

## 通用型总 RNA 提取试剂盒质检报告单

XJ-QR-016

请检编号	20230310	请检日期	2023.03.06	请检人	李春
生产日期	2023.03.06	抽检比例	1/1000	产品序号	5010050
产品批号	20230310	产品名称	通用型总 RNA 提取试剂盒(50 次制备)		

填写说明：

内容须用数字填写；如果无法用数据填写，则打“√”表示产品符合要求，打“×”表示产品不符合要求，如果不符合要求，在备注中注明不符合项的详细内容。

样品 要求 (指标)	检验 1	检验 2	对照 1	对照 2
DNA OD <sub>260</sub>	6.387	6.971	6.768	6.831
DNA OD <sub>280</sub>	3.233	3.534	3.423	3.459
DNA OD <sub>230</sub>	2.947	3.291	3.257	3.182
OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	2.17	2.12	2.08	2.15
OD <sub>260</sub> /OD <sub>230</sub>	1.98	1.97	1.98	1.97
RNA 浓度 (ng/μl)	255.4611	278.8585	270.7038	273.2472
试剂盒外观 与组成	√	√	√	√
RT-PCR 检测	√	√	√	√
电泳检测	√	√	√	√

备注

1. 本批次共生产 22 盒，随机抽取一盒送检。
2. RNA 用 100 μl RNase-free water 洗脱。

检验结果



合格  
质检员：蔡国春

审核意见



## 通用型总 RNA 提取试剂盒检验方法

### 一、目的

通过对枯草杆菌总 RNA 的分离纯化，以及对获得的 RNA 的各项指标的测试，判断送检的产品是否符合质量要求。

### 二、材料、试剂及仪器

1. 材料：枯草杆菌培养物、溶菌酶、送检通用型总 RNA 提取试剂盒、对照其他批次的试剂盒、1.5 ml 离心管若干。
2. 仪器：超微量分光光度计、电泳仪、电泳槽、移液器、台式离心机、水浴锅。

### 三、RNA 纯化操作步骤

送检组和对照组每管用离心机 12000 rpm、30 秒收菌 1 ml，加入 50  $\mu$ l RNase-free 水涡旋至无菌块，加入 50  $\mu$ l 16 mg/ml 的溶菌酶，涡旋混匀后置于水浴锅/恒温烘干箱中 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟。按照说明书中的操作步骤，用送检试剂盒和对照试剂盒同步平行各自抽提 3 管 RNA。最终 RNA 用 100  $\mu$ l RNase-free water 洗脱。

### 四、纯化的基因组 RNA 的纯度检测步骤

在超微量分光光度计上用 RNase-free Water 调零，取 2  $\mu$ l 洗脱的 RNA 检测，记录各个波长的吸光度。

(各抽取两管平行记录并进行下列操作)

### 五、RT-PCR 检测步骤

1. 每管各取 4  $\mu$ l 纯化的 RNA 按 Simgen cDNA 第一链合成试剂盒说明书操作获得 cDNA，用 RNase-free Water 稀释 2.5 倍。
2. 取一个 0.6 ml 离心管，加入 85.4  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O、140  $\mu$ l 的 2 $\times$ SYBR Green PCR Mix、14  $\mu$ l 枯草杆菌引物（正向、反向引物各 7  $\mu$ l）和 5.6  $\mu$ l 50 $\times$ ROX Reference Dye，混合均匀。
3. 按每管 35  $\mu$ l 的体积将步骤 2 的混合物分装到八联管中，依次加入 5  $\mu$ l DNA 模板、ddH<sub>2</sub>O（阴性对照）、阳性对照，盖上管盖。然后放置于 ABI PRISM $\text{\textcircled{R}}$ 7500 荧光 PCR 仪中进行荧光定量 PCR。
4. 扩增条件：Stage 1: 预变性(Reps: 1)95 $^{\circ}$ C 1min; Stage 2: PCR 反应(Reps: 40) 95 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 33s; Dissociation stage(Reps: 1) 95 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 20s, 95 $^{\circ}$ C 15s。
5. 扩增完成后，观察标准曲线并记录各曲线的 CT 值。

### 六、电泳检测操作步骤

在 1% 琼脂糖凝胶上，按下表依次加入细菌总 RNA，电泳结束后在紫外灯下观察并记录分析结果。

	DL2000 Marker	检验 1	检验 2	对照 1	对照 2
RNA	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
6 $\times$ Loading Buffer	--	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l

### 五、质量要求与判断方法：

1. 试剂盒外观必须无破损、污渍；试剂盒组成必须与说明书对应一致；试剂盒标签内容必须与送检单相符。
2. 送检试剂盒纯化得到的 RNA OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 数值必须在 2.0 $\pm$ 0.15 范围内。
3. 送检试剂盒纯化得到的 RNA OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> 数值必须 $\geq$ 1.5。
4. 送检试剂盒纯化得到的 RNA 电泳检测，无肉眼可见的 DNA 污染，主条带清晰。
5. 用送检试剂盒纯化得到的 RNA 反转录的 cDNA 作为模板的 RT-PCR 扩增曲线正常，阴性对照无扩增。
6. 送检试剂盒与对照试剂盒测得的各项指标的差异必须小于 $\pm$ 10%。

以上任何一项不符合要求即判断为不合格产品。

注意：以上实验操作均需在 RNA 室操作。