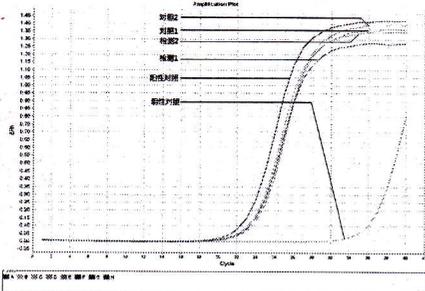


### Trizol 试剂质检报告单

请检编号	20210923	请检日期	2021.09.24	请检人	李春
生产日期	2021.09.24	抽检比例	1/1000	产品序号	5301100
产品批号	20210923	产品名称	Trizol 试剂		
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 <sub>260</sub>	2.692	2.628	2.891	2.627	
RNA OD <sub>280</sub>	1.353	1.318	1.463	1.329	
RNA OD <sub>230</sub>	1.763	2.360	1.837	1.442	
OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	1.99	1.99	1.98	1.98	
OD <sub>260</sub> /OD <sub>230</sub>	1.53	1.52	1.57	1.82	
RNA 浓度 (ng/μl)	107.6723	105.1243	115.6205	105.0887	
试剂外观	√	√	√	√	
电泳检测	√	√	√	√	
PCR 检测	√	√	√	√	
备注	1. 本批次共生产 75 盒，随机抽取一盒送检。 2. RNA 用 100 μl RNase-Free Water 洗脱。				
检验结果	  <p style="text-align: right;">合格 质检员：计亚刚</p>				
审核意见	<p style="text-align: center;">                       质检专用章                      审核人：郝博雅                 </p>				

## Trizol 试剂检验方法

### 一、 目的

通过 Trizol 试剂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 Trizol 试剂、对照其他批次的试剂、1.5 ml 离心管若干 (RNase Free)，新鲜培养的细菌。
2. 16 s r 通用引物 (27F:AGAGTTTGATCMTGGCTCAG/1492R:GGYTACCTTGTTACGACTT)
3. 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

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  $\mu$ l RNase-Free Water 悬浮沉淀，并加入 100  $\mu$ 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  $\mu$ l 的量分出 4 管。按照说明书中的操作步骤，用送检 Trizol 试剂和其他批次的 Trizol 试剂同步平行各自抽提 2 管细菌中的 RNA。最终 RNA 用 100  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。
1. 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。
2. 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@7500 荧光 PCR 仪中进行荧光定量 PCR。
3. 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。
4. 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。

电泳加样顺序：

	DL2000 Marker	检验 1	检验 2	对照 1	对照 2
RNA/PCR 产物	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

### 七、 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 RNA 反转录成的 cDNA 作为模板的 RT-PCR 扩增曲线正常。
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。