

病毒核酸提取试剂盒
（磁珠法）
说明书

货号：1506730

版本：A/0

仅供研究用

湖州申科生物技术股份有限公司

■ 试剂盒简介

SHENTEK®病毒核酸提取试剂盒适用于 10^7 及以下细胞基质中 DNA 病毒、RNA 病毒的核酸提取，又适用于病毒收获液（上清液）的核酸提取。本试剂盒搭配 rHCDpurify® 可实现样品的自动处理，操作方便快捷。

细胞基质下的提取方法根据病毒复制场所的不同，将提取方法分为两类：① 复制过程发生在宿主细胞核的病毒及逆转录病毒科病毒，如：RCL/RCR 和大多数的 DNA 病毒（rcAAV/rAAV），采取细胞裂解后全提的方式可降低漏检的风险；② 对于复制过程只发生在宿主细胞质的病毒，如：大多数的 RNA 病毒，采用细胞裂解后离心取上清液提取的方法即可达到检测目的。其中方法①也适用于对样品中未知外源病毒因子的核酸提取，降低漏检的风险。

■ 试剂盒组分

表 1.试剂盒组分

序号	组分	产品号	装量	储存条件
I	洗涤液 A	NND015	15 mL × 1 瓶	室温
	结合液	NND017	10 mL × 1 瓶	室温
	蛋白酶 K 缓冲液	NND025	5 mL × 1 瓶	室温
II	磁珠	NND030	750 μ L × 2 管	2-8°C
	5M NaCl	NND040	500 μ L × 1 管	2-8°C
	样品处理液	NND002	1.25 mL × 2 管	2-8°C
III	助沉剂 I	NND003	25 μ L × 1 管	-18°C及以下
	RNase-Free H ₂ O	NND008	1.2 mL × 6 管	-18°C及以下
	蛋白酶 K	NND023	500 μ L × 5 管	-18°C及以下

■ 规格

50 Extractions。

■ 有效期

规定储存条件下 24 个月，具体详见试剂盒标签。

■ 实验所需但试剂盒中未含材料

- 无水乙醇（分析纯）
- 100%异丙醇（分析纯）
- 1.5 mL 低吸附离心管

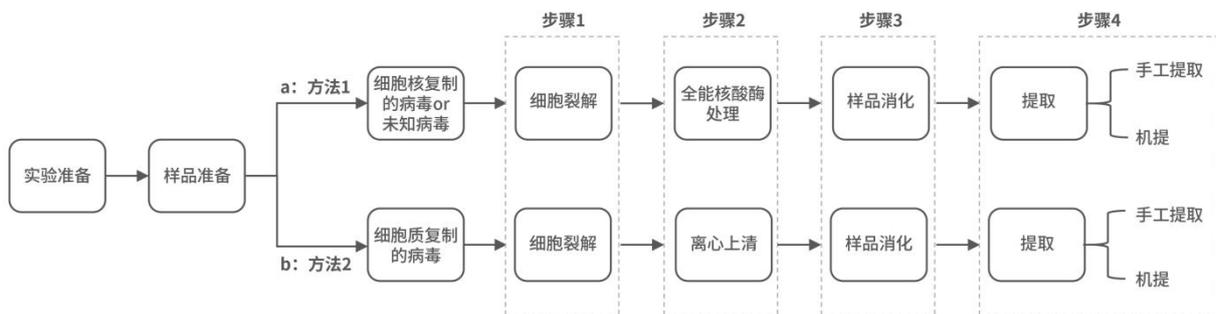
- 全能核酸酶及其缓冲液（或 100 mM MgCl₂）
- RNA 酶抑制剂
- DEPC 水（针对 RNA 病毒）

■ 相关设备

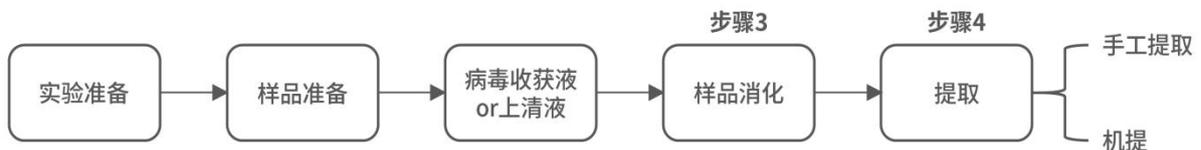
- 迷你离心机
- 磁性分离架或 rDNApurify®HCD 前处理系统
- 涡旋震荡器
- 恒温金属浴或水浴
- 1000 μL, 100 μL, 10 μL 移液器
- 超净台或生物安全柜
- 高速离心机

■ 操作流程

（一）细胞基质下病毒核酸的提取流程



（二）病毒收获液（上清液）的核酸提取流程



■ 实验准备

使用试剂盒前需完成以下工作：

- 在新开启的洗涤液 A 中加入 20 mL 的无水乙醇。
- 在干净的试剂瓶中用无水乙醇和灭菌超纯水或 DEPC 水（针对 RNA 病毒）配制 70%乙醇溶液 35 mL，标记为洗涤液 B。配制后的洗涤液应密封，防止乙醇挥发，室温

保存。

- 准备好 100% 的异丙醇。
- 若发现结合液或蛋白酶 K 缓冲液出现结晶或沉淀, 应 37 °C 水浴, 待沉淀完全溶解后, 震荡混匀再用。
- 准备好 2 个金属浴或水浴温度, 37 °C 和 55 °C (手工提取还需再准备一个 70 °C 金属浴或水浴)。
- 根据样品数量取适量助沉剂 I 用 RNase-Free H₂O 稀释 100 倍配成工作液备用。

■ 样品准备

- 样品平行处理: 为了确保结果的准确性, 建议每个样品平行进行两次提取和检测。
- 阴性对照 (NCS): 每次实验中都需要设置一个 NCS 作为空白样品, NCS 与其他待测样品一起进行处理, 以检验在样品处理过程中是否存在交叉污染或环境污染。
- 若为细胞基质样品需先对细胞进行计数, 细胞总数不可超过 10⁷。
- 若样品为 RNA 病毒或未知病毒需在待测样品中加入终浓度为 1 U/μL 的 RNA 酶抑制剂, 涡旋震荡 10 s, 快速离心 3-5 s 后备用。
- rDNApurify®HCD 前处理系统要求样品体积不超过 300 μL。

■ 操作过程

(一) 细胞基质下病毒核酸的提取

1. 细胞裂解

在待测样品 (10⁷ 细胞及以下) 中加入 1/10 液体体积的样品处理液, 涡旋震荡 10 s, 快速离心 3-5 s, 室温裂解 5 min。

a. 方法 1 (针对细胞核复制的病毒或未知病毒)

2a. 全能核酸酶处理

加入总量为 100 U 的全能核酸酶及其缓冲液 (也可用 100 mM MgCl₂ 代替缓冲液, 此时 MgCl₂ 的终浓度为 2 mM 左右), 涡旋震荡 10 s, 快速离心 3-5 s, 37 °C 处理 30 min。

b. 方法 2 (针对细胞质复制的病毒)

2b. 离心取上清

450 g 离心 30 min, 弃细胞沉淀取上清进行下一步核酸提取。

2. 样品消化

➤ 加入 100 μL 的蛋白酶 K 缓冲液和 50 μL 蛋白酶 K, 涡旋震荡 10 s, 快速离心 3-5 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。加入 10 μL 的 5 M NaCl 和 10 μL 的助沉剂 I 工作液 (即配即用) 涡旋震荡 10 s, 快速离心 3-5 s。

✚ 助沉剂 I 工作液为助沉剂 I 原液用 RNase-Free H_2O 稀释 100 倍所得。

✚ 此步骤结束后可根据实际情况选择机提或手提, 其中 rDNApurify®HCD 前处理系统要求以上待提取的液体体积不超过 500 μL 。

3. 手工提取

(1) 结合

1) 将磁珠置于室温环境下 10 min, 振荡混匀。

✚ 磁珠可以根据实验量提前进行分装, 避免环境温度反复导致结合能力降低。

2) 从水浴中取出样品, 快速离心 30 s, 加入 200 μL 结合液, 振荡混匀。

3) 快速离心 10 s 后在样品混合物中分别加入 200 μL 异丙醇, 30 μL 磁珠。

✚ 如果样品较多, 每次加入磁珠过程中应再次充分振荡磁珠混匀, 以保证每次加入的磁珠量的一致性。

4) 将装有全部混合物的离心管置于漩涡振荡器上涡旋震荡 1 min, 快速离心 3-5 s, 此步骤重复 4-5 次。静置于磁性分离架上。

5) 待溶液澄清, 磁珠完全分离后, 用枪头小心移去上清。

✚ 等待磁珠完全分离的时间约为 3-5 min。

✚ 去除上清时枪头避免搅动磁珠, 避免磁珠同上清一起被去除。

(2) 洗涤

1) 从磁性分离架上取下含有磁珠的离心管, 加入 700 μL 洗涤液 A, 振荡 10 s 使磁珠和洗涤液 A 混匀; 快速离心 10 s 后, 将离心管重置于磁性分离架上。待溶液澄清, 磁珠完全分离后, 用枪头移去上清液, 完成第 1 次磁珠洗涤。

2) 从磁性分离架上取下含有磁珠的离心管, 加入 700 μL 洗涤液 B, 振荡 40 s 使磁珠和洗涤液 B 混匀; 快速离心 10 s 后, 将离心管重置于磁性分离架上。待溶液澄清, 磁珠完全分离后, 用枪头移去上清液, 完成第 2 次磁珠洗涤。

3) 为保证液体充分移除, 可将离心管再次快速离心 10 s, 置于磁性分离架上, 待磁珠完全分离后, 用 10 μL 枪头小心的将残余液体吸除干净。

 去除上清时枪头避免搅动磁珠，避免磁珠同上清一起被去除。

4) 从磁性分离架上取下离心管，打开管盖在室温下干燥 3 min，除去残留的乙醇。

 干燥时间依具体情况而定，室温较高或空气干燥的环境下可以选择较短干燥时间；而室温较低或空气湿润环境下，干燥时间可以稍长。

(3) 洗脱

1) 沿离心管壁加入 50-100 μL 预热的洗脱液 RNase-Free H_2O ，用漩涡振荡器轻微振荡 5 s 使磁珠和洗脱液 RNase-Free H_2O 混匀，70 $^\circ\text{C}$ 水浴 7 min，水浴过程中可再次振荡混匀 2-3 次。

 振荡后需将残留于管壁上的磁珠和洗脱液轻甩至管底。

 振荡至管盖上的磁珠和洗脱液需快速离心后重新振荡混匀。

2) 孵育完成后，将离心管快速离心 1 min，然后静置于磁性分离架上，待磁珠分离后，用枪头小心转移溶液到干净的离心管中。

3) 将上一步获得的离心管快速离心 10 s，然后静置于磁性分离架上，待磁珠分离后，用枪头再次转移溶液到干净离心管，所得即为样品纯化液。

 收集洗脱液时，应将离心管内溶液转移完全，离心管内不得残留液体，否则将影响样品检测的准确性。

注意要点

➤ 建议将实验室内部进行分区，分为阴性区（PCR 试剂的配制）、阳性区（样品操作）、扩增区等，做好明显的标识。每个区域配备独立的设备、试剂及耗材，不得交叉使用。实验试剂、待测样品、PCR 产物应分开存放，不应放于同处。减少在实验区内不必要的走动，以降低污染发生概率。

➤ 装有试剂的离心管在打开之前应先瞬时离心，将管壁及管盖上的液体离至管底，降低污染手套或移液枪的风险；谨慎开关反应管，防止管内液体溅出或形成气溶胶导致污染。

➤ 实验开始前确保实验室环境温度不低于 22 $^\circ\text{C}$ 。

➤ 在磁性分离架上分离磁珠时，过程中可缓慢旋转离心管，加速磁珠聚集。

➤ DNA 洗涤和洗脱操作时，每次振荡混匀后，都应该瞬时离心，以保证没有磁珠或液体附着于离心管盖或管壁上。

➤ 在去除乙醇干燥时，观察磁珠状态，勿让磁珠太干，以免洗脱时不完全溶解。请尽量在完成样品纯化处理当天进行后续的 DNA 检测，以保证检测结果的准确性。

4. 机提的方法:

(1) 按照表 2 在 96 深孔板排布预先加入相应溶液, 其中:

第 1 或 7 列: 结合液 200 μL /孔, 异丙醇 200 μL /孔以及步骤 3 的全部样品

第 2 或 8 列: 洗涤液 A 700 μL /孔

第 3 或 9 列: 洗涤液 B 700 μL /孔

第 4 或 10 列: 磁珠 30 μL /孔

第 5 或 11 列: 洗脱液 RNase-Free H_2O 50-100 μL /孔

 磁珠使用前先置于室温环境下 10 min, 振荡混匀。

 磁珠可以根据实验量提前进行分装, 避免环境温度反复导致结合能力降低。

 步骤 5 的样品可在其他试剂全部加完后再加。样品体积最大为 500 μL /孔。

(2) 程序启动

1) 电源键打开—点击“登录”输入账号及密码—进入主界面。

2) 75%酒精棉球擦拭仪器内壁—点击“紫外灯”—选择“15 min”灭菌。

 此步骤可在提取准备操作之前进行。

3) 将加好样的 96 深孔板放入仪器中固定位置, 并把塑料套管插入磁头对应位置。

4) 点击“运行”—选择“Virus-730”程序。

程序结束, 发出“滴滴”声, 立即取出深孔板, 将样品纯化液全部转移到新的离心管内。

注意要点:

- 实验开始前确保实验室环境温度不低于 22 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 程序启动前, 检查 96 深孔板和套管是否固定好。
- 仪器工作前及完成后需要紫外灭菌至少 15 min, 并使用 75%酒精棉球将仪器内壁擦拭干净。且两次提取实验间隔至少为 30 min。
- 程序运行完毕后, 需立即取出 96 深孔板并将洗脱液转移至新的离心管。
- 建议完成样品纯化处理当天进行后续的 qPCR 检测, 确保检测结果准确。

表 2.96 深孔板排布

第一组						第二组					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S1											
S2											
S3											
S4											
S5											
S6											
S7											
S8						NCS					
结合液 + 异丙醇	洗涤液 A	洗涤液 B	磁珠	洗脱液 RNase-Free H ₂ O	/	结合液 + 异丙醇	洗涤液 A	洗涤液 B	磁珠	洗脱液 RNase-Free H ₂ O	/
样品						样品					

(二) 病毒收获液（上清液）的核酸提取

操作步骤同以上步骤 3—步骤 4，可根据实际进行核酸酶处理以去除无蛋白衣壳保护的核酸片段。

生效日期: 2023 年 03 月 29 日

服务支持



湖州申科生物技术股份有限公司

www.shenkebio.com

地址: 浙江省湖州市红丰路 1366 号 6 号楼

Email: Info@shenkebio.com

电话: 0572-2165910