

Code No. 9766

研究用

TaKaRa

TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA
Extraction Kit Ver.5.0

说明书

● 制品说明

本试剂盒是专门用于从血浆、全血、无细胞体液、病毒原液和感染病毒的组织中提取各种病毒（Virus）RNA/DNA 的小量纯化试剂盒。试剂盒采用了特别的病毒裂解系统，由病毒裂解液裂解病毒释放 RNA 或 DNA，再结合核酸制备膜技术纯化 RNA 或 DNA，适用于各种 RNA 或 DNA 病毒的核酸提取。本试剂盒具有高效、快速、方便之特点，病毒裂解后，提取操作仅需 20 分钟便可完成。提取得到的 RNA 可用于 RT-PCR 反应、Northern 杂交等多种分子生物学实验。

● 制品内容（50 次量）

本试剂盒分 Package I 和 Package II 两部分。

■ Package I

Proteinase K (20 mg/ml)	1 ml
Carrier RNA	50 μ l

■ Package II

Buffer VGB*1	12 ml
Buffer RWA*1	28 ml
Buffer RWB*2	24 ml
RNase free dH ₂ O	2 ml \times 2
Spin Column	50 支
Collection tube	50 支
RNase free collection tube (1.5 ml)	50 支

*1 含有强变性剂，应避免与皮肤、衣物等接触。若不小心接触到眼睛或皮肤时，请立即用大量水冲洗，必要时寻求医疗咨询。

*2 在首次使用前，请添加 56 ml 的 96–100%乙醇，混合均匀。

【试剂盒之外所需准备试剂】

- ◆ 96–100%乙醇
- ◆ PBS 溶液

● 保存

Package I : -20°C

Package II : 室温 (15 – 25°C)

● 实验前的准备

1. 准备 56°C 水浴。
2. Buffer RWB 在首次使用前，请添加 56 ml 的 96–100%乙醇，混合均匀。

● 操作注意事项

1. 应尽量使用新鲜的实验材料，以确保样品中的 DNA 或 RNA 不被降解。
2. 使用液氮研磨组织材料时，应随时加入液氮，以确保提取的 RNA 不被降解。
3. 部分试剂中含刺激性化合物，操作时请戴上乳胶手套和眼镜，避免沾染皮肤和眼睛等，并应尽量在通风橱中进行操作。若沾染皮肤、眼睛，要立即用大量清水冲洗，必要时寻求医疗咨询。
4. 建议用 RNase free dH₂O 洗脱 RNA。
5. 由于试剂盒使用的 Carrier RNA 是大肠杆菌来源的 RNA，其主要作用是提高微量 DNA/RNA 提取时的回收率，并保护提取得到的微量 RNA 不被降解。但一旦待检样品引物与 Carrier RNA 同源性较高时，偶尔会产生假阳性检出。如果产生假阳性检出时，可重新设计引物。

● 操作方法

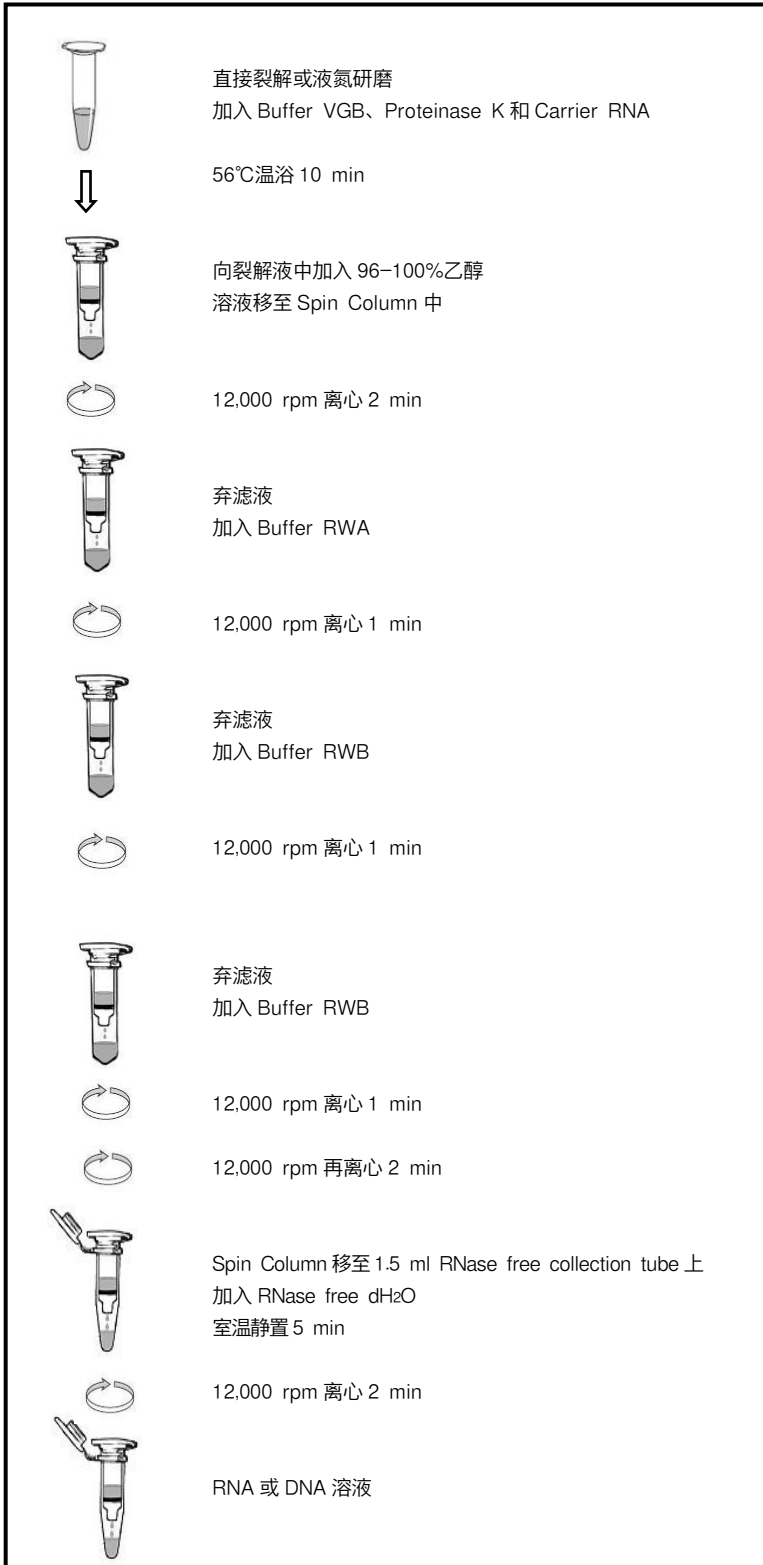


图 1. 操作流程简图

操作流程见图1，分为病毒裂解、RNA或DNA与膜结合、RNA或DNA纯化等步骤，病毒裂解后的操作约需20分钟（如果起始材料为感染病毒的组织则需要经过液氮研磨），详细说明如下：

1. 病毒的裂解：

使用不同的实验材料需采用不同的裂解步骤，具体说明如下：

◆ 血浆、血清、无细胞体液、病毒原液中病毒的裂解：

- ① 取10~200 μl 的血浆、血清、无细胞体液、病毒原液，10~100 μl 的全血，如果起始量不足200 μl ，用PBS溶液或RNase free dH₂O补足至200 μl 。
- ② 加入200 μl 的Buffer VGB、20 μl 的Proteinase K和1.0 μl 的Carrier RNA，充分混匀于56℃水浴温浴10分钟。
- ③ 向裂解液中加入200 μl 的96-100%乙醇，充分吸打混匀。

◆ 感染病毒的组织裂解：

- ① 取10 mg感染病毒的组织进行液氮研磨，研磨后的组织加入200 μl PBS溶液或RNase free dH₂O。
- ② 加入200 μl 的Buffer VGB、20 μl 的Proteinase K和1.0 μl 的Carrier RNA，充分混匀于56℃水浴温浴10分钟。
- ③ 向裂解液中加入200 μl 的96-100%乙醇，充分吸打混匀。

2. 将Spin Column安置于Collection Tube上，溶液移至Spin Column中，12,000 rpm离心2分钟，弃滤液。
3. 将500 μl 的Buffer RWA加入至Spin Column中，12,000 rpm离心1分钟，弃滤液。
4. 将700 μl 的Buffer RWB加入至Spin Column中，12,000 rpm离心1分钟，弃滤液。
注) 请确认Buffer RWB中已经加入了指定体积的96-100%乙醇。
请沿Spin Column管壁四周加入Buffer RWB，这样有助于完全冲洗沾附于管壁上的盐份。
5. 重复操作步骤4。
6. 将Spin Column安置于Collection Tube上，12,000 rpm再离心2分钟。
7. 将Spin Column安置于新的1.5 ml RNase free collection tube上，在Spin Column膜的中央处加入30~50 μl 的RNase free dH₂O，室温静置5分钟。
注) 洗脱制备膜上的RNA时，请使用RNase free dH₂O。
8. 12,000 rpm离心2分钟洗脱DNA/RNA。
如需获得更大收量，可将离下液重新加入到Spin Column膜的中央或再加入30~50 μl 的RNase free dH₂O，室温静置5分钟后，12,000 rpm离心2分钟洗脱DNA/RNA。
注意：由于提取时加入了Carrier RNA，不能通过电泳或吸光度测定定量。

● 实验例

1. 从甲肝疫苗原液中提取HAV RNA

使用本试剂盒从1 μl 、0.1 μl 、0.01 μl 甲肝疫苗原液(分别相当于 6.0×10^6 、 6.0×10^5 、 6.0×10^4 copies的HAV)中提取其RNA，并使用TaKaRa One Step RNA PCR Kit(AMV) (Code No. RR024A)进行RT-PCR检测，扩增289 bp片段，电泳结果见图2。

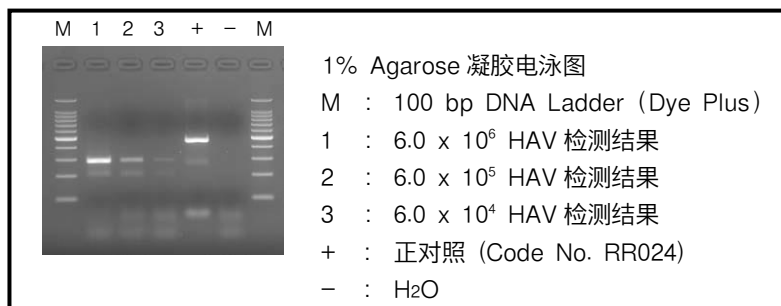


图 2. 从甲肝疫苗原液中提取 HAV RNA 并进行 RT-PCR 检测

2. 从细胞培养液、全血、唾液、尿液、小鼠肝脏中提取 HAV 病毒 RNA

使用本试剂盒从 200 μ l HL60 细胞培养液、10 μ l 全血、200 μ l 唾液、200 μ l 尿液、10 mg 小鼠肝脏中提取 HAV RNA, 并使用 TaKaRa One Step RNA PCR Kit(AMV) (Code No. RR024)进行 RT-PCR 得到 289 bp 片段, 其电泳结果见图 3。

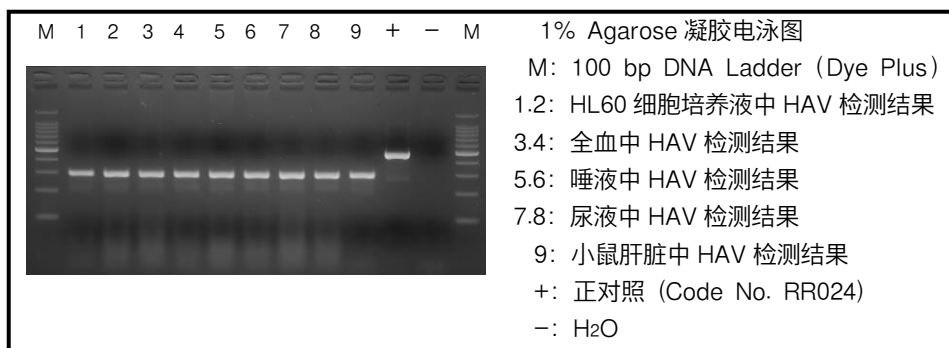


图 3. 不同样品中 HAV-RNA 的纯化

3. 从狂犬疫苗 Flury 株中提取 RNA

使用本试剂盒从 10 μ l 和 0.1 μ l 狂犬疫苗 Flury 株原液 (相当于 1.6×10^7 和 1.6×10^5 copies 狂犬疫苗) 中提取 RNA, 并使用 TaKaRa One Step RNA PCR Kit(AMV)进行 RT-PCR 得到 500 bp 片段, 其电泳结果见图 4。

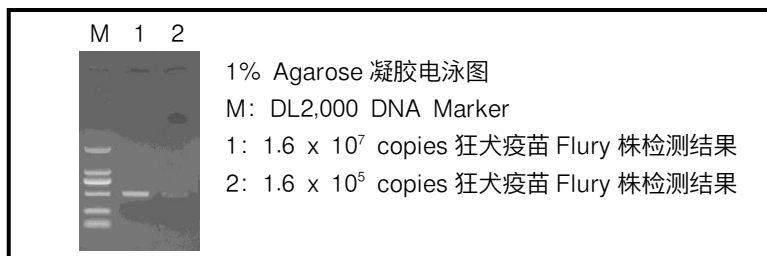


图 4. 从狂犬疫苗 Flury 株中提取 RNA

● 实验材料最大起始量

实验材料	最大起始量
细胞培养液	200 μ l
全血	100 μ l
血清	200 μ l
血浆	200 μ l
无细胞体液	200 μ l
病毒原液	200 μ l
感染病毒的组织	10 mg

● Troubleshooting

<如果提取的核酸质量低? >

- ① 提取的核酸中盐份浓度过高。在使用 Buffer RWA 和 Buffer RWB 进行核酸制备膜的清洗时，请沿 Spin Column 的管壁四周加入，这样有利于提高清洗效果。
- ② 洗脱液中残留乙醇，在向 Column 中加入 RNase free dH₂O 之前，将 Column 在室温下静置 2 分钟。
- ③ 进行核酸洗脱时，请一定在膜的中央加入 RNase free dH₂O。

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>