

病毒基因组DNA提取试剂盒 (离心柱型)

用于快速提取各种病毒基因组DNA

目录号: SG111 (50次) SG112 (100次)

使用手册

2011年6月, 第3版


 北京三博远志生物技术有限责任公司
Beijing Sunbiotech Co. , Ltd

地 址: 北京海淀区东北旺南路 26 号

电 话: 010-62961251 62976446 传真: 010-62961251

网 址: 阳光生物网 <http://www.sunbiotech.com.cn>

Email: market@sunbiotech.com.cn

 北京三博远志生物技术有限责任公司
Beijing Sunbiotech Co. , Ltd

一、试剂盒组成、储存、稳定性

试剂盒组成	保存	50 次 (SG111)	100 次 (SG112)
溶液 P	室温	40ml	80 ml
缓冲液 SL	室温	11 ml	22 ml
结合液 SB	室温	12 ml	24ml
漂洗液 PW	室温	15 ml	15mlX2
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
洗脱缓冲液 EB	室温	10 ml	20 ml
蛋白酶 K (20mg/ml)	-20℃	1ml	2ml
吸附柱	室温	50 个	100 个
收集管 (2ml)	室温	50 个	100 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

注意事项

- 第一次使用前请先在漂洗液 PW 中加入 4 倍体积无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框打钩标记已加入乙醇，以免再次加入！
- 结合液 SB 低温时可能出现析出和沉淀，可以在热水中温浴几分钟帮助重新溶解，恢复澄清透明后冷却到室温即可使用。
- 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

六、疑难解答 (Trouble shooting)

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
DNA 产量低	蛋白酶 K 失效了	收到蛋白酶 K 后，按照每次使用量分装冻存，避免反复冻融。
	裂解不完全或者和无水乙醇没有充分混匀	延长蛋白酶 K 消化时间。 加入无水乙醇后应该和裂解物充分混匀后再加入吸附柱。
未提取到 DNA	漂洗液 PW 中忘记加无水乙醇	第一次实验时，在漂洗液 PW 中加入指定量无水乙醇。
洗脱下来的 DNA 产量低	离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎重沾有乙醇	确保做了步骤 10，否则残留乙醇会影响洗脱效率。
	使用了非最佳液体代替洗脱缓冲液	使用洗脱缓冲液 EB 或 pH 在 8.0-8.5 之间的去离子水洗脱。
A ₂₆₀ 吸光值异常偏高	一些硅基质膜成分一起洗脱下来，干扰了吸光值	将洗脱的基因组 DNA 溶液 12，000rpm 再离心一分钟，小心取上清使用。
DNA 下游酶切不能切开或者酶切不完全	一些硅基质膜成分一起洗脱下来，抑制了酶切反应	将洗脱的基因组 DNA 溶液 13，000rpm 再离心一分钟，小心取上清使用。
	离心柱残留有较多乙醇或者底部不慎沾有乙醇抑制了酶切反应	确保做了步骤 11，然后空气中晾几分钟，让残留乙醇挥发。

二、原理简介

本试剂盒采用可以特异性结合 DNA 的离心吸附柱和独特的缓冲液系统，用于血清、血浆、脑脊液、尿液、粪便、培养细胞上清液等无细胞材料等样品中提取病毒 DNA，冷冻样品不要反复冻融。所得基因组 DNA 可直接用于 PCR、酶切等下游试验。

对于拭子样品：将一个拭子放入离心管中，加入 750 μ l 自备的生理盐水即可。

三、试剂盒特点

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。
2. 不需要使用有毒的苯酚等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
3. 快速，简捷，单个样品一小时内可获得高纯基因组 DNA。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.7~1.9 之间，长度可达 50kb-150kb，可直接用于 PCR，Southern-blot 和各种酶切反应。

四、注意事项（实验前必须首先阅读这部分！）

1. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到13,000 rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. 实验前将需要的水浴先预热到 58℃ 备用。
3. 结合液 SB 中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，**避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**

五、操作步骤

*** 第一次使用前请先在漂洗液 PW 中加入 4 倍体积的无水乙醇！**

1. 取 750 μ l 上清液（病毒）移至一个新的 EP 管中，加入等体积预冷的溶液 P，反复颠倒数次室温放置 30min。12,000rpm，离心 5min，尽可能弃上清（弃上清后再离 1min，再弃上清）。

对于拭子样品：将一个拭子放入离心管中，加入 750 μ l 自备的生理盐水即可。

2. 向病毒颗粒沉淀中加入 200 μ l 缓冲液 SL，立即震荡混匀；
3. **可选做步骤：**如需要去除 RNA，可以加入 4 μ l RNase A(10mg/ml) 溶液，振荡混匀，室温放置 5-10 分钟。
4. 加入 20 μ l 蛋白酶 K (20mg/ml) 溶液，混匀，58℃ 放置 1 小时。
5. 加入 220 μ l 结合液 SB，立刻上下快速颠倒充分混匀，58℃ 放置 10 分钟。
6. 冷却后加入 220 μ l 无水乙醇，颠倒混匀充分。

如基因组 DNA 含量较高此时可能会出现絮状沉淀。

7. 将所得溶液和絮状沉淀都加入一个吸附柱中，（吸附柱放入收集管中）12,000 rpm 离心 30 秒，倒掉收集管中的废液。

上述各步骤中适当力度充分混匀非常重要，混匀不充分严重降低产量。

8. 加入 700 μ l 漂洗液 PW **（请先检查是否已加入无水乙醇！）**，12,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
9. 加入 500 μ l 漂洗液 PW，12,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
10. 再将吸附柱放回空收集管中，12,000 rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
11. 取出吸附柱，放入一个干净的 1.5ml 离心管中，在吸附膜的中间部位加 50-200 μ l 洗脱缓冲液 EB，58℃ 温浴 3-5 分钟，12,000 rpm 离

心 1 分钟，所得基因组 DNA 放置在-20℃保存。

洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要 DNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积不应少于 50μl，体积过小降低 DNA 洗脱效率，减少 DNA 产量。

小知识： 提取液体样品/病毒核酸(RNA 或DNA)为何很难？

原因主要是量少。病毒颗粒中的 RNA 或 DNA 是作为遗传物质保存，每个病毒最多只携带几个拷贝(而一个细胞中有上万种 RNA 分子，每种 RNA 有很多拷贝)，同时其长度也十分有限(一般不到细胞基因组的万分之一)，样品中病毒数往往又不是很多，使得样品中病毒核酸的绝对量往往比一个细胞中核酸的绝对量还少，所以操作中十分容易丢失。

由于得到的核酸绝对量很少，有时使用电泳和测 OD 值都看不到，所以要通过 PCR 或 RT-PCR 检测。

而 PCR 或 RT-PCR 的条件又需要优化，所以要确定提取是否成功也十分不容易。