

病毒核酸纯化试剂盒说明书

产品组成

病毒核酸纯化试剂盒	5 次样品	50 次制备
Cat. No.	4002005	4002050
核酸纯化柱	5 个	50 个
2 ml 离心管	5 个	50 个
蛋白酶 K 贮存液	120 μ l	1.2 ml
Carrier RNA	40 μ l	400 μ l
Buffer VL	1.5 ml	15 ml
Buffer WBR (浓缩液)	1.5ml	6.5ml \times 2
Buffer TE	0.5 ml	5 ml
说明书	1 份	1 份

产品储存

1. 蛋白酶 K 贮存液和 Carrier RNA 请置于-20 $^{\circ}$ C 贮存。
2. 其他试剂与物品如果储存于室温 (15~25 $^{\circ}$ C)，可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品贮存于 2~8 $^{\circ}$ C，可延长产品的有效期至两年以上。

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

本产品适合从血浆、全血、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中提取各种病毒 RNA 或病毒 DNA。用本试剂盒最高可从病毒拷贝数为 50copies/ml 的体液样品（DNA 病毒）中检测到病毒核酸。与传统的煮沸法提取病毒 DNA 相比，检测灵敏度可提高 10-50 倍；与传统 Trizol 法提取病毒 RNA 相比，检测灵敏度可提高 5-10 倍。被溶解的病毒中的核酸结合到纯化柱上后，Buffer WBR 洗涤去除残留在纯化柱上 PCR 抑制物，然后用 Buffer TE 洗脱，即可用于 PCR 或 RT-PCR 反应。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇
2. 1.5ml 离心管（推荐选用 DNase-free & RNase-free 的 1.5ml 离心管）
3. 移液器吸头（为避免样品间的污染，请选用含有滤芯的 DNase-free & RNase-free 移液器吸头）
4. 一次性手套及防护用品和纸巾
5. 台式小量离心机（可配离心 1.5ml 离心管和 2ml 离心管的转子）
6. 水浴锅与旋涡震荡器
7. 可能需要生理盐水

使用前准备

- 1) 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25 $^{\circ}$ C。
- 2) 将水浴锅温度设置到 56 $^{\circ}$ C，并将 Buffer TE 在 56 $^{\circ}$ C 温育。
- 3) 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作好“乙醇已加”的标记。
- 4) 根据所需要制备的核酸样本数计算需要使用的 Buffer VL 体积（200 μ l Buffer VL/管，注意由于加液过程可能存在误差，建议计算时增加 300~500 μ l Buffer VL 的体积），按每 1ml Buffer VL 体积加入 25 μ l Carrier RNA 的比例加入 Carrier RNA，旋涡振荡数秒混匀。

操作步骤

样本使用前处理

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

* 尽量采用新鲜分离的或者冻融不超过一次的标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、漱口液

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

C 感染病毒的组织的裂解液：

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 μl PBS 溶液悬浮，吸取 200 μl 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 1ml 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 μl 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 μl 顶部上清液进行病毒核酸的分离纯化。

1. 在 1.5 ml 离心管中加入 20 μl 蛋白酶 K 贮存液，再加入 200 μl 体液样品。

* 如果体液样品少于 200 μl ，补加生理盐水使体液样品终体积为 200 μl 。

* 不要将蛋白酶 K 直接加入到 Buffer VL 中。

2. 加入 200 μl 含 Carrier RNA 的 Buffer VL，旋涡振荡约 15 秒混匀。

3. 将离心管置于 56°C 水浴 10 分钟。

4. 加入 320 μl 无水乙醇，温和地翻转 4~6 次混合均匀。

* 为避免打开管盖时样品间的交叉污染，开盖前可低速离心数秒，使管盖上的溶液沉降到管底。

5. 吸取步骤 4 中的溶液加入到核酸纯化柱中（核酸纯化柱置于 2ml 离心管中），盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 注意不要将溶液沾到纯化柱管口的边缘上，以免后续的洗涤步骤不能洗净纯化柱。

6. 弃 2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 700 μl Buffer WBR，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 滤液无需彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将 2ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

7. 弃 2ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2ml 离心管中，14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的 PCR 效果。

8. 弃 2ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个洁净的 1.5 ml 离心管中，在纯化柱的膜中央加入 50 μl 56°C 预热的 Buffer TE，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

9. 弃纯化柱，将病毒核酸储存于 -20°C 备用。