

R4316 性能验证报告

实验 1: 验证 R4316 试剂盒回收微量 DNA 回收率

- 样品类型(模拟样品): 添加稀释过的 DL 2000 Marker 的 RNase Free Water 或猪血浆
- 样品用量: 1ml
- 提取方法: 手工法
- 提取时间: 35 分钟
- 检测试剂盒: R4316
- 检测方法: qubit 仪
- 实验数据(Qubit 数据)

qubit 值	回收后总量	回收率	样品类型
6.67	333.5ng	86%	1: 1ml 猪血浆血浆添加 500ng DL2000 DNA Marker (样品制作方法: 取 1ml 猪血浆, 加入 300ul Buffer CFL 混匀后, 再添加 1ul 500ng DL2000 DNA Marker.)
6.75	337.5ng	87%	
0.38	19 ng	94%	1ml RNase Free Water 添加 20ng DL2000 DNA Marker. (样品制作方法: 取 1ml RNase Free Water, 加入 300ul Buffer CFL 混匀后, 再添加 1ul 20ng DL2000 DNA Marker.)
0.35	17.5 ng	86%	

实验结论: 本次实验, 通加添加定量稀释后的 DL2000 DNA Marker 至猪血浆和纯水样品中进行模拟验证试剂盒的 DNA 回收率。考察到 1ml 猪血浆可能用 5-10ng 的背景核酸, 本次实验添加大量的 500ng DNA Marker 以减少背景对回收率的影响, 而纯水样品中, 无背景核酸, 只需加 20ng 的 DL2000 DNA Marker, 该添加量与大量的样品相当。经试剂盒回收率后, 用 Qubit 进行测量。结果表明:

1: 纯水样品中, 微量 DNA 的回收率超过 86%。

2: 含蛋白质的血浆样品中, 微量 DNA 的回收率也超过 86%。

该实验表明 R4316 对 DNA 有很高的回收率, 未达到 95% 的回收率, 可能是有少量的 DNA 未能从滤膜中完全洗出, 还有结合, 清洗过程会有少量的损失。

(实验步骤参数试剂盒)

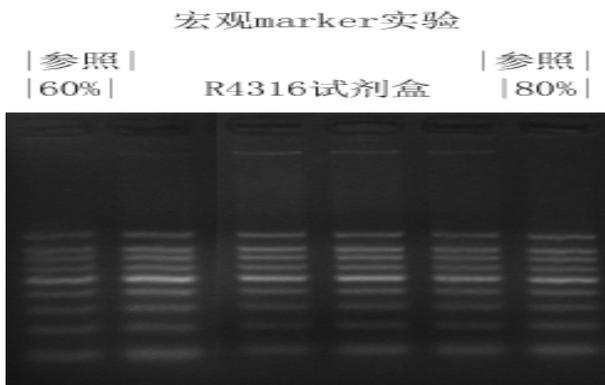
实验 2：验证 R4316 试剂盒回收宏观 marker 效果(短片段回收率)

- 样品类型：定量添加 50bp DNA marker 的猪血浆[样品制备方法：取 1ml 猪血浆，加入 300ul Buffer CFL 混匀后，放置 5 分钟灭活核酸酶后，再加入 20ul 50bp DNA Marker，然后按 Kit 进行操作]
- 样品用量：1ml
- 洗脱体积：50ul
- 提取方法：手工法
- 提取时间：35 分钟
- 检测试剂盒：R4316
- 检测方法：Nanodrop 和电泳
- 实验数据：

Nanodrop 数据：

核酸(ng/ul)	宏观 DNA Marker 回收率	A260/A280	A260/A230
48.66		1.81	0.67
58.07		1.80	0.65
54.43		1.73	0.69
52.24		1.70	0.66

电泳图：



本次实验，通加添加大量的 50bp DNA Marker(~3ug)至猪血浆中进行模拟验证试剂盒的 DNA 回收率、短片段回收率，以及核酸纯度。纯化的 DNA 用电泳和 Nanodrop 进行分析，结果：

1: A260/280 在 1.7-1.8 之间，表明蛋白质清除干净。A260/230 偏低，与试剂盒采用异硫氰酸胍相关，加入核酸浓度较低，所以 A260/230 可没有超过 1.0. 由于 A260/230 的数值对大数应用没有明显的参考值，对该指标不作为本试剂盒的严格标准。(详见胍盐对 A260/230 的影响报告。)

2: 50bp DNA 片段可以回收，通电泳来看，50bp 回收能达到 80%。

3: 整体 DNA 回收率可以超过 80%。

实验 3：验证 R4316 试剂盒回收 miRNA 效果

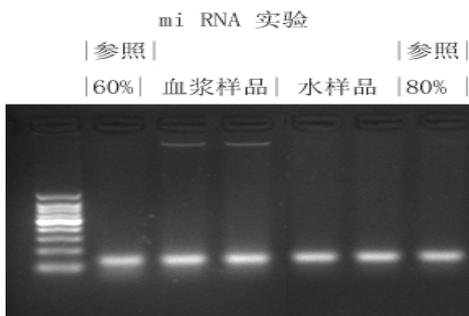
- 样品类型：定量添加 miRNA 的猪血浆 [样品制备方法：取 1ml 猪血浆或 1ml 纯水样品，加入 300ul Buffer CFL 混匀后，放置 5 分钟灭活核酸酶后，再加入 20ul (10ug) 组织富集的 miRNA 到样品中，然后按试剂盒进行操作。】
- 洗脱体积：50ul
- 提取方法：手工法
- 提取时间：35 分钟
- 检测试剂盒：R4316 试剂盒
- 检测方法：nanodrop、电泳、荧光定量 RT-PCR

实验数据：

Nanodrop 数据：

回收后的核酸浓度 (ng/ul)	回收后的核酸总量	回收率	A260/A280	A260/A230	备注
58.32		81%	2.00	0.89	取 1ml 猪血浆，加入 300ul Buffer CFL 混匀后，放置 5 分钟灭活核酸酶后，再加入 20ul (10ug) 组织富集的 miRNA 到样品中，然后按试剂盒进行操作。
57.39		80%	1.96	0.74	
59.50		83%	2.01	0.48	取 1ml 纯水样品，加入 300ul Buffer CFL 混匀后，放置 5 分钟灭活核酸酶后，再加入 20ul (10ug) 组织富集的 miRNA 到样品中，然后按试剂盒进行操作。
59.14		82%	1.90	0.27	

电泳图：



本次实验，通加添加大量的组织 miRNA (~1ug) 至猪血浆中进行模拟验证试剂盒的 miRNA 回收率以及核酸纯度。纯化的 RNA 用电泳和 Nanodrop 进行分析，结果：

1：A260/280 在 1.9-2.0 之间，表明蛋白质清除干净。A260/230 偏低，与试剂盒采用异硫氰酸胍相关，加入核酸浓度较低，所以 A260/230 可没有超过 1.0。由于 A260/230 的数值对大数应用没有明显的参考值，对该指标不作为本试剂盒的严格标准。（详细见胍盐对 A260/230 的影响报告。）

2：50bp DNA Marker 作为参考，本次添加 miRNA 为肝脏组织中纯化的小于 200nt 的 5SRNA（参考 R4310），其片段范围在 50-75nt 之间，电泳回收率分析，回收率超过 80%。

3：从 OD 值分析，miRNA 回收率超过 80%。

实验 4：验证 R4316 试剂盒回收产物对定量 RT-PCR 的影响

- 样品类型：定量添加 RNA 病毒的猪血浆 [样品制备方法：取 1ml 猪血浆或 1ml 纯水样品，加入 1ul 新城疫 RNA 病毒到样品中，然后按试剂盒进行操作，得到的产物用荧光定量 RT-PCR 分析]
- 对照试剂盒：采用标准的病毒试剂盒(IVD5412) 作为参考品.[样品制备方法：取 0.2ml 猪血浆或 0.2ml 纯水样品，加入 1ul 新城疫 RNA 病毒到样品中，然后按试剂盒进行操作，得到的产物用荧光定量 RT-PCR 分析]
- 洗脱体积：50ul
- 提取方法：手工法
- 提取时间：35 分钟
- 检测试剂盒：R4316 试剂盒
- 检测方法：荧光定量 RT-PCR

荧光定量 PCR 数据：

测试条件	备注	Ct	扩增曲线图
R4316 试剂盒	血浆样品	19.52	
		19.60	
	水样品	19.33	
		19.37	
标准病毒试剂盒	血浆样品	19.34	
	水样品	19.03	

实验结论：

- 1: R4316 从血浆，纯水样品中回收到的病毒 RNA，进行定量 PCR 时，CT 值没有差异，表明试剂盒可以高效去除血浆中的各种抑制物。
- 2: R4316 得到的产物与标准的病毒试剂盒得到的产物，进行定量 PCR 时，CT 值没有差异，表明 R4316 在核酸回收率、核酸纯度都在理想范围。

综述：

R4316 适合于从血浆和血清等样品中提取 DNA/RNA/miRNA。为大体积处理的方便性，试剂盒先采用中量柱进行大体积过柱纯化，然后再用微量柱进行浓缩纯化，纯两步纯化，DNA/RNA/miRNA 回收率都高达 80%以上，核酸纯度 A260/280 也在 1.7-2.0，是一个经济方便的试剂盒。本产品同 qiagen 55184 操作原理和操作步骤相似，但价格远代于 qiagen，是高品质的国产代替品。