

版本号: RT240718

# *E.Coli* Genome DNA Standard Kit

## *E.Coli* 基因组DNA标准品试剂盒

目录号: RT505-T1

### 产品内容

产品组成	RT505-T1 (240 ng)
<i>E.Coli</i> Genome DNA Standard (9.62 ng/ $\mu$ l)	25 $\mu$ l
DNA Dilution Buffer	1 ml

### 储存条件

收到本产品后, 请立即置于-30~-15 $^{\circ}$ C下保存, 保质期24个月。

## 产品简介

本产品是*E. Coli*细胞基因组DNA的标准品，用于qPCR检测*E. Coli*基因组DNA实验中的标准品制备。其中，*E. Coli* Genome DNA Standard是*E. Coli* DNA含量测定标准品，浓度为9.62 ng/ $\mu$ l，可以此浓度标准品为基础，进行其他浓度标准品的梯度稀释。

试剂盒中的DNA Dilution Buffer是标准品稀释过程中用到的稀释液，稀释液中添加了核酸稳定剂，可提升稀释后核酸标准品的稳定性和准确性。

本产品可搭配TIANGEN的*E. Coli* DNA Detection Kit (Probe) (客户自备，TIANGEN，目录号：FP218-T7)。

## 注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

由于*E. Coli* Genome DNA Standard (9.62 ng/ $\mu$ l) 组分体积较小，开盖使用前，务必先解冻并短暂离心，使得试剂收集到管底后再开盖使用，以免造成试剂损失（运输过程中，试剂可能会粘到管盖上，贸然开盖可能导致试剂掉出管外）。

## 操作步骤

### 1. 试剂准备

将*E. Coli* Genome DNA Standard (9.62 ng/ $\mu$ l) 和DNA Dilution Buffer解冻，解冻后充分混匀，短暂离心将溶液收集至管底后置于冰上备用。

### 2. *E. Coli*基因组标准品DNA的准备

试剂准备好后，利用DNA Dilution Buffer对*E. Coli* Genome DNA Standard (9.62 ng/ $\mu$ l) 进行梯度稀释。建议稀释成如下浓度梯度：

梯度	浓度
梯度1	300 pg/ $\mu$ l
梯度2	30 pg/ $\mu$ l
梯度3	3 pg/ $\mu$ l
梯度4	300 fg/ $\mu$ l
梯度5	30 fg/ $\mu$ l

对于基因组DNA稀释流程，建议操作如下：

(1) 利用DNA Dilution Buffer将*E. Coli* Genome DNA Standard (9.62 ng/ $\mu$ l) 浓度稀释至3 ng/ $\mu$ l。

(2) 取10  $\mu\text{l}$  3 ng/ $\mu\text{l}$ 的样品加入1.5 ml离心管中，再加入90  $\mu\text{l}$  DNA Dilution Buffer，充分混匀，即得到梯度1样品；取10  $\mu\text{l}$ 梯度1样品加入1.5 ml离心管中，再加入90  $\mu\text{l}$  DNA Dilution Buffer，充分混匀，即得到梯度2样品；以此类推得到梯度3-5样品。

### 3. 无模板对照NTC的制备

根据检测需求，需设置无模板对照（NTC），可将RNase-Free ddH<sub>2</sub>O或者DNA Dilution Buffer作为模板使用。

### 4. qPCR反应液准备

以使用*E. Coli* DNA Detection Kit（Probe）（客户自备，TIANGEN，目录号：FP218-T7）为例说明：

(1) 按下表体系进行qPCR反应体系配制：

组成成分	30 $\mu\text{l}$ 体系
<i>E. Coli</i> qPCR Reaction MasterMix	20 $\mu\text{l}$
模板DNA（5个梯度稀释的 <i>E. Coli</i> 基因组DNA以及NTC）	10 $\mu\text{l}$

(2) 根据要检测的样本数量，计算所需反应孔数，一般做3个重复孔/样。反应孔数=（5个浓度梯度的标准品+1个无模板对照NTC） $\times$ 3，建议排板如下图：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		梯度1	梯度1	梯度1								
C		梯度2	梯度2	梯度2								
D		梯度3	梯度3	梯度3								
E		梯度4	梯度4	梯度4								
F		梯度5	梯度5	梯度5								
G		NTC	NTC	NTC								
H												

### 5. 扩增程序参数设置（两步法），以ABI 7500 qPCR仪，软件版本2.0.6为例

(1) 创建空白新程序，选择绝对定量检测模板；

(2) 在Target Name一栏中创建新的检测探针，命名为“*E. Coli*-DNA”，选择报告荧光基团为“FAM”，淬灭荧光基团为“None”；



TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

(3) 在“Assign target (s) to the selected wells”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“3000”、“300”、“30”、“3”、“0.3”（含义为每孔的DNA含量，单位为pg），并且在相应的“sample name”一栏中命名为“Std1”、“Std2”、“Std3”、“Std4”、“Std5”；将无模板对照NTC孔的“Task”一栏设置为“NTC”，之后点击“Start Run”，开始仪器运行。

## 6. 扩增程序设置如下表

设置反应体积 30  $\mu$ l。

阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1 $\times$	95 $^{\circ}$ C	2 min	预变性	否
PCR 反应	40 $\times$	95 $^{\circ}$ C	15 sec	变性	否
		60 $^{\circ}$ C	30 sec	退火/延伸	是

注意：关于ROX矫正的问题说明。*E. Coli* qPCR Reaction MasterMix中已经添加了ROX矫正染料，添加浓度可同时满足需要基础ROX浓度矫正的仪器和需要高ROX浓度矫正的仪器。无需ROX矫正的仪器可不考虑此问题。

## 结果判读

1. 结果分析的参数设置（比如Threshold和Baseline等），一般可根据仪器自动给出的参数进行判读，若数据不理想，也可进行手动调整。
2. 在“Analysis”的“Standard Curve”面板中，可读取标准曲线的 $R^2$ 、扩增效率（Eff%）、斜率（Slope）等参数。正常的标准曲线参数： $R^2 > 0.99$ ；扩增效率在 $90\% \leq \text{Eff}\% \leq 110\%$ 之间；Slope在3.4左右。
3. 无模板对照NTC的CT值应为Undetermined或测值低于60 fg，或根据实验室自身验证结果设定具体标准。