于是否对 IPC 进行检测：
  - 若 NCS 和样品需要对 IPC 进行检测，则单次配制总体积为 40 μL；
  - 若不进行 IPC 检测，则单次配制总体积为 20 μL；
- (5) 消化体系中加入 RNase inhibitor 可排除样品、管材、环境等引入的 RNase 的影响，可根据实际经验选择是否加入。

## 2. 选择适当的 DNase 灭活或去除方式（三选一）：

(1) 方式 1：使用 SHENTEK® 宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒（磁珠法）对待测样品、样品加标、NCS 的消化液进行 DNase 灭活。该灭活方式可实现对样品基质和消化反应液的纯化，排除基质效应。

🧪 样品前处理时要用 RNase-Free H<sub>2</sub>O 进行洗脱，洗涤液 B 用 DEPC 水配制。

🧪 因质粒 DNA 类样品基质较为简单，故可用以下流程进行 E.coli RNA 机取（手工提取流程可咨询湖州申科获取）：



(2) 方式 2：75°C，10min 加热灭活。

(3) 方式 3：其他经过验证的 DNase 灭活或去除方式。

## ► 情况 2: 使用 E.coli 宿主菌进行蛋白等表达产物制备的样品



### 1. 样品准备

(1) 待测样品: 取 100  $\mu\text{L}$  待测样品加入 1.5 mL 干净的离心管中, 标记为 S。

(2) 设置样品加标, 与待测样品进行同步处理, 作为回收率考察, 根据需要设置样品加标中 E.coli RNA 标准品浓度 (以制备 2 pg E.coli RNA 量的 ERC 为例):

取 100  $\mu\text{L}$  待测样品加入 1.5 mL 干净的离心管中, 再加入 10  $\mu\text{L}$  ST3, 充分混匀标记为 ERC。

 一般建议样品加标量设置为样品 E.coli RNA 实际残留量的 2-10 倍。若样品 E.coli RNA 实际残留量低于本试剂盒的定量限, 加标量应设置到定量限范围之内, 以保证检测结果的准确性。

(3) 设置阴性质控 NCS, 与待测样品进行同步处理, 以保证检测结果的准确性:

取 100  $\mu\text{L}$  样品基质溶液或 RNase-Free  $\text{H}_2\text{O}$  (根据实际经验确定) 加入 1.5 mL 干净的离心管中标记为 NCS。

### 2. 样品处理

(1) 使用 SHENTEK® 宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒 (磁珠法) 对待测样品、样品加标、NCS 进行提取。

 样品最后用 RNase-Free  $\text{H}_2\text{O}$  进行洗脱, 洗涤液 B 用 DEPC 水配制。

(2) 将待测样品、样品加标及 NCS 纯化液进行 DNase 处理, 以消除 gDNA 对检测的影响。

 DNase 用量和消化条件可参考表 3 (具体以实际经验为准)。

(3) 75°C, 10min 加热灭活 DNase。

### ❖ qRT-PCR 反应液的制备

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  
NCS + 待测样品数)  $\times$  3

2. 根据反应孔数计算本次所需的 qRT-PCR MIX 总量 (含有 2 孔的损失量):

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

3. 各试剂置于冰上或 2-8°C 条件下融化, 轻微振荡混匀, 按表 4 所示加样:

表 4. qRT-PCR MIX 配制表

| 组分                          | 单孔反应             |
|-----------------------------|------------------|
| One Step qPCR Buffer        | 10 $\mu\text{L}$ |
| One Step Enzyme MIX         | 1 $\mu\text{L}$  |
| E.coli RNA Primer&Probe MIX | 4 $\mu\text{L}$  |
| 总体积                         | 15 $\mu\text{L}$ |

#### ❖ 加样

1. 上述各试剂置于冰上, 轻微震荡混匀, 按表 5 所示加样:

表 5. 各反应孔加样示例

|      |  |
|------|--|
| 标准曲线 | 15 $\mu\text{L}$ qRT-PCR MIX + 5 $\mu\text{L}$ ST1/ST2/ST3/ST4/ST5         |
| NCS  | 15 $\mu\text{L}$ qRT-PCR MIX + 5 $\mu\text{L}$ NCS 纯化液                     |
| NTC  | 15 $\mu\text{L}$ qRT-PCR MIX + 5 $\mu\text{L}$ RNase-Free H <sub>2</sub> O |
| 待测样品 | 15 $\mu\text{L}$ qRT-PCR MIX + 5 $\mu\text{L}$ 待测样品                        |

加样完成后每孔总体积为 20  $\mu\text{L}$ 。

#### ❖ IPC 组配制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。

1. 当选择做 IPC 组时, 每次实验需做一个阴性质控 (IPC-NCS) 和各个待测样品的 IPC (IPC-S) 检测, 根据表 6 和表 7 配制。

表 6. IPC qRT-PCR MIX 配制表

| 组分                       | 单孔反应             |
|--------------------------|------------------|
| One Step qPCR Buffer     | 10 $\mu\text{L}$ |
| One Step Enzyme MIX      | 1 $\mu\text{L}$  |
| RNA IPC Primer&Probe MIX | 4 $\mu\text{L}$  |
| 总体积                      | 15 $\mu\text{L}$ |

表 7. IPC 各反应孔加样示例

|         |                                      |
|---------|--------------------------------------|
| IPC-NCS | 15 μL IPC qRT-PCR MIX + 5 μL NCS     |
| IPC-S1  | 15 μL IPC qRT-PCR MIX + 5 μL 待测样品 S1 |
| IPC-S2  | 15 μL IPC qRT-PCR MIX + 5 μL 待测样品 S2 |

加样完成后每孔总体积为 20 μL。

表 8. 96 孔板排版示例

|     |     |     |   |         |         |         |   |   |        |        |        |   |
|-----|-----|-----|---|---------|---------|---------|---|---|--------|--------|--------|---|
| ST1 | ST1 | ST1 |   |         |         |         |   |   | S1     | S1     | S1     | A |
| ST2 | ST2 | ST2 |   | IPC-NCS | IPC-NCS | IPC-NCS |   |   | S2     | S2     | S2     | B |
| ST3 | ST3 | ST3 |   | IPC-S1  | IPC-S1  | IPC-S1  |   |   | S3     | S3     | S3     | C |
| ST4 | ST4 | ST4 |   | IPC-S2  | IPC-S2  | IPC-S2  |   |   |        |        |        | D |
| ST5 | ST5 | ST5 |   |         |         |         |   |   | S1-ERC | S1-ERC | S1-ERC | E |
|     |     |     |   |         |         |         |   |   | S2-ERC | S2-ERC | S2-ERC | F |
| NTC | NTC | NTC |   |         |         |         |   |   | S3-ERC | S3-ERC | S3-ERC | G |
| NCS | NCS | NCS |   |         |         |         |   |   |        |        |        | 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 NCS、3 个待测样品 (S1~S3)、3 个样品加标 (S1-ERC~S3-ERC)。针对 IPC 的阴性质控 (IPC-NCS) 和待测样品的 IPC (IPC-S1, IPC-S2)。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 8 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 s 后放入 qPCR 仪。

❖ 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“E.coli 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“E.coli 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 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 (可选)。

3. 设置反应程序: **50°C, 15 min;**

**95°C 预变性 30 s;**

**95°C 10 s, 60°C 40 s (读取荧光), 45 个循环;**

反应体积 20  $\mu$ L。

#### ❖ qPCR 结果分析

✧ 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, “E.coli 残留 RNA-FAM”分别设为 20、2、0.2、0.02、0.002, 并且在相应的“样本名称”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  $\text{pg}/\mu\text{L}$ 。

✧ 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  $\text{pg}/\mu\text{L}$ ), 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, 将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC, 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、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 一栏可读取无模板对照 NTC、待测样品的大肠杆菌 RNA 的检测值, 单位为  $\text{pg}/\mu\text{L}$ 。

 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。

6. 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。

7. 样品加标回收率的合格范围为 50%-150%。

8. 当选择做 IPC 组时, 样品的 Ct-IPC 值与 NCS 的 Ct-IPC 值相比明显不一致 (如, 超出  $\pm 1$  个循环), 则表明样品可能存在干扰。请优先考虑加标回收率的结果, IPC 的测试结果作为参考。

修订日期: 2023 年 12 月 18 日

生效日期: 2024 年 01 月 02 日

## 服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

[www.shenkebio.com](http://www.shenkebio.com)

地址: 浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: [Info@shenkebio.com](mailto:Info@shenkebio.com)

电话: 400-878-2189