

R4168 性能验证报告

实验 1: 试剂盒 R4168、R4168B、R4168C 无 DNase 提取猪血 RNA 对比

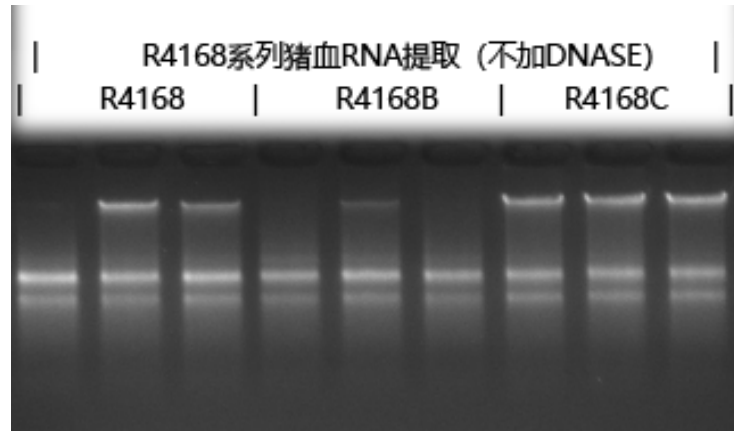
- 样品类型: 1ml 新鲜猪血加入 4ml RNAsafer LS Reagent, 颠倒混匀后, 2-8 度放置 24 小时。
- 洗脱体积: 100ul
- 提取时间: 60 分钟
- 检测试剂盒: R4168、R4168B、R4168C
- 检测方法: nanodrop 和琼脂糖凝胶电泳
- 三种版本的操作操作:

试剂盒	RNA 沉淀预回收	消化与裂解	优点
R4168	样品于 3000-5000xg 离心 10 分钟沉淀 DNA 和 RNA, 用 RNase Free Water 清洗, 再离心得到含 DNA 和 RNA 沉淀物。	1: 加入高盐试剂重悬和溶解沉淀物, 加入稀释液和蛋白酶 K 消化样品。过滤去除 DNA, 加入乙醇过柱吸附 RNA, 最后洗出 RNA。	旧产品。提前变性核酸酶, RNA 完整性更好。
R4168B	样品于 3000-5000xg 离心 10 分钟沉淀 DNA 和 RNA, 用 RNase Free Water 清洗, 再离心得到含 DNA 和 RNA 沉淀物。	1: 加入高盐试剂重悬和溶解沉淀物, 加入稀释液和蛋白酶 K 消化样品。过滤去除 DNA, 加入乙醇过柱吸附 RNA, 最后洗出 RNA。	qiagen 的 BR1、BR2 更为接近, 沉淀更易打散和溶解。
R4168C	样品于 3000-5000xg 离心 10 分钟沉淀 DNA 和 RNA,	1: 加入裂解液和蛋白酶 K 重悬和溶解沉淀 2: 过滤去除 DNA 3: 加入乙醇过柱吸附 RNA, 最后洗出 RNA。	新产品, 简化, 只需一步处理就完成前处理。

从 Paxgene Tube 或 RNAsafer LS Reagent 保存的血液中提取 RNA, 与产量和纯度是最为相关的步骤, 首先是让 RNA 或 DNA 从沉淀物中充分溶解出来, 我们发现 R4168B (与 qiagen 类似) 和新开发的 R4168C 可高效打散沉淀物。其次是彻底去除 DNA 污染。本系列产品采用 DNA 过滤柱代替 qiagen 的匀浆柱, 可预先过滤去除部分 DNA, 以确定膜上 DNase 消化能彻底去除 DNA。

实验数据:

样品	试剂盒	核酸 (ng/uL)	产量 (ug)	A260/A280	A260/A230
1ml 新鲜猪血加入 4ml RNAsafer LS Reagent, 颠倒混匀后, 2-8 度放置 24 小时。	R4168	281	28.06	2.14	1.68
		303	30.33	2.19	1.85
		306	30.56	2.10	2.30
	R4168B	279	27.91	2.13	1.67
		299	29.93	2.11	2.44
		280	28.01	2.12	1.78
	R4168C	400	39.98	2.15	1.67
		399	39.93	2.13	2.24
		401	40.08	2.14	2.33



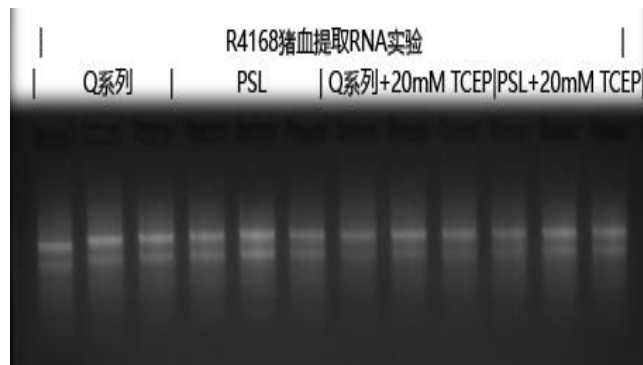
实验结论:

- 1: 使用试剂盒 R4168、R4168B、R4168C 都可以得到完整的 RNA，RNA 浓度高，且 A260/280 比值在 2.0-2.1，A260/230 比值为 1.6-2.2，说明这三个试剂盒都可以提到理想的 RNA。
- 2: 本次实验是在同一瓶猪血中各取出 1ml，加入 4ml RNASafer LS Reagent 混匀后，放置 2-8 度 24 小时后再进行提取。从浓度来看，三种试剂盒 RNA 得率稳定，波动不大。其中 R4168C 产量相对较高，从电泳来看，R4168C 存在较多的 DNA 污染，所以核酸浓度较高。
- 3: 本次实验在提取过程省略了 DNase 膜上消化步骤，以证明不同裂解液处理后，DNA 过滤柱过滤效果。从实验结果可以看出，R4168C 采用温和裂解液，DNA 过滤柱过滤效果相对较差，其中 R4168B 过滤效果最佳。DNA 过滤柱经清洗后，再洗脱出 DNA，测量后，DNA 过滤柱吸附的 25-35ug 基因组 DNA (结果未显示)，表明 DNA 过滤柱也过滤了大量的 DNA。

实验 2: R4168B、R4168C, 加 TCEP 和 DNase 对比

- 样品类型: 1ml 新鲜猪血加入 4ml RNASafer LS Reagent, 颠倒混匀后, 2-8 度放置 48 小时。
- 洗脱体积: 100ul
- 提取时间: 60 分钟
- 检测试剂盒: R4168B、R4168C; 并证明添加 RNA 酶变性剂是否可以保持 RNA 的完整性, 证明添加 DNase I 膜上处理能否充分消化 DNA。
- 检测方法: nanodrop 和琼脂糖凝胶电泳
- 实验数据:

样品	试剂盒	裂解液	核酸(ng/ul)	产量 (ug)	A260/A280	A260/A230
1ml 新鲜猪血 加入 4ml RNASafer LS Reagent, 颠倒混匀 后, 2-8 度放 置 48 小时。	R4168B	Buffer QBR1+Buffer QBR2	213	21.31	2.18	1.32
			233	23.29	2.17	2.25
			224	22.42	2.18	1.95
	R4168C	Buffer PSL	249	24.92	2.18	2.07
			238	23.81	2.20	1.05
			249	24.87	2.17	2.13
	R4168B	Buffer QBR1 (20mM TCEP)+Buffer QBR2	222	22.24	2.21	1.02
			220	22.02	2.20	1.78
			222	22.24	2.19	2.11
	R4168C	Buffer PSL (20mM TCEP)	223	22.35	2.19	1.12
			252	25.22	2.19	2.24
			258	25.84	2.21	1.89



实验结论:

1: TCEP 作为 RNA 变性剂通常被添加至裂解液中以提高裂解液的变性能力。本次实验在 QBR1 或 Buffer PSL 添加 0/20mm TCEP。结果表明, 在 R4168B/R4168C 中, 添加 TCEP 并不能明显提高产量和纯度, 这可能是因为血液样品已经在保存液 Paxgene Tube 或 RNASafer LS Reagent 已经裂解, 所以本系列产品才不明显。

2: 和实验 1 对比, 电泳图表明, 本次得到 RNA 产物中不存在 DNA 污染, 表明膜上 DNASE I 消化可以彻底去除基因组 DNA。

3: 从 OD 值来看, R4168B 和 R4168C 两者产量相当, 重复样品波动不大, 表明试剂盒提取效果好。

推荐使用: R4168 为美基早期产品, 处理多个样品时, 未能充分涡旋时, RNA 提取完整性好。R4168B 是我司针对 qiagen 的 Paxgene RNA Kit 推出的产品, 因沉淀较为方便打散因而 RNA 得率更为稳定。R4168C 是我司于 2023 年 7 月进行对比研发时, 升级的简化产品, 本产品省略一步清洗步骤和简化了消化步骤, 可以省略操作时间, 是一种不错的选择。2023 年 3 月以来, 精准医疗企业对血液 RNA 的需求量明显增加, 我司将继续推出新产品以满足血液 RNA 检测项目的各种需求。