

AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量试剂盒(磁珠法)

本试剂盒采用磁珠吸附 DNA/RNA 的方法达到快速纯化病毒 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、Real-time PCR/Real-time RT-PCR 等分子生物学实验。

一、试剂盒组成、贮存、稳定性

Cat. No.	MAG-BF- VNA-12	MAG-BF- VNA-48	MAG-BF-VNA-192
Kit size	12 preps	48 preps	192 preps
Buffer BV-L	3 ml	11 ml	44 ml
PK Buffer	300 μ l	1.1 ml	4.4 ml
Proteinase K	4.5mg	16.5 mg	66 mg
1.5 ml Microfuge tube	24	96	384
Beads	7 ml	26.5 ml	106 ml
Buffer W1A	4.8 ml	24 ml	60 ml
Buffer W2 concentrate	4.5 ml	18 ml	72 ml
Buffer TE (nuclease-free)	1 ml	4ml	15 ml
Protocol Manual	1	1	1

Buffer BV-L: 病毒裂解液, 室温密闭贮存。

Beads: 磁珠, 4 $^{\circ}$ C 密闭贮存。

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: Proteinase K 溶解液, 室温密闭贮存。

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, 室温密闭贮存。

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. 如果裂解液 Buffer BV-L 出现浑浊或者沉淀, 将其置于 37-56 $^{\circ}$ C 孵育至澄清。
5. Buffer BV-L 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** 和 **Buffer W2 concentrate** 中按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
2. 根据瓶上标签将 **Proteinase K** 溶解于 **PK Buffer** 中，请勿旋涡振荡。
3. 准备异丙醇。
4. 准备 56°C 水浴。
5. 磁力架。
6. 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**。
7. 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

以下操作步骤是从 200 μl 血清中提取病毒 DNA/病毒 RNA 为例设计的，从其他体积的样品中提取病毒核酸可按比例加 **Buffer BV-L** 和异丙醇，后续步骤中的 **Buffer** 用量不变。

1. 在 1.5 ml 离心管中加 20 μl **Proteinase K**。
2. 加 200 μl 样品。
 - * 如果样品不足 200 μl, 补加 **PBS** 至 200 μl。
3. 加 200 μl **Buffer BV-L**，漩涡振荡混合均匀，56°C 水浴 10 分钟。
4. 加 500 μl 磁珠溶液于一新的 1.5ml 离心管中，将离心管置于磁力架上静置 30 秒，直至磁珠全部吸附至管壁，吸弃管内液体，移去磁力架，离心管内磁珠待用。
 - * 在将磁珠溶液加入离心管前，请将其充分混匀，但勿剧烈振动和搅拌磁珠溶液。
5. 将步骤 3 中的溶液加入有磁珠的离心管内，然后加入 500 μl 异丙醇，上下颠倒 5-8 次，混合均匀。
6. 静置 10 分钟，每隔 2 分钟上下颠倒离心管 4-6 次，使管内磁珠分布均匀。
7. 将离心管置于磁力架上，静置至磁珠全部吸附至管壁，吸弃管内液体。
 - * 注意勿将磁珠吸出。
8. 移去磁力架，加入 500 μl **Buffer W1A**，用移液器吸头轻柔吹打管壁磁珠，直至分布均匀。
 - * 确认在 **Buffer W1A concentrate** 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
9. 将离心管置于磁力架上，静置至磁珠全部吸附至管壁，吸弃管内液体。
 - * 注意勿将磁珠吸出。
10. 移去磁力架，加入 700 μl **Buffer W2**，用移液器吸头轻柔吹打管壁磁珠，直至分布均匀。
 - * 确认在 **Buffer W2 concentrate** 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。

11. 将离心管置于磁力架上，静置至磁珠全部吸附至管壁，吸弃管内液体。
 - * 注意勿将磁珠吸出。
12. 可选步骤：将离心管置于磁力架上，加入 400 μ l Buffer W2，静置至磁珠全部吸附至管壁，吸弃管内液体。
 - * 确认在 Buffer W2 concentrate 中已按试剂瓶上指定的体积加入无水乙醇。
 - * 注意在磁力架上操作，勿从磁力架上取出离心管。
 - * 注意勿将磁珠吸出。
 - * 请务必吸尽离心管内残留的液体。
13. 打开管盖，让磁珠在安全柜中干燥 2 分钟。
 - * 注意在磁力架上操作，勿从磁力架上取出离心管。
 - * 此步骤建议在安全柜中操作。
14. 移去磁力架，加入 50 μ l Buffer TE (nuclease-free) 或去离子水，用移液器吸头轻柔吹打管壁磁珠，直至分布均匀，静置 2 分钟。
15. 将离心管置于磁力架上，静置至磁珠全部吸附至管壁，吸取上清至一新的离心管中（不提供），即得到病毒 DNA/RNA。

五、流程图

取 500 μ l 磁珠

加 20 μ l proteinase K
加 200 μ l 样品
加 200 μ l Buffer BV-L
56°C 水浴 10 分钟
加 500 μ l 异丙醇

加 500 μ l W1A
加 700 μ l W2
加 400 μ l W2

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

