杭州新景生物试剂开发有限公司
地址：浙江省杭州市西湖区西园一路 8 号 4 幢 5F
官方网站：www.simgen.cn 电话：0571-87381295

病毒 RNA 试剂盒说明书

产品组成

病毒 RNA 试剂盒 Cat. No.	5 次制备 4001005	50 次制备 4001050
核酸纯化柱	5 个	50 个
2 ml 收集管	5 个	50 个
Carrier RNA	20 µl	180 µl
Buffer L	2 ml	18 ml
Buffer WA（浓缩液）	1.9 ml	12 ml
Buffer WBR（浓缩液）	1.5 ml	10 ml
RNase-free Water	1.5 ml	2 ml×2
说明书	1 份	1 份

产品储存与有效期

Carrier RNA 请置于 - 20℃贮存，其他试剂与物品储存于常温（0~30℃），可在两年内保持使用性能无明显变化。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn，电话：400-0099-857。

产品介绍

本产品适合从 100 µl 新鲜的或者是冷冻贮藏的不含细胞的体液样品（包括血浆、血清、尿液、CSF 及细胞培养上清）中分离纯化病毒 RNA。被溶解的体液中的病毒 RNA 结合到核酸纯化柱上后，经两种洗液洗涤去除残留在核酸纯化柱上的 PCR 抑制物，最后用 RNase-free Water 洗脱，即可用于 RT-qPCR 实验。用本试剂盒分离纯化的病毒 RNA 可检测到体液中浓度低至 500 copies/ml 的病毒。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇
2. RNase-free 的 1.5 ml 离心管
3. 移液器及吸头（必须选用含有滤芯的 RNase-free 移液器吸头）
4. 一次性手套、口罩等防护用品及纸巾
5. 旋涡振荡器、台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
6. 可能需要水浴锅

使用前准备

1. 检查 Buffer L 是否有沉淀的结晶出现，若有沉淀请将 Buffer L 置于 70℃水浴直至沉淀完全溶解，颠倒混匀后再使用（注意：当室温低于 20℃时，Buffer L 极易出现沉淀）。
2. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25℃。
3. 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做好“乙醇已加”的标记。
4. 根据所需要提取的病毒样品数计算需要使用的 Buffer L 体积（300 µl Buffer L/管，注意由于加液过程可能存在误差，建议计算时增加 300~500 µl Buffer L 的体积），按每 1 ml Buffer L 体积加入 10 µl Carrier RNA 的比例加入 Carrier RNA，旋涡振荡数秒混匀。
   注意：加入 Carrier RNA 的 Buffer L 必须在 12 小时内用完。

操作步骤

注意事项：

A. 尽量采用新鲜分离的或者冻融不超过一次的样品进行病毒 RNA 的分离纯化。反复冻融的样品将导致检出的敏感性降低，表现为 CT 值偏大或者假阴性。

B. 如果必须使用冻融超过一次以上的血浆或血清进行病毒 RNA 分离时，应先将血浆或血清于 6800 rpm 离心 3 分钟，吸取 100 µl 上清进行病毒 RNA 的分离，否则血浆或血清中因反复冻融所产生的冷凝蛋白可能在操作过程中堵塞核酸纯化柱，导致病毒 RNA 提取失败。

1. 在 1.5 ml 离心管中加入 300 µl 含 Carrier RNA 的 Buffer L，再加入 100 µl 样品，盖上管盖，旋涡振荡数秒混合均匀，室温静置 10 分钟。

* 为避免阳性样品污染 Buffer L 而造成假阳性，应先加入 Buffer L 再加入待检样品。
* 为避免打开管盖时样品间的交叉污染，可低速离心数秒，使管盖上的溶液沉降到管底。

2. 每管加入 320 µl 无水乙醇，盖上管盖，温和地翻转离心管 3~5 次混合均匀。

* 为避免打开管盖时样品间的交叉污染，可低速离心数秒，使管盖上的溶液沉降到管底。

3. 吸取步骤 2 中的混合液加入到核酸纯化柱中（核酸纯化柱置于 2 ml 收集管中），盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 注意不要将溶液沾到纯化柱管口的边缘上，以免后续的洗涤步骤不能洗净纯化柱。

4. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 500 µl Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 滤液无需彻底弃尽，如果要避免粘附在收集管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 收集管在纸巾上倒扣拍击一次。
* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

5. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 600 µl Buffer WBR，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

6. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 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。

7. 弃 2 ml 收集管，将核酸纯化柱置于一个 RNase-free 的 1.5 ml 离心管中，在核酸纯化柱的膜中央加入 50 µl RNase-free Water，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 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 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

8. 弃核酸纯化柱，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°C以下备用。

* 取 25 µl 洗脱的病毒 RNA 作为模板用于 RT-qPCR（50 µl RT-qPCR 一步法反应体系）可提高病毒检测的敏感性。