

【产品名称】

通用名称：核酸提取或纯化试剂 商用名称：柱法病原总核酸提取试剂盒

【包装规格】

50 人份/盒 (货号 IVD4179)

【预期用途】

本产品适合从低细胞含量的临床样本中提取病毒总核酸，产物可用于临床体外检测使用。

【检验原理】

本产品基于硅胶板纯化方式。样品在消化液和蛋白酶作用下裂解消化，DNA/RNA 释放到消化液中。转移至吸附板中过滤，DNA/RNA 被吸附至膜上，而蛋白质则不被吸附而随溶液滤出。经洗涤蛋白质和其它杂质，最后 DNA/RNA 被低盐缓冲液洗脱液 NFW 洗脱。

【主要组成成份】

货号	IVD4179-20	IVD4179	主要成分
病毒吸附柱	20 个	50 个	玻璃纤维滤膜
收集管	40 个	100 个	塑料管
2ml 研磨管	20 个	50 个	研磨珠
蛋白酶 K	24 mg	50 mg	重组蛋白酶
蛋白酶溶解液	1.8 ml	5 ml	Tris/CaCl ₂ /甘油
DNase I (Powder)	10 mg	10 mg	牛胰脱氧核糖核酸酶
DNase Buffer	6 ml	6 ml	Tris/CaCl ₂
消化液 CLB	50 ml	100 ml	异硫氰酸胍/表面活性剂
消化液 SDS	3 ml	5 ml	Tris/EDTA/SDS
Reagent DX	1.5 ml	1.5 ml	消泡剂
消化液 ACL	15 ml	30 ml	异硫氰酸胍/表面活性剂 I
洗涤液 VHB*	13 ml	22 ml	盐酸胍
洗涤液 RW2*	10 ml	20 ml	Tris/NaCl
洗脱液 NFW	10 ml	15 ml	DEPC 处理水

【储存条件及有效期】

本试剂盒在室温运输，收到产品后，把 DNase I 和蛋白酶 K 保存于-20-8℃，把其它组份保存于室温，有效期 18 个月。

【准备工作】

- 溶解蛋白酶 K: 加入 1.2ml/2.5 ml 蛋白酶溶解液至瓶子中，溶解后保存于-20~8℃。
- 溶解 DNase I: 加入 0.7ml 蛋白酶溶解液至瓶子中，溶解后保存于-20℃。
- 洗涤液 VHB/RW2, 按标签所示，加入适量无水乙醇进行稀释，室温保存。

方案 1：从富含细胞的样品中富集微生物 DNA/RNA

1. 按以下方式进行前处理：

抗凝血液：转移~1.0ml 全血至 2ml 离心管中，2,000 x g 离心 10 分钟，转移不小于 0.25ml 血浆至新的离心管中，用于病毒总核酸制备(第 5 步)。加入 1.0ml 消化液 CLB 至余下样品中，涡旋混匀 15 秒，室温放置 10 分钟，13,000 x g 离心 10 分钟收集微生物，吸弃残液，沉淀部分按第二步操作，进行微生物富集提取。

血浆/腹水等体液样品：取 1~3ml 血浆/腹水/积液液体样品至 2~5ml 离心管中，13,000 x g 离心 10 分钟收集微生物和细胞。转移上清液至新的离心管中，用于病毒总核酸制备(第 5 步)，沉淀部分按第二步操作，进行微生物富集提取。

组织：取 50-100mg 组织样品，用 1ml 生理盐水进行充分匀浆，于 13,000 x g 离心 10 分钟收集微生物和细胞。转移上清液至新的离心管中，用于病毒总核酸制备(第 5 步)。沉淀部分按第二步操作，进行微生物富集提取。

痰液：取适量的痰液，加入适量的生理盐水和 DTT 进行液化，于 10,000 x g 离心 10 分钟，转移上清用于病毒总核酸提取(第 5 步)。沉淀部分按第二步操作，进行微生物富集提取。

- 加入 1.0ml 消化液 CLB 至沉淀中，涡旋重悬，室温放置 10 分钟裂解真核细胞。13,000 x g 离心 10 分钟收集微生物，吸弃上清液。
- 加入 300μl 洗脱液 NFW 涡旋重悬样品，然后加入 50μl DNase Buffer 和 10μl DNase I 至悬液中，混匀，放置 30 分钟消化细胞 DNA 和 RNA。
- 在 2ml 匀浆管中，加入 50μl 消化液 SDS 和 2μl Reagent DX，然后把第 3 步的消化液转移至匀浆管中，涡旋仪上高速涡旋 10 分钟裂解微生物或珠磨仪上珠磨 3 分钟。
- 短暂离心匀浆管，在新的离心管中，转移 250μl 匀浆液(第 4 步)和 250μl 含病毒的上清液(第 1 步)。

6. 加入 500 μ l 消化液 ACL 和 40 μ l 蛋白酶 K 至样品中，混匀，55 $^{\circ}$ C 处理 15 分钟。
7. 加入 500 μ l 无水乙醇于样品中，颠倒混匀数次。
8. 把病毒吸附柱装在 2ml 收集管中。转移一半混合液至柱子中。10,000 \times g 离心 30-60 秒。
9. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。把余下的混和液转移至柱子中。10,000 \times g 离心 30-60 秒。
10. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500 μ l 洗涤液 VHB 至柱子中。10,000 \times g 离心 30-60 秒。
11. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500 μ l 洗涤液 RW2 至柱子中。10,000 \times g 离心 30-60 秒。
12. 倒弃滤液把柱子装回收集管。加入 500 μ l 洗涤液 RW2 至柱子中。10,000 \times g 离心 30-60 秒。
13. 倒弃滤液把柱子套回收集管。13,000 \times g 离心空柱 3 分钟甩干柱子。
14. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。加入 30~50 μ l 洗脱液 NFW 至柱子的膜中央。13,000 \times g 离心 1 分钟。
15. 弃去柱子，把 DNA/RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

方案 2：病原总核酸提取

1. 在 2ml 匀浆管中，加入 50 μ l 消化液 SDS 和 2 μ l Reagent DX。加入~0.5ml 浸泡液，匀浆液，培养液，体液等样品，再加入 20 μ l 蛋白酶 K 至样中吕中，盖上盖子，在涡旋仪涡旋 10 分钟，或转移至珠磨仪上珠磨 60~90 秒。
 - 这一步涡旋混匀时，推荐使用 MagMix A 涡旋仪 (货号 MM-01)，该仪器可同时处理 24 个样品。
 - 处理干拭子/固体组织样品时，把样品直接转移至匀浆管中，然后补加入 500 μ l PBS 或生理盐水。
 - 处理富含体细胞样品时(全血、血水、积液、痰液液化液、组织匀浆液、唾液等)，于 1,000~1,500 \times g 离心 10 分钟去除多余体细胞，然后再转移上清液进行操作。
 - DNase I 处理：在 1.5ml 离心管中，400 μ l 待测样品、100 μ l DNase Buffer 和 10 μ l DNase I，颠倒混匀，室温放置 30 分钟后，再转移消化液至匀浆管中。
2. 短暂离心匀浆管，转移 500 μ l 匀浆液至新的离心管中，加入 40 μ l 蛋白酶 K 和 500 μ l 消化液 ACL，颠倒混匀，55 度温育 15 分钟。
3. 加入 500 μ l 无水乙醇至样品中，颠倒混匀数次，室温静置 3 分钟。
4. 把吸附柱装在 2ml 收集管中。转移一半混合液至柱子中。10,000 \times g 离心 30-60 秒。
5. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。把余下的混和液转移至柱子中。10,000 \times g 离心 30-60 秒。

6. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500 μ l 洗涤液 VHB 至柱子中。10,000 \times g 离心 30-60 秒。
7. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500 μ l 洗涤液 RW2 至柱子中。10,000 \times g 离心 30-60 秒。
8. 倒弃滤液把柱子装回收集管。加入 500 μ l 洗涤液 RW2 至柱子中。10,000 \times g 离心 30-60 秒。
9. 倒弃滤液把柱子套回收集管。13,000 \times g 离心空柱 3 分钟甩干柱子。
10. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。加入 15~30 μ l 洗脱液 NFW 至柱子的膜中央。13,000 \times g 离心 1 分钟。
11. 弃去柱子，把 DNA/RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

【产品的局限性】

样品提取效率与操作者是否严格按照说明书操作有关。

【产品性能指标】

1. 外观检查：试剂盒应组份完全，包装外观清洁、无泄漏、无破损；标志、标签字迹清楚。
2. 核酸纯度：按说明书提取 0.5ml 大肠杆菌培养液，OD260/280 值在 1.7-2.0，A260/230 在 1.2-1.8，且 CV 值小于 15%。
3. 核酸产量：按说明书提取 0.5mg 大杨杆菌培养液时，富集与直接提取时，产量相当。

【备案信息】

备案人/生产企业名称：广州美基生物科技有限公司

住所：广州市黄埔区联浦街 16 号 502 房

生产地址：广州市黄埔区联浦街 16 号 502 房

售后服务单位：广州美基生物科技有限公司

电话：020-89857862

传真：020-89857862

生产备案凭证编号：粤穗食药监械生产备 20160033 号 备案号：粤穗械备 20150062 号