

RNApure Virus Kit

病毒 RNA 提取试剂盒

项目号: R666005 (50 preps)

保存条件: 室温 (15-30℃)

产品内容

组分	R666005 50 preps
Buffer GL	15 ml
Buffer RW1	40 ml
Buffer RW2 (concentrate)	11 ml
Proteinase K	12.5 mg
Proteinase K Storage Buffer	1.25 ml
RNase-Free Water	10 ml
Spin Columns RS with Collection Tubes	50
RNase-Free Centrifuge Tubes (1.5 ml)	50

产品简介

本试剂盒采用可以特异性结合病毒 RNA 的吸附柱和独特的缓冲液系统, 适用于从 血清、血浆、尿液、脑脊液等无细胞体液及细胞培养上清液中分离病毒 RNA。病毒 RNA 特异性地结合到硅基质膜上, 而污染物则流过该膜。通过两次高效洗涤完全去除 蛋白质等杂质, 然后用无 RNase 的水或试剂盒提供的 RNase-Free Water 洗脱高纯度的 病毒 RNA。由本试剂盒提取的病毒 RNA 可直接用于 RT-PCR、Real-time RT-PCR 和印 迹分析等实验。

自备试剂: 无水乙醇, 0.9% NaCl。

实验前准备及重要注意事项

1. 向 Proteinase K 中加入 1.25 ml Proteinase K Storage Buffer 使其溶解, -20°C 保存。配制好的 Proteinase K 勿长时间室温放置, 避免反复冻融, 以免影响其活性。
2. 预防 RNase 污染, 应注意以下几方面:
 - 1) 使用无 RNase 的塑料制品和枪头, 避免交叉污染。
 - 2) 玻璃器皿应在使用前于 180°C 高温下干烤 4 小时, 塑料器皿可在 0.5 M NaOH 中浸泡 10 分钟, 用水彻底冲洗后高压灭菌。
 - 3) 配制溶液应使用无 RNase 的水。
 - 4) 操作人员戴一次性口罩和手套, 实验过程中要勤换手套。
3. 血清或血浆避免反复冻融导致蛋白变性或产生沉淀, 减少病毒滴度进而影响提取病毒核酸的产量。
4. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明先在 Buffer RW2 中加入无水乙醇。
5. Buffer GL 如果产生沉淀, 可在 56°C 加热使其溶解后室温放置。
6. 所有离心步骤若无特殊说明均在室温下进行, 且所有操作步骤动作要迅速。

操作步骤

1. 室温下取 200 μl 血清或血浆加到 1.5 ml 离心管 (自备) 中。注意: 不足 200 μl 可以加入 0.9 % NaCl (客户自备) 补足。
2. 向上步溶液中加入 20 μl Proteinase K, 混匀。
3. 加入 200 μl Buffer GL, 涡旋震荡 15 秒。注意: 不要直接把 Proteinase K 加到 Buffer GL 中。
4. 56°C 孵育 15 分钟, 短暂离心, 将管壁上的溶液收集到管底。
5. 加入 250 μl 无水乙醇, 涡旋震荡 15 秒, 室温孵育 5 分钟, 短暂离心, 将管壁上的溶液收集到管底。
6. 将步骤 5 得溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns RS) 中, 若一次不能将全部溶液加入吸附柱中, 请分两次转入, 12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$) 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
7. 向吸附柱中加入 500 μl Buffer RW1, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
8. 向吸附柱中加入 500 μl Buffer RW2 (使用前检查是否加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
9. 向吸附柱中加入 500 μl 无水乙醇, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
10. 12,000 rpm 离心 3 分钟, 倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟, 以彻底晾干。

注意:

- 1) 这一步的目的是将吸附柱中残余乙醇去除, 乙醇的残留会影响后续的酶促反应 (酶切、PCR 等)。
- 2) 推荐步骤: 将吸附柱放入一个新的 1.5 ml 离心管 (自备) 中, 打开管盖, 56°C 烘箱孵育 3 分钟, 使吸附柱的膜彻底干燥。

11. 将吸附柱置于一个新的无 RNase 离心管中，向吸附柱的中间部位悬空加入 20-50 μ l RNase-Free Water，室温放置 5 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟，收集 RNA 溶液，-70℃ 保存 RNA，防止降解。

注意：

- 1) RNase-Free Water 体积不应小于 20 μ l，体积过小影响回收率。
- 2) 如果要提高 RNA 的产量，可用 20-50 μ l 新的 RNase-Free Water 重复步骤 11。
- 3) 如果要提高 RNA 浓度，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，重复步骤 11。