

磁珠法病毒核酸纯化试剂盒说明书

产品组成

磁珠法病毒核酸纯化试剂盒	100 次
Cat. No.	4012100
Carrier RNA	310 µg×2
蛋白酶 K 贮存液	1.2 ml×2
Buffer VLM	60 ml
磁珠	1.2 ml
Buffer WBR (浓缩液)	30 ml×2
RNase-free Water	10 ml
说明书	1 份

产品储存

Carrier RNA 干粉和蛋白酶 K 贮存液可室温运输，收到后请置于 -20°C 贮存。其他试剂可常温（0~30°C）贮存，有效期为两年。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

产品介绍

本产品专为磁珠法核酸自动提取仪设计，适合从 200 µl 无细胞体液（包括血浆、血清、尿液、CSF 及细胞培养上清）、病毒原液和感染病毒的组织裂解液中提取各种病毒 RNA 或病毒 DNA。试剂盒提供的试剂可预先分装到 2.2 ml 的 96 深孔板，配合磁珠法核酸自动化提取仪，只需在装有 Buffer VLM 的孔中加入样本，即可由仪器自动化完成病毒核酸的释放、吸附、洗涤及洗脱等一系列过程，最后获得的核酸溶解在 RNase-free Water 中，并可立即用于 PCR 或 RT-PCR 反应。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇和去离子纯水
2. RNase-free 1.5 ml 离心管或 96 深孔板（2.2 ml），如果用户需要预分装好试剂的 96 深孔板及磁力套，请另购产品序号为 4012064 的预分装磁珠法病毒核酸纯化试剂盒
3. RNase-free 移液器及吸头（为避免样品间的污染，请选用含有滤芯的移液器吸头）
4. 一次性手套及防护用品和纸巾
5. 磁力架、水浴锅和旋涡振荡器或磁珠法核酸自动化提取仪

使用前准备

1. 每 1 管蛋白酶 K 贮存液全部加入到 1 管 Carrier RNA 干粉中，旋涡振荡直至 Carrier RNA 全部溶解。溶解有 Carrier RNA 的蛋白酶 K 贮存液请于 -20°C 贮存，可在 6 个月内不影响使用效果。
2. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WBR 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾做好“乙醇已加”的标记。
3. 手动法提取请将水浴锅温度设置到 60°C，并将 RNase-free Water 置于 60°C 温育。

操作步骤（自动化提取版）：

1. 按步骤 A~ E 在 96 孔板中预分装试剂：

- A. 按每 1 ml Buffer VLM 中加入 40 μ l 含 Carrier RNA 的蛋白酶 K 贮存液的用量预先混合好两种溶液，在 96 深孔板第 1 列和第 7 列每孔加入 500 μ l 含 Carrier RNA 和蛋白酶 K 的 Buffer VLM；
- B. 在 96 深孔板第 2 列和第 8 列每孔加入 800 μ l Buffer WBR；
- C. 在 96 深孔板第 3 列和第 9 列每孔加入 800 μ l Buffer WBR；
- D. 用力摇晃装有磁珠的冻存管，使缓冲液中的磁珠颗粒充分悬浮，在 96 深孔板第 4 列和第 10 列每孔先加入 40 μ l 磁珠后，再加入 260 μ l 纯水；
- E. 在 96 深孔板第 6 列和第 12 列每孔加入 80 μ l RNase-free Water；

！注意：试剂分装完成后，应立即进行病毒核酸的提取，否则 Buffer WBR 中的乙醇可能挥发，导致最终提取的核酸纯度降低。

2. 在已分装好试剂的 96 深孔板中的第 1 列和第 7 列各孔中加入 200 μ l 样本，将 96 深孔板放入核酸自动化提取仪中。

3. 按下表步骤设置核酸自动化提取仪中的程序：

步骤	孔位	液量 (μ L)	浸泡 (秒)	搅拌强度 (级)	搅拌时间 (秒)	下降吸磁 (秒)	液底吸磁 (秒)	吸磁次数 (次)	等待时间 (秒)	暂停 关/开	板1裂解 ($^{\circ}$ C)	板1洗脱 ($^{\circ}$ C)	板2裂解 ($^{\circ}$ C)	板2洗脱 ($^{\circ}$ C)
1~99	1~6	20~1200	0~255	1~6	0~9999	5~600	0~255	0~255	0~9999	0/1	0~125	0~125	0~125	0~125
1	4	300	0	1	0	30	3	1	0	0	0	0	0	0
2	1	700	0	6	600	30	3	2	0	0	70	0	70	0
3	2	800	0	6	180	30	3	1	0	0	0	0	0	0
4	3	800	0	6	180	30	3	1	600	0	0	0	0	0
5	6	80	0	5	180	30	10	2	0	0	0	85	0	85
6	1	700	0	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0

* 上述程序是根据本公司的核酸自动提取仪（Cat. No. Sim-300）设计，如果用于其他公司仪器，请根据仪器特点适当调整程序中的各个参数，或者拨打 400-0099-857 电话获取技术支持。

4. 仪器运行结束后取出 96 深孔板，收集转移第 6 列和第 12 列中的病毒核酸到 RNase-free 的离心管中；或直接用封口膜封住 96 深孔板，储存到 -70° C 以下备用。

操作步骤（手动提取版）

样本使用前处理

A 血浆、血清、无细胞体液、病毒样本保存液、病毒原液、尿标本、脑脊液、疱疹液、CSF 及细胞培养上清等样本，直接吸取 200 μ l 样本进行病毒核酸的分离纯化；如果样本体积不足 200 μ l，则补加 PBS 溶液至 200 μ l。

* 尽量采用新鲜分离的或者冻融不超过一次的样本进行病毒核酸的分离纯化。

B 咽拭子洗液、生殖道拭子洗液、漱口水

吸取 300 μ l 咽拭子洗液、生殖道拭子洗液、漱口水加入到 1.5 ml 离心管中，12000 rpm 离心 5 分钟，吸取 200 μ l 上清液进行病毒核酸的分离纯化。

C 感染病毒的组织裂解液：

取 10 mg 感染病毒的组织进行液氮研磨，研磨后的组织加入 300 μ l PBS 溶液悬浮，吸取 200 μ l 组织悬浮液进行病毒核酸的分离纯化。

D 粪便

在 1.5 ml 离心管中加入 1 ml 生理盐水，用灭菌的牙签挑取约 200 mg 左右（如果粪便呈液体状，直接吸取 200 μ l 粪便），加入到 1.5 ml 离心管中，旋涡振荡直至粪便完全分散开来。12000 rpm 离心 1 分钟，取 200 μ l 顶部上清液进行病毒核酸的分离纯化。

1. 吸取 20 μ l 溶解有 Carrier RNA 的蛋白酶 K 贮存液加入到 1.5 ml 离心管中，再加入 500 μ l Buffer VLM 和 200 μ l 样本。

* Carrier RNA 能有效提高痕量核酸的回收效率，并能保护后续纯化得到的 RNA 免受 RNase 的攻击。

2. 充分悬浮冻存管中的磁珠，然后吸取 40 μ l 磁珠到步骤 1 中的 1.5 ml 离心管中，旋涡振荡混合均匀，60°C 水浴 10 分钟。水浴期间每隔 2-3 分钟旋涡振荡数秒悬浮磁珠一次，促使核酸充分吸附到磁珠上。

3. 将 1.5 ml 离心管放入磁力架，静置片刻，待磁珠全部吸附到离心管管壁上，吸弃离心管中溶液，保留离心管管壁上的磁珠。

* 可低速离心数秒使 1.5 ml 离心管管盖上的残留液体汇集到离心管中后再放入磁力架。

4. 在离心管中加入 800 μ l Buffer WBR，旋涡振荡 30 秒混匀。将 1.5 ml 离心管放入磁力架，静置片刻，待磁珠全部吸附到离心管管壁上，吸弃离心管中溶液，保留离心管管壁上的磁珠。

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

* 可低速离心数秒使 1.5 ml 离心管管盖上的残留液体汇集到离心管中后再放入磁力架。

5. 重复步骤 4 一次。

6. 用 200 μ l 移液器仔细吸弃残留在离心管中的洗液，保留离心管管壁上的磁珠，室温静置 5-10 分钟晾干磁珠。

7. 在磁珠上加入 80 μ l 60°C 温育的 RNase-free Water，盖上管盖，旋涡振荡数秒，60°C 水浴 3 分钟。

* 延长 60°C 水浴时间至 10 分钟，期间每隔 2-3 分钟旋涡振荡数秒，能有效提高病毒核酸的洗脱效率。

8. 将 1.5 ml 离心管放入磁力架，静置片刻，待磁珠全部吸附到离心管管壁上。吸取上清中的病毒核酸溶液，转移到一个 RNase-free 的 1.5 ml 离心管中，获得的病毒核酸可立即用于 PCR 检测，或者将病毒核酸储存于 -70°C 以下备用。