

TaKaRa Code: DV819A

---

**MiniBEST Viral RNA/DNA  
Extraction Kit Ver.4.0  
(50 次量)**

---

说明书

**TaKaRa**

宝生物工程(大连)有限公司

# 目 录

内 容	页 码
●制品说明	1
●制品内容	1
●保存温度	1
●实验前的准备	1
●实验注意	1
●安全保证	2
●操作方法	2
●实验例	3
A. 病毒 RNA 纯化	3
B. One Step RT-PCR 反应	3
●实验例结果	4

## ● 制品说明

本试剂盒是从体液中快速纯化病毒 RNA/DNA 的试剂盒，可以从少量体液（如：血浆、血清、腹水、细胞培养上清、脑脊髓液、尿液等）中高效快速提取高纯度的病毒 RNA/DNA。试剂盒采用了独特的病毒颗粒裂解系统，由细胞裂解液裂解病毒颗粒释放病毒 RNA/DNA，然后使用特殊溶液选择性地除去蛋白质等杂质，再结合核酸制备膜技术纯化病毒 RNA/DNA。本试剂盒具有高效、快速、方便之特点，全套操作仅需 30 分钟便可纯化得到高纯度的病毒 RNA/DNA。使用本试剂盒纯化得到的病毒 RNA/DNA 可以用于 PCR 反应、RT-PCR 反应等各种分子生物学实验。

## ● 制品内容（50 次量）

本试剂盒分试剂 Set 与 Column Set 两部分。

### ■ 试剂 Set

Solution A	12 ml
Solution B	4 ml
Rinse A*1	17.5 ml
Rinse B*2	13.5 ml
Elution Buffer (DNase, RNase Free)	1 ml×3 支

\*1 首次使用前，请添加 12.5 ml 的 100%乙醇。

\*2 首次使用前，请添加 31.5 ml 的 100%乙醇。

### ■ Column Set

Spin Column	50 支
Collection Tube (2 ml)	50 支×2

## ● 保存温度：室温。

## ● 实验前的准备

1. 首次使用前，请将 Rinse A 中加入 12.5 ml 的 100%乙醇，Rinse B 中加入 31.5 ml 的 100%乙醇，混合均匀后使用。
2. 准备异丙醇（1%冰乙酸）：在 99 ml 的异丙醇中加入 1 ml 冰乙酸，混合均匀，室温密闭储存。

## ● 实验注意

RNA 极易分解，因此在进行 RNA 实验时，须对以下方面严格要求，以保证实验的顺利进行。

### 1. 实验操作的注意

在 RNA 实验中，保证 RNA 的纯度十分重要。而制备 RNA 的关键是要抑制病毒中的 RNA 分解酶和防止所用器具及试剂中的 RNA 分解酶的污染。因此，在实验中必须采取以下措施：戴一次性干净的手套；使用 RNA 操作专用实验台；在操作过程中避免讲话等等。通过以上办法可以防止实验者的汗液、唾液中的 RNA 分解酶的污染。

### 2. 实验器具的处理

应尽量使用一次性 RNase Free 塑料器皿，若用玻璃器皿，应在使用前按下列方法进行处理。

① 用 0.1%DEPC(焦碳酸二乙酯)水溶液在 37℃下处理 12 小时。

② 然后在 120℃下高压灭菌 30 分钟以除去残留的 DEPC。

RNA 实验用的器具和仪器建议专门使用，不要使用于其它实验。

### 3. 实验试剂的使用

用于 RNA 实验的试剂，须使用干热灭菌（180℃，60 min.）或用上述方法进行 DEPC 水处理、灭菌后的玻璃容器盛装（也可使用 RNA 实验用的一次性塑料容器），使用的无菌水须用 0.1% 的 DEPC 处理后进行高温高压灭菌。RNA 实验用的试剂和无菌水都应专用，避免混用后交叉污染。

### 4. 防止核酸污染

核酸污染可能使 PCR 反应、RT-PCR 反应出现假阳性，实验时应使用新的枪头、1.5 ml Microtube 等，具体操作时应戴上手套等。

## ●安全保证

病毒操作必须严格注意安全，加强安全防护措施。

1. 严格要求防止病毒感染。
2. 严格执行操作程序，废弃物应灭菌后废弃。
3. Solution A、Rinse A 中含有刺激性物质，应注意实验操作安全。如果一旦溅入眼睛或接触到皮肤上时，应立即用清水清洗，或咨询医生等。

## ●操作方法

本操作是从 200 μl 样本中纯化病毒 RNA/DNA 为例设计的，使用其它体积的样本时，其 Solution A、Solution B、异丙醇（1%冰乙酸）的使用量需要按比例调整，但 Rinse A、Rinse B 的使用量不用改变。

操作流程见图 1，全套操作约需 30 分钟，详细说明如下。

1. 取 200 μl 样本，加入 1.5 ml 离心管中。
2. 加入 200 μl 的 Solution A，剧烈振荡混匀后，室温放置 5 分钟。
3. 加入 75 μl 的 Solution B，混合均匀后，12,000 rpm 离心 5 分钟。
4. 将上清液转移到新的 Collection Tube（2 ml，试剂盒中提供）中，加 250 μl 异丙醇（1%冰乙酸），上下颠倒混匀。
5. 将试剂盒中的 Spin Column 安置于另一新的 Collection Tube（2 ml，试剂盒中提供）上。
6. 将上述操作 4. 的上清液转移至 Spin Column 中，12,000 rpm 离心 1 分钟（如 Spin Column 中有液体残留，可适当提高离心速度，再离心 1 分钟），弃滤液。
7. 将 500 μl 的 Rinse A 加入至 Spin Column 中，室温静置 1 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟，弃滤液。  
注) 请确认 Rinse A 中已经加入了指定体积的乙醇。
8. 将 800 μl 的 Rinse B 加入至 Spin Column 中，12,000 rpm 离心 1 分钟，弃滤液。  
注) 请确认 Rinse B 中已经加入了指定体积的 100%乙醇。

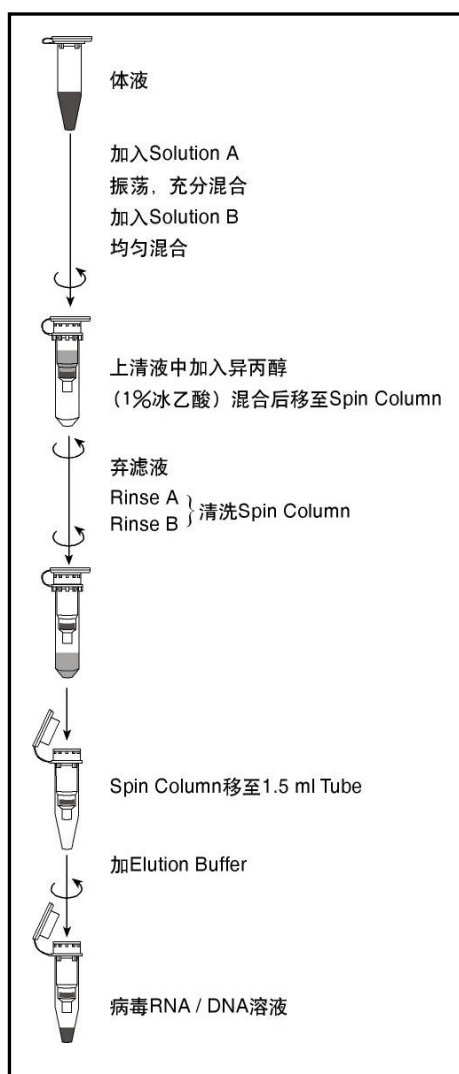


图 1. 实验操作流程简图

9. 再次进行 12,000 rpm 离心 1 分钟。
10. 将 Spin Column 安置于新的 1.5 ml 的离心管上, 在 Spin Column 膜的中央处加入 50  $\mu$ l 的灭菌蒸馏水 (RNase Free) 或 Elution Buffer, 室温静置 1 分钟。  
注) 为防止 RNA 的分解, 可在 Elution Buffer 中加入 RNase Inhibitor (TaKaRa Code: D2313), 加入比例为: 每 50  $\mu$ l 的 Elution Buffer 中加入 1  $\mu$ l 的 RNase Inhibitor。
11. 12,000 rpm 离心 1 分钟洗脱病毒 RNA/DNA。

## ● 实验例

### A. 病毒 RNA 的纯化

1. 取  $10^8$  Copies 的甲肝病毒减毒疫苗 (10  $\mu$ l) 加入至含有 190  $\mu$ l 细胞培养上清的 1.5 ml 离心管中。
2. 加入 200  $\mu$ l 的 Solution A, 剧烈振荡混匀后, 室温放置 5 分钟。
3. 加入 75  $\mu$ l 的 Solution B, 混合均匀后, 12,000 rpm 离心 5 分钟。
4. 将上清液转移到新的 Collection Tube (2 ml, 试剂盒中提供) 中, 加 250  $\mu$ l 异丙醇 (1% 冰乙酸), 上下颠倒混匀。
5. 将试剂盒中的 Spin Column 安置于另一新的 Collection Tube (2 ml, 试剂盒中提供) 上。
6. 将上述操作 4. 的上清液转移至 Spin Column 中, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 弃滤液。
7. 将 500  $\mu$ l 的 Rinse A 加入至 Spin Column 中, 室温静置 1 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 弃滤液。
8. 将 800  $\mu$ l 的 Rinse B 加入至 Spin Column 中, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 弃滤液。
9. 再次进行 12,000 rpm 离心 1 分钟。
10. 将 Spin Column 安置于新的 1.5 ml 的离心管上, 在 Spin Column 膜的中央处加入 50  $\mu$ l 的 Elution Buffer (含 RNase Inhibitor), 室温静置 1 分钟。
11. 12, 000 rpm 离心 1 分钟洗脱病毒 RNA。

### B. One Step RT-PCR 反应

使用 TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) (TaKaRa Code: DRR024A) 进行 RT-PCR 反应, 扩增 290 bp 的 DNA 片段, 详细操作方法如下:

1. 按下列组份配制 RT-PCR 反应液。

经纯化的 RNA 溶液	适当量
10 $\times$ One Step RNA PCR Buffer	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	10 $\mu$ l
dNTP Mixture (10 mM)	5 $\mu$ l
RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
AMV RTase XL (5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
AMV-Optimized Taq (5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
HAV F Primer (20 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
HAV R Primer (20 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
RNase Free dH <sub>2</sub> O	up to 50 $\mu$ l

2. 按以下条件进行 RT-PCR 反应。

50°C	15 min.	RT 反应	
94°C	2 min.	RTase 失活	
94°C	30 sec.	} 30 Cycles	
55°C	30 sec.		
72°C	1 min.		

3. 反应结束后，取 RT-PCR 反应液 10 μl 进行琼脂糖凝胶电泳，确认 290 bp 的 PCR 扩增片段。

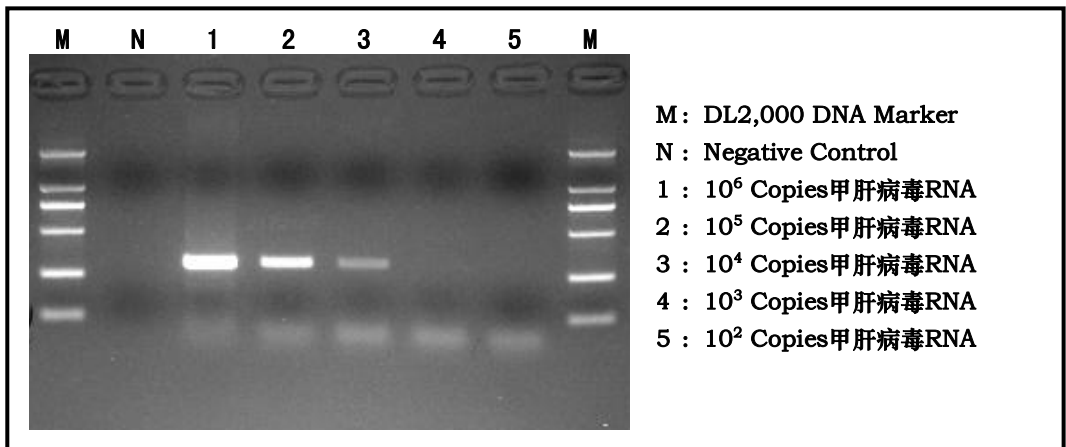
### ●实验例结果

#### 1. 病毒 RNA 的纯化回收效率

把  $10^8$  Copies 的甲肝病毒减毒疫苗用细胞培养上清稀释至 200 μl，经本试剂盒纯化后回收得到了  $8 \times 10^7$  Copies 的病毒 RNA，其病毒的纯化回收效率约在 80% 左右。

#### 2. One Step RT-PCR 结果

按照上述“实验例”的操作方法，对甲肝病毒减毒疫苗进行 RNA 的纯化后进行 RT-PCR 反应，取 RT-PCR 反应液 10 μl 进行 Agarose 凝胶电泳的结果如下。结果显示，本试剂盒纯化回收的病毒颗粒 RNA 具有良好的 RT-PCR 扩增性能，可以良好扩增  $10^4$  Copies 的病毒 RNA。



# MEMO

**技术咨询热线：**

0411-87641685, 87641686  
8008909508, 4006518769

**宝生物工程（大连）有限公司**

**TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.**

辽宁省大连经济技术开发区东北二街 19 号 (116600)

No.19 Dongbei 2nd Street, Development Zone, Dalian, China

电 话： 0411-87641681 87641683

传 真： 0411-87619946 87621675

E.mail: service@takara.com.cn

网 址： <http://www.takara.com.cn>

V2010.02

本制品仅供研究用。请勿用于人体及动物的医疗、临床诊断或作为食品、化妆品、家庭用品的添加剂