

EZ-press Viral RNA Purification Kit 说明书

Cat.No.:EZB-VRN1

使用本试剂盒前，请务必仔细阅读本说明书，以保证操作正确

产品组分

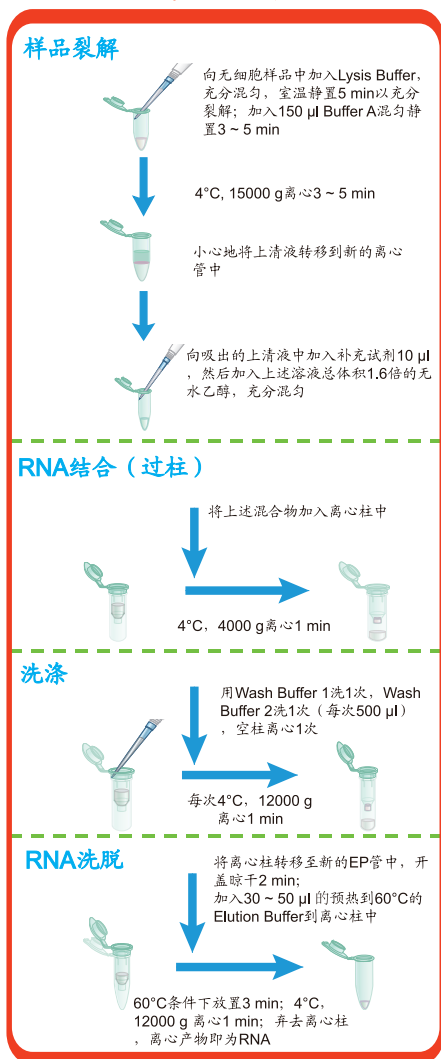
组分	EZB-VRN1 (100 Preps)
Lysis Buffer	55 ml
Buffer A	22 ml
Supplemental Reagent	1100 μ l
Wash Buffer 1*	13 ml
Wash Buffer 2*	13 ml
Elution Buffer	10 ml
Spin Columns for RNA (with Collection Tubes)	100 Preps

注：*1. Wash Buffer 1和Wash Buffer 2首次使用前，请加入52 ml的无水乙醇并充分混匀。

保存条件

Lysis Buffer和Buffer A需 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 避光保存，Supplemental Reagent需 -20°C 保存，其余的组分室温保存（注：Buffer A在 4°C 保存时会出现结晶或冻结现象，仅需在使用前置于室温融化后使用即可，不影响使用）。有效期12个月。

实验流程



注意

1. 提取时应该按照病毒类生物安全规范进行操作，注意安全。
2. Wash Buffer 1和Wash Buffer 2首次使用前，请加入52 ml的无水乙醇并充分混匀（Wash Buffer 1和Wash Buffer 2与无水乙醇的体积比为1:4）。
3. Elution Buffer使用前建议分装为3份保存，以防污染。
4. 本试剂盒用于血浆、血清、脑脊液、鼻咽拭子、痰液、支气管灌洗液、肺泡灌洗液等无细胞体液样品中病毒RNA的提取。
4. Elution Buffer需置于水浴锅或金属浴提前预热到 60°C 。
5. RNA洗脱时一定要将洗脱液加到柱中央的膜上，如果洗脱液加到侧壁上，会导致RNA没有被溶解而使产量大大减少。

样品裂解

1. 取150 μ l的无细胞样品，加入500 μ l Lysis Buffer，用移液器充分吹打混匀。
2. 室温静置5 min，以充分裂解样品。
3. 加入150 μ l Buffer A，用手快速剧烈振荡混匀15 sec（不建议涡旋混匀），室温静置3 ~ 5 min。
4. 15000 g（约13000 rpm）， 4°C 离心3 ~ 5 min，将上清液转移至新的1.5 ml EP管中（注意：吸取上清时不要吸到中间层和下层液体，以免造成杂质残留）。

RNA结合 (过柱)

5. 向吸出的上清中加入Supplemental Reagent（补充试剂）10 μ l，充分混匀后再加入上述溶液（上清液 + 补充试剂）总体积1.6倍的无水乙醇，充分混匀（如果加入无水乙醇后出现沉淀，建议用移液器吹打至沉淀不可见为止）。
6. 将上述混合液转移至RNA离心吸附柱（Spin Column）中，4000 g（约6500 rpm）， 4°C 离心1 min后，小心地取出离心柱，倒掉废液。倒掉废液后，将收集管口倒扣在吸水纸上叩几下，以便将收集管口残留的液体吸干净。

洗涤

7. 加入500 μ l Wash Buffer 1到离心柱中，12000 g， 4°C 离心1 min；小心取出离心柱，倒掉废液，将收集管口倒扣在吸水纸上叩几下，以便将收集管口残留的液体吸干净，然后再将离心柱套回收集中（注意：将离心柱从收集管中取出时，应小心操作，防止离心柱底部接触到液体）。
8. 加入500 μ l Wash Buffer 2，12000 g， 4°C 离心1 min（洗柱）。倒掉废液，将收集管口倒扣在吸水纸上叩几下，以便将收集管口残留的液体吸干净。
9. 将离心柱套回收集中，12000 g， 4°C 离心1 min以充分去除残留的废液。
10. 弃去收集管，将离心柱转移至无RNase的1.5 ml EP管中，开盖晾干2 min。

RNA洗脱

11. 吸取30 ~ 50 μ l Elution Buffer（需提前预热到 60°C ）加入离心柱中央的膜上，盖上管盖，然后将上述套有离心柱的EP管在 60°C 的水浴锅或金属浴中放置3 min，以充分溶解RNA。

12. 12000 g， 4°C 离心1 min（可选操作：在初次洗脱离心后，可以将液体加回离心柱，再室温放置5 min，使RNA充分溶解后再次离心，能增加RNA产量）。弃去离心柱，所得的RNA即可进行后续实验，或储存于 -80°C 备用。

RNA浓度测定

对于常规的RNA样品（组织和细胞等），浓度和纯度通常可以使用紫外分光光度计测定，如Nanodrop等。

对于少量RNA（如从外泌体中提取的RNA）的浓度和纯度测定，需要使用Agilent 2100 Bioanalyzer或Qubit来测定。

但是，对于非常微量的RNA（如从血清、血浆中提取的病毒RNA），通常建议直接取等量样品提取RNA，然后直接取等体积的RNA进行逆转录和qPCR进行检测即可。

EZBpress Viral RNA Purification Kit Trouble Shooting

1、RNA产量过低，或用已经验证过的引物检测基因表达，检测到的内参基因Ct值偏大，或无法做出正常的扩增结果。

解决办法：

a. 检查所使用的试剂是否受到污染：可与未使用过的产品作对照，比较两组结果是否一致。建议试剂盒开封后，每种buffer分装为3份（可用15、50 ml离心管分装），每次使用时应严格按照规范操作，防止交叉污染。

b. 溶解好的引物应该分装为小份冻存，以减少引物降解及降低污染的可能性。

c. 检查操作流程是否正确。例如：

1. Wash Buffer 1和Wash Buffer 2首次使用前，请加入52 ml的无水乙醇并充分混匀（Wash Buffer 1和Wash Buffer 2与无水乙醇的体积比为1:4）。

2. 向上清液中加入补充试剂10 μ l，充分混匀后再加入上述溶液（上清液 + 补充试剂）总体积1.6倍的无水乙醇，充分混匀后转移至到柱子中。

3. 洗涤时需用12000 g高速离心充分去除Wash Buffer，然后空柱离心一次，然后开盖晾干2 min（此步骤可防止Wash Buffer残留在柱上）。

4. 洗脱液的体积可以根据需要在一定范围内调整（一般30 ~ 50 μ l，不可少于30 μ l，否则无法充分溶解RNA），以浓度满足后续实验需求为宜。重复洗脱一次及延长放置时间至5 min均可提高RNA产量。

2、RNA浓度测定

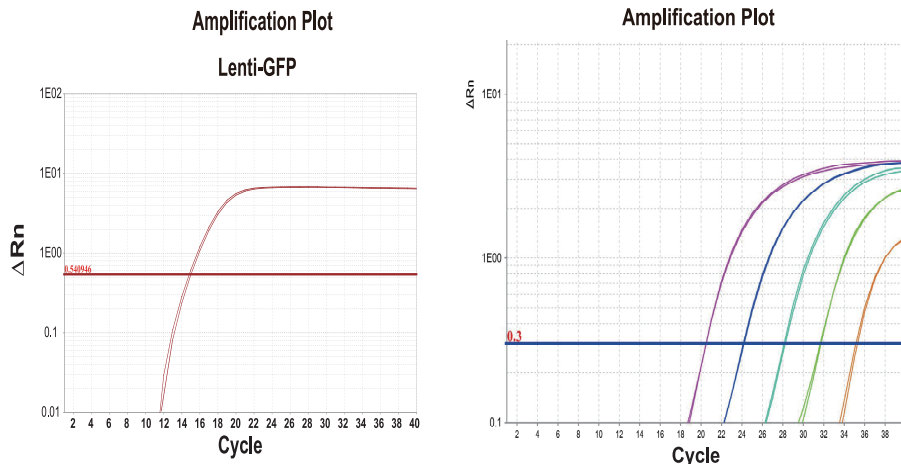
a. 对于常规的RNA样品，浓度和纯度通常可以使用紫外分光光度计测定，如Nanodrop等。

b. 对于少量RNA的浓度和纯度测定，可以使用Agilent 2100 Bioanalyzer，RT-qPCR或Qubit来测定。

c. 对于非常微量的RNA（如从血浆、血清中提取的病毒RNA），可以直接用RT-qPCR（可用探针法试剂盒，货号：EZB-RTProbe）进行检测。

代表性实验结果

本试剂盒用于提取慢病毒（Lenti-Virus）RNA的测试结果请见下图：



由上述qPCR的检测结果可见，本试剂盒能够很好的用于病毒RNA的提取。并且将该试剂盒提取得到的假病毒RNA进行梯度稀释，然后进行RT-qPCR检测，得到的扩增曲线线性关系良好，表明该RNA具有很高的纯度。