

Buffer EX 质检报告单

请检编号	20230806	请检日期	2023.08.08	请检人	李春
生产日期	2023.08.08	抽检比例	1/1000	产品序号	9025011
产品批号	20230806	产品名称	Buffer EX		
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	检验 1	检验 2	对照 1	对照 2	
要求 (指标)					
RNA OD ₂₆₀	6.893	6.930	6.353	6.902	
RNA OD ₂₈₀	3.467	3.483	3.197	3.470	
RNA OD ₂₃₀	3.345	3.346	3.069	3.361	
OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	2.06	2.07	2.07	2.05	
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	1.99	1.99	1.99	1.99	
RNA 浓度 (ng/μl)	275.7356	277.1999	254.1064	276.0899	
试剂盒外观 与组成	√	√	√	√	
PCR 检测	√	√	√	√	
电泳检测	√	√	√	√	
备注	1. 本批次共生产 98 盒，随机抽取一盒送检 2. 终 RNA 用 100 μl RNase-Free Water 洗脱				
检验结果	  <p style="text-align: right;">合格 质检员：蔡恩奇</p>				
审核意见					

Buffer EX 检验方法

一、目的

通过枯草杆菌总 RNA 提取对检测样本的分离纯化，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：送检超 Buffer EX、对照其他批次的 Buffer EX、超纯总 RNA 试剂盒、cDNA 第一链合成试剂盒、1.5 ml 离心管若干 (RNase Free)，新鲜培养的枯草杆菌、枯草杆菌特异性引物。
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、恒温箱。

三、RNA 纯化操作步骤

挑取枯草杆菌单菌落至 50 ml LB 培养基中 37℃ 过夜培养，按每管 2 ml 菌液收集到 1.5 ml 离心管 (RNase Free) 中，共 3 管。每管加 100 μ l RNase-Free Water 悬浮沉淀，并加入 100 μ l RNase-Free Water 溶解的溶菌酶 (100 mg/ml)，混合均匀，37℃ 温育 15 min。用移液器将三管液体吹打混合均匀并合成一管，按每管 100 μ l 的量分出 4 管。按照超纯说明书中的操作步骤，用送检产品和对照产品同步平行各自抽提 2 管细菌中的 RNA。最终 RNA 用 100 μ l RNase-Free Water 洗脱。

四、纯化的 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 μ l 洗脱的 RNA 检测，记录各个波长的吸光度。

五、RT-PCR 检测步骤

1. 每管各取 4 μ 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 μ l ddH₂O、140 μ l 的 2 \times SYBR Green PCR Mix、14 μ l 枯草杆菌引物 (正向、反向引物各 7 μ l) 和 5.6 μ l 50 \times ROX Reference Dye，混合均匀。
3. 按每管 35 μ l 的体积将步骤 2 的混合物分装到八联管中，依次加入 5 μ l cDNA 模板、ddH₂O (阴性对照)、阳性对照，盖上管盖。然后放置于 ABI PRISM@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℃ 1min; Stage 2: PCR 反应(Reps: 40)95℃ 5s, 60℃ 33s; Dissociation stage(Reps: 1)95℃ 15s, 60℃ 20s, 95℃ 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 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
6 \times Loading Buffer	--	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l

七、质量要求与判断方法:

1. 产品外观必须无破损、污渍；产品组成必须与说明书对应一致；产品标签内容必须与送检单相符。
2. 送检 Buffer EX 纯化得到的 RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 数值必须在 2.0 \pm 0.15 范围内。
3. 送检 Buffer EX 纯化得到的 RNA OD₂₆₀/OD₂₃₀ 数值必须 \geq 1.5。
4. 送检 Buffer EX 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 Buffer EX 纯化得到 RNA 反转录成的 cDNA 作为模板的 RT-PCR 扩增曲线正常。
6. 送检 Buffer EX 与对照 Buffer EX 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：以上实验操作中提取步骤需在 RNA 室操作。