

废水沉淀物中病毒 RNA 的纯化

使用 Maxwell® RSC 仪器和 Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication 试剂盒从废水沉淀物中纯化病毒 RNA。

试剂盒: Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication 试剂盒 (目录号: AS1600)

分析: 用 RT-qPCR 检测 SARS-CoV-2 和 PMMoV RNA

样品类型: 用 PEG 8000 和 NaCl 沉淀法制备废水浓缩液

加入: 200µl 废水浓缩物

所需材料:

- PEG 8000 (目录号: V3011)
- NaCl (目录号: H5271)
- Maxwell®RSC 仪器 (目录号: AS4500)
- 加热块或水浴 (温度设为 56°C)
- 1.5ml 离心管

该操作流程由普洛麦格应用科学家开发, 且仅用于科研目的。

用户须自行确认操作流程是否适用于其应用场景。

如需获取更多信息, 请参见技术手册 TM473, 可通过下述网址获取:
www.promega.com/protocols
或通过 techserv@promega.com
联系技术服务部

操作流程:

用 PEG 8000/NaCl 沉淀法 1 制备废水浓缩物。

1. 将废水以 4000 x g 的转速离心 30 分钟以沉淀颗粒物。
2. 使用 0.2 µm 的过滤装置 (ThermoFisher, 目录号: 154-0020) 过滤澄清后的废水样品, 以除去细胞物质。
3. 每 40ml 废水, 加入 4g PEG 8000 和 0.9g NaCl。轻轻混合直至完全溶解。
4. 将样品以 11400 x g 转速离心 2 小时。

注意: 对离心管沉淀形成侧进行恰当标记, 这一点至关重要。形成的沉淀可能并非肉眼可见。

5. 使用血清移液管小心从离心管沉淀形成侧的相对侧移取液体, 以将管中液体去除。
6. 涡旋振荡使沉淀重悬于管中的剩余液体中。

废水浓缩物中病毒 RNA 的纯化。

7. 向 ≤ 200 µl 的废水浓缩物中加入 200 µl CTAB 和 40 µl 蛋白酶 K。涡旋振荡 10 秒。
8. 将样品置于 56°C 条件下孵育 10 分钟。
9. 将全部样品和 300 µl 裂解缓冲液加入至 Maxwell® RSC 试剂条 1 号孔中。将活塞置于 Maxwell® 8 号孔中, 并向所提供的洗脱管底部加入 50 µl 洗脱缓冲液。
10. 按照 Maxwell® RSC 仪器上随附的 PureFood GMO and Authentication 操作流程, 处理样品。

结果:

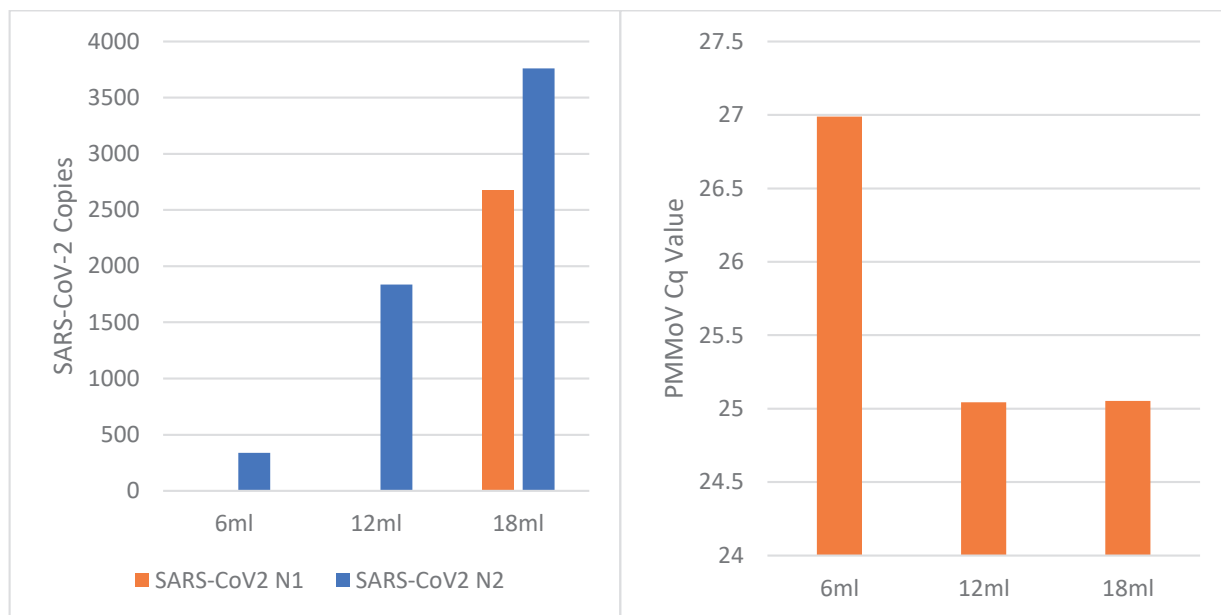


图 1. 从废水浓缩物提取的 RNA 中扩增辣椒轻斑驳病毒 (PMMoV) RNA 和 SARS-CoV-2 RNA。使用 PEG 8000/NaCl 沉淀法制备废水浓缩液并按照上述流程, 使用 Maxwell[®] RSC PureFood GMO and Authentication 试剂盒 (目录号: AS1600) 从浓缩物中纯化 RNA。我们使用原型 (prototype) RT-qPCR SARS-CoV-2 检测试剂盒检测了废水浓缩物中的 RNA 洗脱物。通过扩增 SARS-CoV-2 核衣壳基因的两个不同序列 N1 和 N2, 检测到了 SARS-CoV-2 RNA 的存在 (如左图所示)。通过合成的 SARS-CoV-2 RNA 对照 (Twist Bioscience, 目录号: 102024) 得到的标准曲线, 测定了 SARS-CoV-2 的拷贝数。原型检测包括可用于检测 PMMoV (存在于人类粪便中的植物病毒, 一般用作水质指标 2) 中 RNA 的对照品 (如右图所示)。从体积仅为 6ml 的废水中纯化所得的 RNA 中, 即可检测到 PMMoV, 而通过在相当于 18ml 废水的浓缩物中扩增 SARS-CoV-2 N1 和 N2 序列, 可检测到 SARS-CoV-2 并且检测结果可靠。

参考文献:

1. Wu, F.Q., *et al.*, (2020). SARS-CoV titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. medRxiv preprint posted 04-07-2020.
2. Kitajima, M., *et al.*, (2018). Pepper mild mottle virus as a water quality indicator. *npj Clean Water*. 1, 19.