

全血总 RNA 试剂盒检验方法

一、目的

通过全血总 RNA 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：送检全血总 RNA 试剂盒、对照其他批次的试剂盒、1.5ml 离心管若干。
2. cDNA 第一链合成试剂盒、2×SYBR Green PCR Mix、Human-β-actin 引物（F：TGACGTGGACATCCGCAAAG/R：CTGGAAGGTGGACAGCGAGG）
3. 仪器：微量紫外分光光度计、电泳仪、电泳槽、移液器、台式离心机、PCR 仪。

三、全血总 RNA 提取操作步骤

按每管 500 μl 的数量收集 4 管人抗凝全血（同一个血样），按照说明书中的操作步骤，用送检试剂盒和对照试剂盒同步平行各自抽提 2 管全血中的总 RNA。最终总 RNA 用 50 μl RNase-Free Water 洗脱。

四、提取的 RNA 纯度检测步骤

在微量紫外分光光度计上用 RNase-Free Water 调零，取 2 μl 洗脱的全血 RNA 检测，记录各个波长的吸光度。

五、电泳检测操作步骤

在 1% 琼脂糖凝胶上，按下表依次加入 RNA，电泳结束后在紫外灯下观察并记录分析结果。

	检验 1	检验 2	对照 1	对照 2
RNA	5μl	5μl	5μl	5μl
6×Loading Buffer	1μl	1μl	1μl	1μl

六、RT-PCR 检测步骤

1. 每管各取 5 μl 纯化的 RNA 按 Simgen cDNA 第一链合成试剂盒说明书操作获得 cDNA。
2. 将 2×SYBR Green PCR Mix(simgen)各试剂及引物置于冰上，按 2×SYBR Green PCR Mix(simgen)说明书配制 Humanbeta-actin 荧光定量 PCR 反应体系混合液。
3. 依次在荧光定量 PCR 反应体系混合液中加入 5 μl cDNA 模板、ddH₂O（阴性对照）、人全血 RNA 反转录后的 cDNA（阳性对照），盖上管盖。然后放置于 ABI PRISM®7000 荧光 PCR 仪中进行荧光定量 PCR。
4. 打开软件，设置好参数。实验条件如下：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
5. 扩增完成后，观察标准曲线并记录各曲线的 CT 值。

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 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 数值必须在 2.0±0.15 范围内。
3. 送检试剂盒纯化得到的 RNA OD₂₆₀/OD₂₃₀ 数值必须≥1.0。
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的 RNA 反转录的 cDNA 作为模板的 RT-PCR 扩增曲线正常，阴性对照无扩增。
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±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。