

Carrier RNA 研发报告

Carrier RNA 基本物化指标检测

1: 浓度和纯度的对比

- 用 1mg 级别的电子天平称取 20mg Carrier RNA 干粉，加入 40ml RNase Free Water 进行溶解，配制成 500ng/ul。
- 取 B 和 C 公司的 Carrier RNA 产品，按说明书指示，加入适量的 RNase Free Water，配制成 500ng/ul。

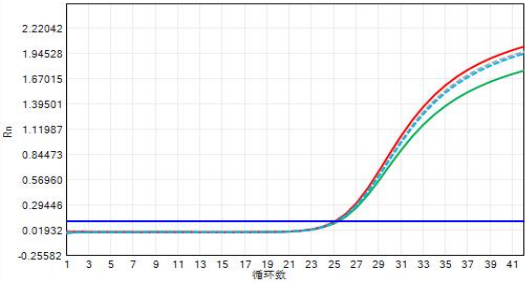
将溶解好的 Carrier RNA 用 Nanodrop 2100 进行浓度和纯度的确定，结果如下。

品牌	重量浓度	A260/230	A260/280	Result(ng/ul)
Magen	500ng/ul	4.62	2.96	530.90
A 公司	500ng/ul	4.43	2.92	566.95
B 公司	500ng/ul	4.78	3.01	473.52

结果分析：Magen 的 Carrier RNA 产品与 A 公司和 B 公司相当，OD 值测量浓度与重量浓度相当，说明产品纯度高，Carrier RNA 干粉中无其它杂质。与进口品牌的 A 公司和 B 公司相比，A260/230，A260/280 基本一致，说明 Magen 的 Carrier RNA 与进口品牌是一致的。

2. 对荧光定量 RT-PCR 的影响

- 取纯化的 RNA 产物作为模板进行荧光定量 RT-PCR，并在该体系中补加入 0ug，和 2ug 美基的 Carrier RNA，和 A，B 公司的 Carrier RNA 后，进行定量 RT-PCR，以检测 Carrier RNA 是否抑制定量 RT-PCR 结果。
- 实验结果：

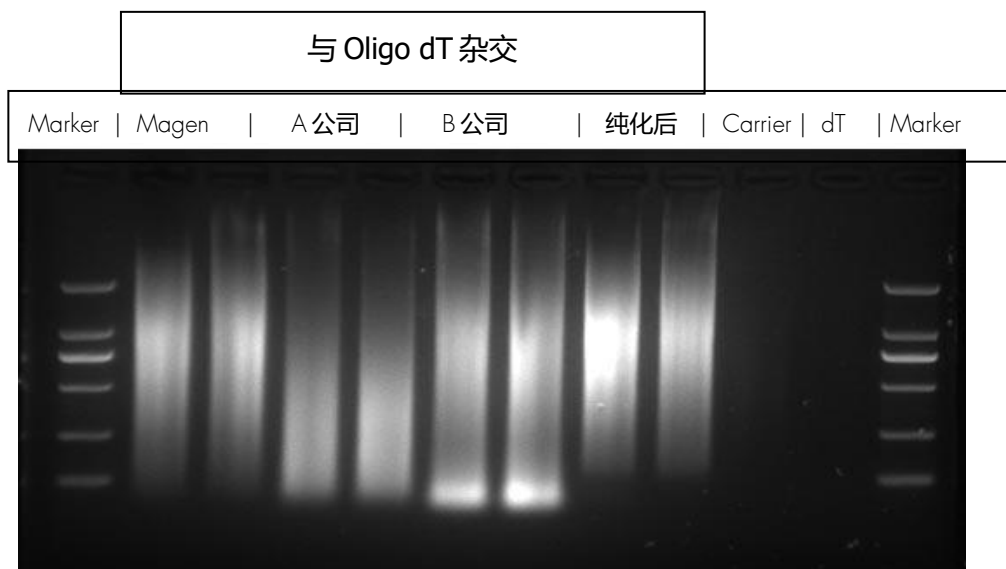
Carrier RNA 添加量	公司	Ct 值	扩增图
2ug	美基	25.09	
2ug	PE	25.22	
2ug	达安	25.19	
0ug		25.36	

结果分析：荧光定量结果表明，Carrier RNA 不抑制荧光定量，说明美基的 Carrier RNA 纯度高。

3. 片段长度分析

- 取 2ug Carrier RNA 美基, A 公司和 B 公司), 同 2ug Oligo (dT) 进行混和, 然后用 1.5%琼脂糖凝胶进行电泳分析。

实验结果:



- 结果分析: 电泳结果表明, :

1: 单纯的 Oligo dt 和 Carrier RNA 进行电泳时, 无条带。是因为单链核酸与 EB 无法结合。

2: 与 Oligo DT 杂交后, Carrier RNA 可以与 EB 结合, 有电泳条件。

3: 与 A 公司和 B 公司相比, 美基 Carrier RNA 聚合效果更好, 主要片段在 750-2000bp 之间, 而 A 公司在 100~500bp 之前, B 公司有小片段, 可能是聚合不充分的产物。

4: 美基 Carrier RNA 经柱法纯化, 并用去除小于 200nt 片段的回收条件进行纯化, 结果表明, 纯化前后条带不变化, 进一步说明美基的 Carrier RNA 短片段极少。

二：Carrier RNA 试剂盒功能研发

4：Carrier RNA 在柱法病毒提取试剂盒的功能研发

- 不同品牌的 Carrier RNA 对柱法试剂盒的影响。

样品类型	Carrier RNA 加入量	品牌	Ct 值	平均 CT	扩增图
用灭菌水将新城疫活疫苗(RNA 病毒)稀释 1000 倍, 用 Kit 进行提取。	0ug		27.49	27.87	
			28.24		
	4ug	Magen	22.77	23.05	
			23.33		
	4ug	A 公司	24.59	24.38	
			24.16		
	4ug	B 公司	23.01	23.45	
			23.89		

- 不同用量的 Carrier RNA 对柱法试剂盒 (R4173) 的影响

样品类型	病毒稀释	Carrier RNA 加入量	Ct 值
用猪血浆将新城疫活疫苗(RNA 病毒)进行梯度稀释, 用 Kit 进行提取。	1000 倍	0ug	25.52
		2ug	23.85
		4ug	23.50
		6ug	23.64
	10000 倍	0ug	30.77
		2ug	27.46
		4ug	27.68
		6ug	27.08
	50000 倍	0ug	NoCt
		2ug	32.06
		4ug	31.40
		6ug	31.00

5. Carrier RNA 在磁珠法病毒提取试剂盒的功能研发

- 不同用量的 Carrier RNA 对磁珠法试剂盒 (MD5412) 的影响

样品类型	病毒稀释	Carrier RNA 加入量	Ct 值
用猪血浆将新城疫活疫苗(RNA 病毒)进行梯度稀释, 用 Kit 进行提取。	1000 倍	0ug	22.78
		3ug	22.72
		10ug	22.78
		20ug	22.65
	10000 倍	0ug	26.54
		3ug	26.43
		10ug	26.37
		20ug	26.63
	50000 倍	0ug	30.47
		3ug	30.54
		10ug	29.53
		20ug	30.29

Carrier RNA 其它研发数据

1. Carrier RNA 在柱法和磁珠病毒提取试剂盒的回收率的研发。

- 取大约 5ug Carrier RNA，加灭菌水稀释至 200ul，加入 200ul Buffer RL 漩涡混匀。
- 加入 200ul 无水乙醇进行结合（该结合条件可以去除 200nt 以下的片段）。
- 600ul RW1 洗一次、600ul RW2 洗两次。
- 50ul Free Water 进行洗脱。

Carrier RNA 柱法回收效果测试							
A260/230	A260/280	Result(ng/ul)	条件	产量	公司	投入量	回收效率
0.50	3.05	113.68	200ul 灭菌水 +200ulRL+20 0ul 乙醇	5.68	美基	5.3ug	106%
0.47	3.02	114.08		5.70			
0.55	3.09	89.27		A 公司	4.46	5.6ug	71%
0.95	3.03	70.61			3.53		
0.21	3.04	59.50		B 公司	2.97	4.7ug	61%
0.18	3.06	56.89			2.84		

Carrier RNA 在磁珠法试剂盒中回收效果测试						
A260/230	A260/280	Result(ng/ul)	产量	公司	投入量	回收效率
0.11	2.68	69.37	3.47	美基	5ug	70%
0.12	2.87	72.98	3.65			
0.10	2.54	62.09	3.10	A 公司	5ug	60%
0.09	2.64	58.67	2.93			
0.10	2.64	63.97	3.20	B 公司	5ug	60%
0.10	2.69	59.55	2.98			

- 结论：在不同公司 carrier RNA 中，用不同磁珠法方案提取回收一定量的 carrier RNA,美基 carrier RNA 回收效率基本在 60-70%之间，均与达安/PE 公司的 carrier RNA 回收效果一致，甚至略好于其他公司产品

2: 冻干粉定量分析

A260/230	A260/280	稀释10倍carrier RNA 浓度 (ng/ul)
4.05	2.87	112.57
4.36	2.93	108.83
4.33	2.93	123.71
4.31	2.89	115.23
4.44	2.99	107.92
4.57	2.98	122.38

实验结论：取 6 管 110ug 冻干粉 Carrier RNA,加入 1.1ml 灭菌水使之充分溶解，然后测量浓度。结果表明，6 管冻干粉的浓度相差不大，说明冻干粉浓度准确。