

版本号: 260706

Viral Genomic DNA/RNA Fast Kit I
病毒基因组 DNA/RNA 快速提取试剂盒 I

目录号: RN32

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性:**

试剂盒组成	保存	50 次(RN3201)	100 次(RN3202)
裂解液 VCB	室温	10 ml	20 ml
去蛋白液 PE	室温	16 ml 第一次使用前按瓶子标签说明加无水乙醇	32 ml
漂洗液 RW	室温	10 ml 第一次使用前按瓶子标签说明加无水乙醇	25 ml
Poly Carrier	-20°C	100 µl	200 µl
蛋白酶 K 溶液	4°C	1 ml	1 ml × 2
RNase-free H ₂ O	室温	5 ml	10 ml
RNase-free 吸附柱 RA	室温	50 个	100 个
收集管 (2 ml)	室温	50 个	100 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 蛋白酶 K 保存在即用型甘油缓冲液中, 常温运输。收到后, 不超过 25°C 室温至少保存 6 个月, 4°C 保存 12 个月, -20°C 保存 2 年。
2. Poly Carrier 常温运输, 4°C 可存放一个月, 长期保存置于 -20°C 保存。
3. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化, 各溶液使用后应及时盖紧盖子。

❖ 产品介绍：

采用特异性结合病毒 DNA/RNA 的离心吸附柱和独特的缓冲液系统，病毒 DNA/RNA 提取试剂盒适合于从无细胞体液，包括血浆、血清、腹水、培养细胞上清液、脑脊髓液及尿液等中快速提取高纯的病毒 DNA/RNA。同时该产品还可以从全血中提取病毒 DNA/RNA，可以满足绝大多数的病毒 RNA/DNA 的同时提取要求，如病毒 RNA：HCV（丙肝病毒），HIV（艾滋病病毒），和 HTLV（人类嗜 T 淋巴细胞病毒）；病毒 DNA：HBV（乙肝病毒）和 CMV（巨细胞病毒）等等。病毒裂解后，DNA/RNA 后在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜（特别配备了 Poly Carrier 可以从体系中轻松捕获微量核酸），再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤，将盐、细胞代谢物、蛋白等杂质去除，最后低盐的洗脱缓冲液将纯净的病毒 DNA/RNA 从硅基质膜上洗脱。纯化后的病毒核酸无杂质和 PCR 抑制剂，可直接适用于 PCR/RT-PCR 分析。

❖ 产品特点：

1. 不需要使用有毒的苯酚等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 节省时间，简捷，单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。
3. 多次柱漂洗确保高纯度，提取的病毒 DNA/RNA 纯度高，质量稳定可靠，可适用于各种常规操作，包括 PCR/RT-PCR、酶切、测序、Southern 杂交等。

❖ 注意事项：

1. 所有的离心均在室温完成，使用转速可以达到 13,000 rpm 的台式离心机。
2. 开始实验前将需要的水浴先预热到特定温度备用。

3. Poly Carrier：

Poly Carrier 使用方法：如果起始处理量很少，我们推荐使用 Poly Carrier，如果预期有较大量核酸产量，用户可以根据需要选择是否加入 Poly Carrier。使用时在每个样品提取所需裂解液 VCB 中加入 2 μ l Poly Carrier 储存溶液，将裂解液 VCB 与 Poly Carrier 溶液充分颠倒混匀即可（裂解液 VCB 容易起泡沫，请勿使用涡旋振荡混匀）。也可根据样品数量，在总共需要的裂解液 VCB 中加入总共需要的 Poly Carrier 混匀备用。混合液在室温 24 小时内稳定。

4. 本试剂盒也可以从组织、细胞中提取病毒 DNA。需要单独购买裂解液 VL。

❖ **操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）**

⇒ 第一次使用前请按照漂洗液 RW 和去蛋白液 PE 瓶标签指示加入无水乙醇，充分混匀，加入后及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！

1. 在一个新的 1.5 ml 离心管内加入 20 μ l 蛋白酶 K。
2. 向上述离心管内加入 200 μ l 血清等体液（需回复到室温，不足可用 0.9% NaCl 或者 PBS 补足），加入 200 μ l 裂解液 VCB，**立刻涡旋振荡充分混匀**。
 - ▲ 如果处理样品量小或者病毒预期浓度较低，建议在 200 μ l 裂解液 VCB 中加入 2 μ l Poly Carrier 储存溶液。
3. 56°C 孵育 15 min。
 - ▲ 如果样品为全血，推荐 72°C 孵育 10 min。
4. 加入 200 μ l 无水乙醇，**立刻涡旋振荡充分混匀**，室温放置 5 min。
 - ▲ 如果周围环境高于 25°C，乙醇需要冰上预冷后再加入。
5. 将上述混合物加入一个吸附柱 RA 中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm 离心 30-60 sec，倒掉收集管中的废液。
6. 加入 500 μ l 去蛋白液 RE（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），13,000 rpm 离心 30 sec，弃废液。
7. 加入 500 μ l 漂洗液 RW（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），13,000 rpm 离心 30 sec，弃废液，加入 500 μ l 漂洗液 RW，重复一遍。
8. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，13,000 rpm 离心 2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
9. 将吸附柱 RA 转移至新的 1.5 ml 离心管中，向吸附柱膜中央悬空滴加 30-50 μ l RNase free H₂O（事先在 70-90°C 水浴中加热效果更好），室温放置 2 min，13,000 rpm 离心 1 min。如果想得到较多量的 DNA/RNA，可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中，13,000 rpm 离心 1 min。
 - ▲ 洗脱体积越大，洗脱效率越高。如果需要 DNA/RNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于 20 μ l，体积过小降低洗脱效率，减少 DNA/RNA 产量。
10. 病毒 DNA 可以短暂放置在 2-8°C 或者立即使用，如果要长时间存放，可以放置在 -20°C。病毒 RNA 建议最好立刻使用，否则立刻短期放置在 -70°C 备用。

❖ 附录：从组织、细胞中提取病毒 DNA（包含基因组 DNA）

1. **柱平衡：**向吸附柱 RA 中加入 100 μ l 平衡液，13,000 rpm 离心 1 min，弃滤液，备用。

▲平衡液可以增强硅胶膜的吸附核酸能力，请使用当天处理的吸附柱。

2. 组织培养细胞

- a. 收集约 10^5 - 10^6 悬浮细胞到一个 1.5 ml 离心管；对于贴壁细胞，应该先用胰蛋白酶消化后吹打下来收集。
- b. 13,000 rpm 离心 10 sec，使细胞沉淀下来。吸弃上清，留下细胞团。
- c. Flick 管底拨弹松散细胞团，加 180 μ l 裂解液 VL 将细胞沉淀重悬裂解。
- d. 加入 20 μ l 蛋白酶 K 溶液，充分混匀，再加入 200 μ l 裂解液 VCB，**立刻涡旋振荡充分混匀**，在 70°C 放置 10 min。

▲**可选做步骤：**如果 RNA 残留较多，需要去除 RNA，可以在加入 200 μ l 裂解液 VCB 前加 5 μ l RNase A (100 mg/ml，货号：DN52)溶液，振荡混匀，室温放置 5-10 min。

- e. 冷却后加 200 μ l 无水乙醇，**立刻涡旋振荡充分混匀**，此时可能会出现絮状沉淀。

- f. 接操作步骤项下 5。

3. 动物组织（例如鼠肝脑）

- a. 将 20-30 mg 新鲜或者解冻的组织用解剖刀切成小碎块（切成小块可以提高产量）或者在液氮中研磨组织成细粉后，转入装有 180 μ l 裂解液 VL 的 1.5 ml 离心管中，用剪大口径的吸头吹打混匀。

- b. 加入 20 μ l 蛋白酶 K，立刻涡旋振荡充分混匀。

- c. 将裂解物放置在 55°C 水浴 1-3 小时或者直到组织消化完全，期间轻柔的振荡几次帮助裂解。

▲**可选做步骤：**如果 RNA 残留较多，需要去除 RNA，可以在加入 200 μ l 裂解液 VCB 前加 5 μ l RNase A (100 mg/ml，货号：DN52)溶液，振荡混匀，室温放置 5-10 min。

- d. 加入 200 μ l 裂解液 VCB，**立刻涡旋振荡充分混匀**，70°C 放置 10 min。

- e. 冷却后加 200 μ l 无水乙醇，**立刻涡旋振荡充分混匀**，此时可能会出现絮状沉淀。

- f. 接操作步骤项下 5。