

### 【产品名称】

HEK293 总 RNA 残留检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

### 【货号】

BP-QN92-100

### 【包装规格】

100 Reactions/盒

### 【预期用途】

本试剂盒是用于定量检测各种生物制品的中间品、半成品和成品中残留的 HEK293 总 RNA 的专用试剂盒。

### 【产品简介】

本试剂盒采用 PCR 荧光探针法，针对 HEK293 基因组的保守序列，设计引物探针，能够定量检测样本中 HEK293 总 RNA。试剂盒含有外源性内标，内标可以与样本一起参与提取扩增，用于监控提取与扩增是否异常，防止假阴性的产生。本试剂盒含有 UDG 酶，用于预防扩增产物的污染。

本试剂盒与珠海横琴宝锐核酸提取或纯化试剂盒 II（磁珠法）、DNA 去除试剂盒配套使用。

### 【主要成分与含量】

试剂盒组分	规格 (100Reactions/盒)
HEK293 RNA qPCR MIX1	0.9mL×2 管
HEK293 RNA qPCR MIX2	0.2mL×1 管
HEK293 RNA 内标*	1.0mL×1 管
HEK293 RNA 阴性对照	1.0mL×2 管
HEK293 RNA 校准品 ST1	0.5mL×1 管 (2fg/μL)
HEK293 RNA 校准品 ST2	0.5mL×1 管 (20fg/μL)
HEK293 RNA 校准品 ST3	0.5mL×1 管 (200fg/μL)
HEK293 RNA 校准品 ST4	0.5mL×1 管 (2pg/μL)
HEK293 RNA 校准品 ST5	0.5mL×1 管 (20pg/μL)
HEK293 RNA 校准品 ST6	0.5mL×1 管 (200pg/μL)

说明：

不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

实验操作中需要但试剂盒中未提供的试剂：核酸提取或纯化试剂盒、DNA 去除试剂盒。

\*若不使用试剂盒内标功能，提取时无需添加内标，程序设置时不设置 CY5 通道，结果分析时无需关注 CY5 结果。

\*若样品提取时未添加内标，扩增时加内标，则配制 MIX 时每反应液加 1μL 内标，分装 qPCR MIX 时分装 21μL/反应，此时 PCR 总反应体积为 31μL/反应。

### 【储存条件及有效期】

1、置于≤-18°C下避光保存，有效期 24 个月。

2、避免反复冻融，反复冻融次数不超过 7 次。

3、产品有效期及失效日期见标签。

### 【适用机型】

包括但不限于以下机型：SLAN-96P、SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统；ABI7500、ABI QuantStudio™ 5 实时荧光定量 PCR 仪；Roche LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪；伯乐 CFX96 定量 PCR 仪。

## 【待测样本的前处理】

待测样本在使用 HEK293 总 RNA 残留试剂盒做 qPCR 检测前，需要进行 DNA 去除试剂盒处理，以消除 gDNA 对 qPCR 检测的影响。

## 【检验方法】

从试剂盒中取出 HEK293 RNA qPCR MIX1、HEK293 RNA qPCR MIX2、HEK293 RNA 内标、HEK293 RNA 阴性对照、HEK293 RNA 校准品 ST1-ST6，置于室温融化，充分振荡混匀后瞬时离心备用。

### 1. 加样回收质控 ERC 制备

根据需要设置 ERC 中的 HEK293 RNA 加样浓度（以制备加 2pg HEK293 RNA 量的 ERC 为例），具体操作如下：

1) 取 100 $\mu$ L 待测样本加入 1.5mL 干净的离心管中；

2) 加入 10 $\mu$ L ST3 后混匀瞬时离心，标记为样本 ERC。样本 ERC 和同批待测样本一起进行前处理，得到的核酸即为样本 ERC 核酸。

\*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 HEK293 RNA 实际残留量的 2-10 倍。若样品 HEK293 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. 阴性质控 NCS 制备

1) 取 100 $\mu$ L HEK293 RNA 阴性对照加入 1.5mL 干净的离心管中，标记为 NCS；

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

### 3. 反应液准备

3.1 根据待测标本数，计算所需的 PCR 反应液数，一般建议做 3 个重复/样。

PCR 反应液数= (6 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+待测样本+待测样本 ERC)  $\times$  3。

3.2 根据反应孔数计算本次所需的 qPCR MIX 预混液总量（含有 2 孔的损失量）：

qPCR MIX 预混液= (反应孔数+2)  $\times$  20  $\mu$ L

3.3 各试剂置于室温融化，轻微振荡混匀，按下表所示加样：

组分	单孔反应
HEK293 RNA qPCR MIX1	18 $\mu$ L
HEK293 RNA qPCR MIX2	2 $\mu$ L
总体积	20 $\mu$ L

3.4 各反应孔加样示例：

组分	加样量
标准曲线	20 $\mu$ L HEK293 RNA qPCR MIX 预混液+10 $\mu$ L ST1/ST2/ST3/ST4/ST5/ST6
NTC	20 $\mu$ L HEK293 RNA qPCR MIX 预混液+10 $\mu$ L 阴性对照
NCS	20 $\mu$ L HEK293 RNA qPCR MIX 预混液+10 $\mu$ L NCS 纯化液
待测样本	20 $\mu$ L HEK293 RNA qPCR MIX 预混液+10 $\mu$ L 待测样本纯化液
样本 ERC	20 $\mu$ L HEK293 RNA qPCR MIX 预混液+10 $\mu$ L 样本 ERC 纯化液

### 4. 样本核酸提取

操作步骤参照核酸提取或纯化试剂盒说明书，样本量为 100 $\mu$ L，内标添加量为 10 $\mu$ L。

### 5. 荧光 PCR 反应

5.1 按照 3.4 的方法将核酸加入到 20 $\mu$ L HEK293 RNA qPCR MIX 预混液中，盖好反应管盖或者用光学膜封闭 96 孔 PCR 板，混匀后瞬时离心，转移到荧光 PCR 仪器上。

5.2 在荧光 PCR 仪上运行以下程序：

步骤	条件	循环数
UDG 处理	25°C: 5 分钟	1
逆转录	50°C: 15 分钟	1
预变性	95°C: 3 分钟	1
PCR 扩增	95°C: 10 秒, 60°C (采集荧光) : 30 秒	40
冷却	25°C*: 10S	1

荧光通道选择 FAM、CY5，其中 FAM 为 HEK293 RNA，CY5 为 HEK293 RNA 内标。若仪器为 ABI 系列，参比荧光选择 ROX。

\*若荧光 PCR 仪温度无法设置 25°C，可将冷却步骤温度设置为 37°C。

## 6. 结果判定

### 6.1 阈值线设定

阈值线依据仪器噪声情况进行调整，取第 3 到 15 次循环的荧光强度均值加 10 倍标准差，或采用阴性对照荧光值的最高点作为荧光阈值，或将阈值线设置到超过本底信号波动位置。

### 6.2 内标的判读

- 1) 对于阴性样本和 NCS 结果，内标 Ct 值应  $\leq 35$ ；
- 2) 对于阳性结果，可能会因为竞争抑制，导致阳性结果内标不出值或出值较差。

### 6.3 试验成立条件

- 1) NTC 的 CT 均值大于校准品最低浓度 CT 均值；
- 2) 标准曲线线性相关性  $R^2 \geq 0.98$ ，标准曲线最低点 CT 值不高于 39；
- 3) 每组加标样本的回收率应在 50%-150% 之间， $RSD \leq 30\%$ 。

## 7. 结果分析

### 7.1 以 SLAN-96P 为例：

- 1) 若需要调整阈值线，在“实验分析”面板的“参数设置”中，将阈值设置到合适高度；
- 2) 在“孔板编辑”面板中，将校准品的“样本类型”一栏设置为标准品，并且在“属性”一栏分别赋值为 0.002、0.02、0.2、2、20、200（含义为每孔加入的 RNA 浓度，单位为 pg/ $\mu$ L），并且在相应的“样本名称”一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6；
- 3) 在“实验分析”的“标准曲线”面板中，可读取标准曲线的斜率、截距、相关系数、扩增效率；
- 4) 在“实验分析”的“反应孔信息表”面板中，“浓度”一栏可读取检测结果的浓度值，单位为 pg/ $\mu$ L。后续可在检测报告中依据用户需要将单位换算为 fg/ $\mu$ L 或 pg/mL。根据待测样本和样本 ERC 的检测结果计算加样回收率，加样回收率要求在 50%-150% 之间。

### 7.2 以 ABI 公司 7500 qPCR 仪、软件版本 2.4 为例：

- 1) 若需要调整阈值线，在 Analysis 的 Amplification Plot 面板中，将 FAM 通道、CY5 通道 Threshold 设置到合适高度，点击 Analyze；
- 2) 在 Setup 的 Plate Setup 面板中，将标准曲线孔的 Task 一栏设置为 Standard，并且在 Quantity 一栏分别赋值为 0.002、0.02、0.2、2、20、200（含义为每孔加入的 RNA 浓度，单位为 pg/ $\mu$ L），并且在相应的 Sample 一栏中命名为 ST1、ST2、ST3、ST4、ST5、ST6。将无模板对照 NTC 孔的 Task 一栏设置为 NTC，将阴性质控 NCS 孔、待测样本孔、样本 ERC 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、ERC；

- 3) 在 Analysis 的 Standard Curve 面板中，可读取标准曲线的 Slope、Y-Inter、R<sup>2</sup> 等；
- 4) 在 Analysis 的 View Well Table 面板中，Quantity 一栏可读取检测结果的浓度值，单位为 pg/μL。后续可在检测报告中依据用户需要将单位换算为 fg/μL 或 pg/mL。根据待测样本和样本 ERC 的检测结果计算加样回收率，加样回收率要求在 50%-150% 之间。

#### 【注意事项】

- 1、试剂盒应在-18°C及以下保存。
- 2、实验前请仔细阅读本试剂盒说明书，严格按照操作步骤执行，在操作过程中对时间、试剂体积等精确控制可以获得最好的结果。
- 3、核酸提取有关耗材确保洁净、无 DNase/RNase、无人源核酸残留及相关产物，提取过程尽量快速，完成后进入下一步实验或冷冻保存。
- 4、不要使用过期组分或者不同批次组分混合使用。
- 5、冻存试剂使用前应于室温下完全融化，瞬时离心使液体完全沉于管底。避免反复冻融，以免影响试剂性能。
- 6、要带新的一次性 PE 手套对反应管封盖，避免徒手或使用过的手套接触反应管，检测过程中使用 j 不带荧光物质一次性无粉乳胶手套。
- 7、实验室应严格按照有关规定分区管理，依照配液区→模板提取区→扩增区→分析区顺序进行基因检测。各区间人员、器材、试剂及空气流向应有严格要求。
- 8、样品、校准品等在使用后及时封盖，避免组分间及气溶胶等的污染造成假阳性。
- 9、扩增产物禁止开盖，实验产生的废弃物应及时收集，远离 PCR 实验室进行无害化处理。
- 10、如果样本中靶标为强阳性时，由于体系的竞争抑制，可能会对内标检测造成影响。
- 11、建议使用各仪器新版本的软件进行实验及数据分析。

#### 【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。

#### 【公司信息】

邮箱：marketing@biori.com.cn

网址：www.biori.com

