

AipPure 病毒基因组 RNA 快速提取试剂盒(离心柱型)

AipPure Virus Genome RNA Rapid Extraction Kit(Centrifugal Column)

使用说明书

◆版本号：240220

◆目录号：RE252

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次 (RE252-01)	100 次 (RE252-02)
裂解液 RLB	室温	20mL	40mL
去蛋白液 RE	室温	25mL	50mL
漂洗液 RW	室温	10mL 第一次使用前按说明加指定量乙醇	20mL
RNase-free Water	室温	10mL	10mL
吸附柱 RA 和收集管 (RNase-free)	室温	50 套	100 套

◆**适用范围：**适用于从无细胞体液(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。

◆**产品储存：**本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

◆**产品介绍：**

本试剂盒采用采用特异性结合病毒 RNA 的独特的缓冲液系统和特制离心吸附柱，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 RNA。该产品可以满足绝大多数的病毒 RNA 的提取要求，如病毒 RNA：HCV(丙肝病毒)、HIV(艾滋病毒)和 HTLV(人类嗜 T 淋巴细胞病毒)等等。

本试剂盒配备了爱普科学独家研发的特制裂解液，病毒被裂解后，RNA 在高离子盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜上，再通过一系列快速的漂洗/离心等步骤，将盐、细胞代谢物和蛋白等杂质去除，最后低盐的洗脱缓冲液将纯净的病毒 RNA 从硅基质膜上洗脱。纯化后的病毒 RNA 无杂质和抑制剂，纯度高、完整性好，可直接用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 和 Northern-Blot 等下游相关分子生物学实验。

◆**产品特点：**

1. 操作安全，完全不使用有毒的苯酚、氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 节省时间，快速简捷，单个样品操作一般可在 20 分钟内完成。

3. 多次柱漂洗确保高纯度，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 2.1-2.2(100%纯的 RNA 比值一般是 2.2 左右)，提取的病毒 RNA 纯度高、完整性好，质量稳定可靠，可适用于各种常规操作，包括反转录 PCR、荧光定量 PCR 和 Northern-Blot 等相关试验。

◆**注意事项：**

1. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到13,000rpm的传统台式离心机。
2. 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。所有的溶液应该是澄清的，如果环境温度低时溶液可能形成沉淀，此时不应该直接使用，可在 37°C 水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
3. 裂解液 RLB 和去蛋白液 RE 中含有刺激性化合物，操作时请穿实验服并佩戴一次性乳胶手套，实验操作中应避免避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要立即用大量清水或者生理盐水冲洗。
4. 预防 RNase 污染，应注意以下几方面：
 - 1) 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致 RNase 污染。
 - 2) 使用 RNase-free 的塑料制品和枪头避免交叉污染。
 - 3) RNA 在裂解液中时不会被 RNase 降解，但提取后继续处理过程中应使用 RNase-free 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在 150°C 烘烤 4 小时，塑料器皿可在 0.5M NaOH 中浸泡 10 分钟，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除 RNase。
 - 4) 配制溶液应使用 RNase-free 的水。(将水加入到干净的玻璃瓶中，加入 DEPC 至终浓度 0.1%(v/v)，37°C 放置过夜，高压灭菌)
5. 关于 DNA 的微量残留：一般说来任何总 RNA 提取试剂在提取过程中无法完全避免 DNA 的微量残留(DNase 消化也无法做到 100%无残留)，本公司的 RNA 提取产品，由于采取了本公司独特的缓冲体系和特殊吸附能力的吸附膜，已经清除了绝大部分的 DNA 残留，在大多数 RT-PCR 扩增过程中极其微量的 DNA 残留(一般电泳 EB 染色紫外灯下观察不可见)影响不是很大，如果要进行严格的 mRNA 表达量分析如荧光定量 PCR，我们建议在进行模板和引物的选择时：
 - 1) 选用跨内含子的引物，以穿过 mRNA 中的连接区，这样 DNA 就不能作为模板参与扩增反应。或者选择基因组 DNA 和 cDNA 上扩增的产物大小不一样的引物对。或者缩短延伸时间，使 DNA 来源模板无法参与扩增反应。
 - 2) 将 RNA 提取物用 RNase-free 的 DNase I 处理。本试剂盒还可以用于 DNase I 处理后的 RNA 清洁纯化(货号：RE282)，请联系我们索取具体操作说明书。
 - 3) 在操作步骤的去蛋白液 RE 漂洗前，直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 柱上消化处理，以进一步清除 gDNA 残留污染。可购买爱普科学的 DNA 酶柱上消化试剂盒(货号：RE280)，购买前可先索取具体操作说明书。

6. RNA 纯度及浓度检测:

完整性: RNA 可用普通琼脂糖凝胶电泳(电泳条件: 胶浓度 1.2%, 0.5× TBE 电泳缓冲液, 150v, 15 分钟)检测完整性。由于细胞中 70-80%的 RNA 为 rRNA, 电泳后 UV 下应能看到非常明显的 rRNA 条带。动物 rRNA 大小分别约为 2kb 和 1kb, 分别相当于 28S 和 18S rRNA。动物 RNA 样品中最大 rRNA 亮度应为次大 rRNA 亮度的 1.5-2.0 倍, 否则提示 RNA 样品的降解。出现小的弥散片状或条带消失表明样品严重降解。但是应该注意区分是提取出来的 RNA 样品本身降解了, 还是提取出来的 RNA 是完好的, 只是在电泳过程中降解的。

纯度: OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值是衡量蛋白质污染程度的重要参考指标。高质量 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 读数在 2.1-2.2 之间(100%纯的 RNA 比值一般是 2.2 左右, 很多公司的产品因为残留蛋白或者 DNA 较多, 造成比值降低, 无法达到 2.2 这个纯度标准, 因此降低要求 1.9-2.0 就凑合使用了, 但是爱普科学的试剂盒提取产品标准一般可以达到高水准的 2.1-2.2 的纯度标准)。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 读数受测量使用的机器影响, 也受测定所用稀释溶液的 pH 值影响。微量分光光度计一般不需要稀释, 不受稀释溶液的 PH 值影响。但是同一个 RNA 样品, 如果测量的时候机器要求稀释后测量, 假定在 10mM Tris, pH7.5 稀释溶液中测出的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 读数 1.9-2.1 之间, 在水溶液中所测读数则可能在 1.5-1.9 之间, 但这并不表示 RNA 不纯。

浓度: 取一定量的 RNA 提取物, 用 RNase-free 水稀释 n 倍, 用 RNase-free 水将分光光度计调零, 取稀释液进行 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 测定, 按照以下公式进行 RNA 浓度的计算: 终浓度(ng/μL)=(OD₂₆₀)×(稀释倍数 n)×40。

◆操作步骤(实验前请先阅读注意事项):

提示: 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶中按照该组分标签上的指示, 加入指定量无水乙醇, 充分混匀后请及时在标签上标记已加入乙醇, 以免多次加入!

1. 取 200μL 血清等样本体液(需恢复到室温, 不足可用 0.9% NaCl 或者 PBS 补足)转入一个新的 1.5mL 离心管, 加入 400μL 裂解液 RLB, 立刻涡旋振荡充分混匀。
2. 室温(15-25°C)放置 10 分钟, 每隔 5 分钟, 振荡混匀一次。
3. 加入 450μL 无水乙醇, 立刻涡旋振荡充分混匀。

注: 如果周围环境高于 25°C, 乙醇需要冰上预冷后再加入。

4. 将上述混合物加入一个吸附柱 RA 中, (吸附柱放入收集管中)12,000rpm 离心 30-60 秒, 弃废液。

注: 如果总体积超过 750μL, 可分两次将混合物加入同一个吸附柱 RA 中。

5. 加入 500 μ L 去蛋白液 RE, 12,000rpm 离心 30 秒, 弃废液。
6. 加入 500 μ L 漂洗液 RW(请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000rpm 离心 30 秒, 弃废液, 再加入 500 μ L 漂洗液 RW, 重复操作一遍, 弃废液。
7. 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 12,000rpm 离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
8. 取出吸附柱 RA, 放入一个新的无酶的 1.5mL 离心管中, 根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加入 30-50 μ L RNase-free Water(事先在 65-70 $^{\circ}$ C 水浴中加热效果更好), 室温放置 1 分钟, 12,000rpm 离心 1 分钟。如果想得到较多量的 RNA, 可将得到的溶液重新加入离心吸附柱中, 12,000rpm 离心 1 分钟, 洗脱 RNA。提取的高纯度 RNA 可直接用于下游相关实验或储存于 -85 $^{\circ}$ C 至 -65 $^{\circ}$ C 保存。

注: 可重新加入 30-50 μ L RNase-free Water 重复操作步骤 8 一遍, 合并两次洗脱液(如果需要 RNA 产量高); 或者使用第一次的洗脱液重新加回到吸附柱内, 重新洗脱一遍(如果需要 RNA 浓度高)。用户根据具体实验需要自行选择。

注: 洗脱体积越大, 洗脱效率越高, RNA 产量越高, 但是浓度将会降低。如果需要 RNA 浓度较高, 可以适当减少洗脱体积, 但是最小洗脱体积建议最好不少于 20 μ L, 体积过小会降低 RNA 洗脱效率, 减少 RNA 产量。

=====

