

96 体液病毒 DNA/RNA 纯化试剂盒

本试剂盒采用独特的裂解和蛋白酶 K 消化技术, 结合制备膜选择性地吸附 DNA/RNA 的方法达到快速纯化 96 个样本的病毒 DNA/RNA 的目的。适合于从 200 μ l 体液(包括血浆, 血清, 腹水, 培养细胞上清液, 脑脊髓液, 尿液, 脱落细胞悬浮液等)中提取高纯度的病毒 DNA/RNA, 用于 PCR/RT-PCR、测序、体外转录与翻译、限制性内切酶消化、细菌转化等分子生物学实验。

一、试剂盒组成、贮存、稳定性

Cat. No.	AP-96-BF-VNA-1	AP-96-BF-VNA-4	AP-96-BF-VNA-12
Kit size	1 \times 96	4 \times 96	12 \times 96
96-well 1.6 ml growblock	2	8	24
96-well VNA plate	1	4	12
96-well V-bottom sample plate	1	4	12
silicone mat	1	4	12
Adhesive film	5	20	60
Proteinase K	33 mg	135 mg	382.5 mg
PK Buffer	2.2 ml	9 ml	25.5 ml
Buffer AVL	22 ml	85 ml	255 ml
Buffer W1A	32 ml	144 ml	2 \times 192 ml
Buffer W2 concentrate	48 ml	3 \times 54 ml	-
10 \times Buffer W2 concentrate	-	-	48 ml
Buffer W2 bottle (empty)			1
Buffer TE (nuclease-free)	7 ml	30 ml	80 ml
Protocol Manual	1	1	1

Proteinase K: 冻干的蛋白酶K可室温贮存6个月, 长时间保存请置于4 $^{\circ}$ C; 溶解后, 在2-8 $^{\circ}$ C可贮存2个月, 长时间保存请勿置于室温中。

PK Buffer: 蛋白酶K溶解液, 室温密闭贮存。

Buffer AVL: 病毒裂解液, 4 $^{\circ}$ C贮存。

Buffer W1A: 洗涤液, 使用前, 按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇(可用 100%乙醇或 95%乙醇), 混合均匀, 室温密闭贮存。

Buffer W2 concentrate: 去盐液。使用前, 按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇(可用 100%乙醇或 95%乙醇), 混合均匀, 室温密闭贮存。

Buffer TE (nuclease-free): 洗脱液。无 DNA/RNA 酶活性。

10 \times Buffer W2 concentrate (仅用于 AP- 96-BF-VNA-12): 用于配制 Buffer W2。

96-well VNA plate: 96 孔制备板。

二、注意事项

1. 病毒具有很强的感染能力, 操作前必须准备好各种防御措施。
2. 操作时严格按操作步骤进行, 废物必须放入含消毒液的废物缸, 以免污染实验室和工作人员。
3. 为避免其它核酸的污染而出现假阳性, 必须使用不含 DNA 和 RNA 的离心管、吸管、Tip 头、试剂和

手套，工作人员戴口罩进行操作。

4. Buffer AVL 和 Buffer W1A 含刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套和眼镜，避免沾染皮肤、眼睛和衣服，谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛，要立即用大量清水或生理盐水冲洗，必要时寻求医疗咨询。

三、实验准备

1. 第一次使用时，在 Buffer W1A 、 Buffer W2 concentrate 和 10×Buffer W2 concentrate 中按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
2. 准备异丙醇（含 1%冰乙酸）：在 99 ml 异丙醇中加 1 ml 冰乙酸，混合均匀，室温密闭贮存。
3. 准备 56℃水浴。
4. 如果提取的是病毒 RNA，请选用 RNase free Tip 头和 1.5 ml 离心管或将 Tip 头和 1.5 ml 离心管用 0.1% DEPC 水处理后再使用，以避免纯化过程中病毒 RNA 被 RNase 降解。纯化病毒 RNA 时，建议在洗脱液中加入 RNasin。
5. 磷酸盐缓冲液（PBS）：将 8 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g Na₂HPO₄ 和 0.24 g KH₂PO₄ 溶于 800ml 去离子水中，用 HCl 调节 pH 至 7.4。用去离子水定容至 1L 备用。

四、操作步骤

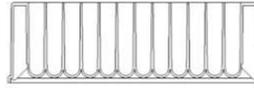
1. 向 96 孔 1.6 ml 深孔板（试剂盒内提供）的每孔中加 20 μl Proteinase K。
2. 每孔加入 200 μl 样品。
 - * 如果样品不足 200 μl，可补加 PBS 至 200 μl。
3. 每孔加 200 μl Buffer AVL，注意不要打湿每孔的边缘，用硅胶片密封各孔。
4. 悬浮振荡 30 秒。3,000 rpm 简短离心使硅胶片上的溶液到 96 孔 1.6 ml 深孔板中，置 56℃水浴 10 分钟。
5. 3,000 rpm 简短离心使硅胶片上的溶液到 96 孔 1.6 ml 深孔板中，取下硅胶片。
6. 每孔加 250 μl 异丙醇（含 1%冰乙酸），再用硅胶片封上 96 孔 1.6 ml 深孔板，悬浮振荡 15 秒，启动离心机，当速度达到 3,000 rpm 后即停止。
7. 将 96 孔制备板放置在一新的 96 孔 1.6 ml 深孔板上。弃硅胶片，将步骤 6 的混合液移至 96 孔制备板中，用不干胶片封住 96 孔制备板，6,000 rpm 离心 1 分钟。
8. 弃废液，将 96 孔制备板重新放置在 96 孔 1.6 ml 深孔板上，在每孔中加 500 μl Buffer W1A，用新不干胶片封住 96 孔制备板，6,000 rpm 离心 1 分钟。
 - * 确认在 Buffer W1A concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。
9. 弃废液，将 96 孔制备板重新放置在 96 孔 1.6 ml 深孔板上，在每孔中加 700 μl Buffer W2，用新不干胶片封住 96 孔制备板，6,000 rpm 离心 1 分钟。以同样的方法用 500 μl Buffer W2 再洗涤一次。
 - * 确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上的指定体积加入无水乙醇。
 - * 两次用 Buffer W2 冲洗能确保盐分被完全清除，消除对 PCR 反应的影响。
9. 弃废液，将 96 孔制备板重新放置在 96 孔 1.6 ml 深孔板上，用新不干胶片封住 96 孔制备板，6,000 rpm 离心 2 分钟。

10. 将 96 孔制备板放置在 96 孔 V 型底板（试剂盒内提供）上。取 50 μl Buffer TE（nuclease-free）或去离子水加在每孔的膜中央，室温静置 2 分钟，6,000 rpm 离心 2 分钟。

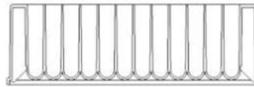
* 将 Buffer TE 或去离子水加热至 65 $^{\circ}\text{C}$ 将提高洗脱效率。

五、流程图

加 20 μl Proteinase K
加 200 μl 样品



加 200 μl Buffer AVL

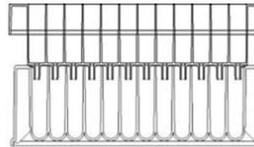


裂解

56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 分钟



加 250 μl 异丙醇（含 1%冰乙酸）
加 500 μl W1A
加 700 μl W2
加 500 μl W2

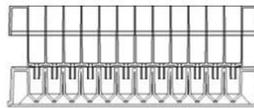


结合

洗涤



加 50 μl Buffer TE (nuclease-free) 或
去离子水



洗脱