

A&DPure 超敏病毒 RNA 纯化试剂盒说明书

产品组成

A&DPure 超敏病毒 RNA 纯化试剂盒 Cat. No.	5 次样品 A-4003005	50 次制备 A-4003050
核酸纯化柱	5 个	30 个
2 ml 离心管	5 个	30 个
Carrier RNA	20 μ l	120 μ l
Buffer L9	6 ml	55 ml
Buffer WA（浓缩液）	1.9 ml	12 ml
Buffer WBR（浓缩液）	1.5 ml	12 ml
Buffer TE	2 ml	2 ml \times 2
说明书	1 份	1 份

产品储存

Carrier RNA 请置于 -20 $^{\circ}$ C 贮存。

其他物品和试剂请于 2~8 $^{\circ}$ C 贮存。

技术支持

艾德科技（北京）有限公司研发部：e-mail: tech@aderr.com 电话：010-57225208。

产品介绍

本产品适合从 500 μ l 新鲜的或者冷冻的血浆或血清中分离纯化总 RNA，可稳定检测到含 100copies/ml RNA 病毒的体液标本。本试剂盒采用强烈的裂解液溶解并沉淀去除蛋白。在含有 RNA 的上清液中补加乙醇后加入核酸纯化柱，RNA 结合在核酸纯化柱上，残留的蛋白与 PCR 抑制物则被过滤除去，RNA 经 Buffer WA 和 Buffer WBR 洗涤后，用 Buffer TE 洗脱，即可用于各种分子生物学实验。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇
2. 1.5ml 离心管（必须选用 RNase-free 的 1.5ml 离心管）
3. 移液器吸头（为避免 RNA 酶的污染，请选用含有滤芯的 RNase-free 移液器吸头）
4. 乳胶手套、一次性口罩等防护用品和纸巾
5. 台式小量离心机（可配离心 1.5ml 离心管和 2ml 离心管的转子）
6. 旋涡振荡器
7. 不使用 RNA 酶的实验室

使用前准备

- 1) 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25 $^{\circ}$ C。
- 2) 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WA 和 Buffer WBR 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾作好“乙醇已加”的标记。
- 3) 由于唾液、皮肤上均含有 RNA 酶，请在 RNA 的提取的全过程中都戴口罩和乳胶手套。
- 4) 根据所需要制备的核酸样品数计算需要使用的 Buffer L9 体积（1ml Buffer L9/管，注意由于加液过程可能存在误差，建议计算时增加 300~500 μ l Buffer L9 的体积），按每 1ml Buffer L9 体积加入 3 μ l Carrier RNA 的比例加入 Carrier RNA，旋涡振荡数秒混匀。

操作步骤：

RNA 病毒核酸提取注意事项：

1. 尽量采用新鲜分离的或者冻融不超过一次的血清进行病毒 RNA 的分离纯化。反复冻融的血清将导致检出的敏感性降低，表现为 CT 值偏大或者假阴性。
2. 如果不能及时将新鲜的血清进行 RNA 提取，可将血清用 Buffer L9 溶解后于 -70℃ 冻存。（详见步骤 1）

1) 在 1.5 ml 离心管中加入 1ml 含 Carrier RNA 的 Buffer L9，再加入 500 μl 血清或者血浆，漩涡振荡 30 秒混合均匀。

* 如果不能及时将新鲜获得的血清或者血浆进行 RNA 提取，可在本步骤将溶解后的标本于 -70℃ 冻存。冻存一星期内不影响 RNA 的提取效率。

* Buffer L9 具有腐蚀性，请戴防护用品进行操作。

2) 13,000 rpm 离心 10 分钟。在一个洁净的 1.5 ml 离心管中加入 400 μl 无水乙醇备用。

3) 吸取 700 μl 离心上清转移到装有无水乙醇的 1.5 ml 离心管中，勿弃吸头，直接用吸头吸注两次混匀，吸取混合液进入步骤 4) 的操作。

4) 转移 550 μl 步骤 3) 中的混合液转移到核酸纯化柱（核酸纯化柱置于 2ml 离心管中）中，盖上管盖，12,000 rpm 离心 30 秒。

5) 弃 2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2ml 离心管中，将 1.5 ml 离心管中剩余的液体全部倒入核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将 2ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

6) 弃 2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 500 μl Buffer WA，盖上管盖，12,000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

7) 弃 2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 700 μl Buffer WBR，盖上管盖，12,000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

8) 弃 2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2ml 离心管中，14,000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14,000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

9) 弃 2ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个 RNase-free 的 1.5ml 离心管中，在纯化柱中加入 30~50 μl Buffer TE，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12,000 rpm 离心 30 秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8,000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

10) 弃纯化柱，洗脱的 RNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 RNA 储存于 -70℃ 备用。

* 用于病毒 RNA 检测，适当增加模板的用量可提高检测的敏感性（终体积为 50 μl 的一步法 RT-PCR 反应体系中加入 25 μl 洗脱的 RNA 作为模板，无明显的抑制效果）。