

Para uso exclusivo em pesquisa.

Kit de Extração de RNA Viral

Catálogo	Especificação	Armazenamento/Validade
CV-R017-50	50T	Temperatura ambiente/ 1 ano
CV-R017-200	200T	Temperatura ambiente/ 1 ano

Introdução do Produto

Este produto é adequado para a extração de vários RNAs virais de plasma, sangue total, fluidos corporais livres (incluindo plasma, soro, urina, LCR e sobrenadante de cultura de células), solução de estoque viral e tecidos infectados. Comparado com o método tradicional de fervura, a sensibilidade de detecção pode ser aumentada em 10-50 vezes. Comparado com o método tradicional Trizol, a sensibilidade de detecção pode ser aumentada de 5-10 vezes. Após o ácido nucleico do vírus dissolvido ser ligado à coluna purificada, o Tampão WBR é utilizado para remover o inibidor residual de PCR na coluna purificada, e então eluído com Tampão TE para reação de PCR ou RT-PCR.

Componentes e Armazenamento

Componente	CV-R017-50	CV-R017-200	Armazenamento
Coluna de purificação de ácidos nucleicos	50	200	Temperatura Ambiente
Solução de armazenamento de Protease K	1.1 ml	4.4 ml	-20°C
RNA de transporte	400 µl	1.6 ml	-20°C
Tampão REL	15 ml	60 ml	Temperatura Ambiente
Tampão WBR	60 ml	240 ml	Temperatura Ambiente
Tampão TE	5 ml	20 ml	Temperatura Ambiente
Manual	1	1	Temperatura Ambiente

Para uso exclusivo em pesquisa.

Armazenamento do Produto

1. A solução de armazenamento de Protease K e o RNA de transporte devem ser armazenados a -20°C.
2. Se outros reagentes e materiais forem armazenados à temperatura ambiente (15~25°C), seu desempenho pode ser mantido inalterado por dois anos; se o produto for armazenado entre 28°C, a vida útil do produto pode ser estendida para mais de dois anos.

Reagentes e Materiais Necessários

1. Etanol anidro
2. Tubo de centrífuga de 1,5 ml (tubo de centrífuga de 1,5 ml livre de DNase e RNase é recomendado)
3. Ponteiros de pipeta (para evitar a contaminação nas amostras, selecione ponteiros de pipeta livre de DNase e RNase com cartuchos de filtro)
4. Luvas descartáveis, equipamento de proteção e lenços
5. Centrífuga pequena de bancada (rotor com tubo de centrífuga de 1,5 ml e 2 ml)
6. Banho-maria e agitador vórtex.
7. Solução salina normal pode ser necessária

Preparação antes do uso

1. Se a centrífuga tiver função de refrigeração, ajuste a temperatura para 25°C.
2. Ajuste a temperatura do banho-maria para 56°C e incube o Tampão TE a 56°C.
3. Adicione etanol anidro ao Tampão WBR de acordo com as instruções na etiqueta do frasco de reagente e marque "etanol adicionado".
4. De acordo com o número de amostras de ácido nucleico a serem preparadas, calcule o volume de Tampão REL a ser usado (200 µl de Tampão REL / tubo). É sugerido aumentar a proporção de 25 µl de RNA de transporte por volume de Tampão REL de 1 ml, agite e misture por alguns segundos.

Preparo da Amostra

A. Plasma, soro, fluidos corporais livres, estoque viral, espécimes de urina, líquido cefalorraquidiano, fluido herpes, LCR e sobrenadante de cultura de células são absorvidos diretamente em 200 µl de espécimes para isolamento e purificação de ácido nucleico viral. Se o volume da amostra for inferior a 200 µl, adicione solução PBS para 200 µl.

- Tente isolar e purificar ácidos nucleicos virais de espécimes frescos isolados ou descongelados com não mais do que uma vez.

B. Solução de lavagem de swab faríngeo, solução de lavagem de trato genital, solução de enxágue bucal

Adicione 300 µl de solução de lavagem faríngea, solução de lavagem de trato genital e solução de enxágue bucal em um tubo de centrífuga de 1,5 ml, centrifugue a 12000 rpm por 5 minutos e pipete 200 µl do sobrenadante para o isolamento e purificação de ácido nucleico viral.

C. Lisado de tecido de vírus infectado:

Pegue 10 mg de tecido infectado pelo vírus para moagem em nitrogênio líquido, adicione 300 µl de solução PBS ao tecido moído e suspenda-o. Utilize 200 µl de suspensão de tecido para separar e purificar ácido nucleico viral.

D. Fezes

Pegue 1 ml de solução salina normal, adicione ao tubo de centrífuga de 1,5 ml, selecione cerca de 200 mg com um palito de dente esterilizado (200 µl se as fezes forem líquidas), adicione ao tubo de centrífuga de 1,5 ml, e agite até que as fezes estejam completamente dispersas. Centrifugue a 12000 rpm por 1 minuto, retire 200 µl do sobrenadante superior para o isolamento e purificação de ácido nucleico viral.

Passos Operacionais

1. Adicione 20 µl de solução de armazenamento de Protease K em um tubo de centrífuga de 1,5 ml, e em seguida, adicione 200 µl de amostra de fluido corporal.
 - Se a amostra de fluido corporal for inferior a 200 µl, adicione solução salina normal para fazer o volume final da amostra de fluido corporal 200 µl.
 - Não adicione Protease K diretamente ao Tampão REL.
2. Adicione 200 µl de Tampão REL contendo RNA de transporte e misture com vórtex por cerca de 15 segundos.
3. Coloque o tubo de centrífuga em um banho-maria a 56°C por 10 minutos.
4. Adicione 320 µl de etanol anidro e vire gentilmente a mistura 4 a 6 vezes para misturar bem.
 - Para evitar a contaminação cruzada entre as amostras ao abrir a tampa, centrifugue em baixa velocidade por vários segundos antes de abrir a tampa, para que a solução na tampa possa se depositar no fundo do tubo.
5. A solução do passo 4 foi adicionada à coluna de purificação de ácido nucleico (a coluna de purificação de ácido nucleico foi colocada em um tubo de centrífuga de 2 ml), coberta com a tampa do tubo e centrifugada a 12000 rpm por 30 segundos.
 - Tenha cuidado para não colar a solução na borda do bico da coluna purificada, caso os passos de lavagem subsequentes não possam limpar a coluna purificada.
6. Descarte o filtrado no tubo de centrífuga de 2 ml, coloque a coluna de purificação de ácido nucleico de volta no tubo de centrífuga de 2 ml, adicione 700 µl de Tampão WBR

na coluna de purificação de ácido nucleico, cubra o tubo e centrifugue a 12000 rpm por 30 segundos.

- O filtrado não precisa ser completamente descartado. Para evitar a contaminação da centrífuga pelo filtrado aderido ao bico do tubo de centrífuga, o tubo de centrífuga de 2 ml pode ser virado sobre uma toalha de papel uma vez.
 - Confirme se o etanol anidro foi adicionado ao Tampão WBR.
7. Descarte o filtrado no tubo de centrífuga de 2 ml, coloque a coluna de purificação de ácido nucleico de volta no tubo de centrífuga de 2 ml e centrifugue a 14000 rpm por 1 minuto.
 - Se a velocidade da centrífuga não puder atingir 14000 rpm, centrifugue na velocidade mais alta por 2 minutos.
 - Por favor, não omita este passo, ou o efeito subsequente da PCR pode ser afetado pela presença de etanol no ácido nucleico purificado.
 8. Descarte o tubo de centrífuga de 2 ml, coloque a coluna de purificação de ácido nucleico em um tubo de centrífuga de 1,5 ml limpo, adicione 50 µl de Tampão TE pré-aquecido a 56°C no centro da membrana da coluna purificada, cubra o tubo, deixe em temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugue a 12000 rpm por 30 segundos.
 - Se a centrífuga não tiver uma tampa à prova de vazamentos, por favor, altere a condição da centrífuga para 8000 rpm por 1 minuto, para evitar que a tampa do tubo se solte e danifique a centrífuga.
 9. Descarte a coluna purificada e armazene o ácido nucleico viral a -20°C para uso futuro.

Para uso exclusivo em pesquisa.