

组织病毒 DNA 提取试剂盒（柱式法）使用说明书

【预期用途】

组织病毒 DNA 提取试剂盒（柱式法）用于从各种组织中分离纯化出高质量、高浓度的病毒 DNA。

【检验原理】

破坏组织，释放细胞。裂解液裂解细胞释放病毒 DNA，中和液去除宿主 DNA 并促进吸附柱内的硅胶膜吸附病毒 DNA；洗涤吸附柱，去除蛋白、盐等杂质。洗脱液促使硅胶膜释放病毒 DNA，从而获得高质量的病毒 DNA。

【试剂盒组成、贮藏及有效期】

产品编号	试剂名称	50T	100T	200T
MDT-TV01	细胞悬浮液	13mL×1 瓶	26mL×1 瓶	52mL×1 瓶
	细胞裂解液	13mL×1 瓶	26mL×1 瓶	52mL×1 瓶
	中和缓冲液 K	15mL×1 瓶	30mL×1 瓶	60mL×1 瓶
	RNA 清除剂	260μL×1 支	520mL×1 支	1.1mL×1 支
	RAW1 缓冲液	12mL×1 瓶	24mL×1 瓶	48mL×1 瓶
	吸附柱（含收集管）	50 支	100 支	200 支
	洗脱液 B	5mL×1 瓶	10mL×1 瓶	20mL×1 瓶
	使用说明书	1 份	1 份	1 份

RNA 清除剂：常温（10-30℃）运输，2-8℃保存；

其他试剂：常温（10-30℃）运输保存。有效期 1 年。

细胞悬浮液：初次使用前加入全部 RNA 清除剂。短期使用 2-8℃保存，长期使用-20℃保存，有效期 1 年。

【注意事项】使用前务必认真阅读以下注意事项

1. 细胞裂解液使用前 >37℃ 孵育至液体澄清（孵育约 5-10 分钟）。
2. 使用前检查中和缓冲液 K 是否出现混浊或结晶，如有混浊或结晶，可于水浴中孵育至澄清。
3. 细胞悬浮液初次使用前加入全部 RNA 清除剂。
4. 提前配制 RAW1，RAW1 中乙醇含量低于 60% 会影响提取效果。
5. 提前配制 80% 乙醇水溶液，乙醇水溶液中乙醇含量低于 80% 会影响提取效果。
6. 洗脱液的使用量太少会影响提取效果。
7. 本试剂盒在有效期内不同批号试剂可以互换。
8. 虽然本产品无氯仿、苯等 OSHA 规定的危险物品，但操作时最好做好必要的防护措施，戴口罩手套，并且在通风的生物安全柜中进行。
9. 按当地法律法规处理生物样本和废弃物。

【样本要求】

新鲜组织、液氮中保存的组织、组织保存液保存的组织等。

【适用范围】

≤20mg 动物组织；≤100mg 植物组织。

【自备器械和试剂】

小型高速离心机（最大离心力 $\geq 12,000\times g$ ）、高速匀浆器（研钵、液氮）、振荡仪、金属浴、1.5mL 离心管、异丙醇和无水乙醇等。

- **RAW1 配制**：RAW1 缓冲液使用前按照瓶身标签说明加入相应量的无水乙醇，使乙醇含量为 60%，混匀后密封常温保存。
- **80%乙醇水溶液配制**：1 份水加入 4 份无水乙醇，配制成 80%乙醇水溶液，混匀后密封常温保存。
- 试剂盒初次使用前，将 **RNA 清除剂** 全部加入**细胞悬浮液**，混匀并做好标记后按规定保存。
- 每次使用前检查**细胞裂解液**和**中和缓冲液 K** 是否沉淀或结晶，如有沉淀或结晶，请于 37°C 以上孵育至液体澄清（孵育需要 5-10 分钟）。

【样本处理】

一、动物组织的处理

按下表说明使用组织的量

高丰度 DNA 的组织（如肌肉、心脏、肝、脾、胰、脑、胚胎、肾、肺、卵巢、胸腺等）	$\leq 10\text{mg}$
低丰度 DNA 的组织（膀胱、骨、脂肪）	$\leq 20\text{mg}$

1. 液氮研磨法

- 1.1 取 $\leq 20\text{mg}$ 组织，转移至预冷的研钵中，加液氮磨成粉末。
- 1.2 将组织粉末转移至 1.5mL 离心管中，将液氮充分挥发。
- 1.3 加入 250 μL 细胞悬浮液悬浮组织粉末。

2. 高速匀浆法

2.1 新鲜组织的处理

2.1.1 取 $\leq 20\text{mg}$ 的新鲜组织，尽量剪碎后转入 2mL 平底离心管，加入 300 μL 细胞悬浮液，用高速匀浆器充分匀浆。

▶组织需尽量剪碎再进行匀浆。

▶匀浆必须充分，否者影响 DNA 的提取效率。

▶匀浆速度太快容易导致 DNA 断裂。

2.1.2 取出离心管，12,000 $\times g$ 离心 1 分钟，吸取 250 μL 上清转入至新的 1.5mL 离心管中。

2.2 组织保存液保存组织的处理

2.2.1 用镊子取出 $\leq 20\text{mg}$ 的组织保存液（MDT-TP01）保存的组织（冷冻的保存液需 37°C 振荡孵育至保存液完全融化），尽量剪碎后转入 2mL 平底离心管中。

▶组织保存液保存的组织需用 75%乙醇漂洗 1 次，用吸水纸将吸干乙醇。

▶组织需尽量剪碎再进行匀浆。

2.2.2 加入 1mL 75%乙醇漂洗 1 次，充分吸弃 75%乙醇。

2.2.3 加入 300 μL 细胞悬浮液，使用匀浆器充分匀浆。42°C 孵育 5 分钟。

▶匀浆必须充分，否者影响 DNA 的提取效率。

▶匀浆速度太快容易导致 DNA 断裂。

2.2.4 取出离心管，12,000 $\times g$ 离心 1 分钟，吸取 250 μL 上清转入至 1.5mL 离心管中。

2.3 石蜡组织处理

2.3.1 用刀片去除组织周围多余石蜡，取 5-8 片 5-10 μm 的石蜡卷放入 2mL 平底离心管中。

2.3.2 向离心管中加入 1 mL 二甲苯（自备），涡旋震荡 30 秒使石蜡充分溶解。

2.3.3 将离心管放入离心机，12,000 $\times g$ 离心 2 分钟，吸弃溶液（防止沉淀丢失）。

2.3.4 向离心管中加入 1 mL 无水乙醇，涡旋震荡 20 秒。

2.3.5 将离心管放入离心机，12,000 $\times g$ 离心 2 分钟，吸弃溶液（防止沉淀丢失）。

2.3.6 打开管盖，室温放置 10 分钟使乙醇充分挥发。

2.3.7 加入 300 μL 细胞悬浮液，使用高速匀浆器充分匀浆。

►组织匀浆必须充分，否则影响 DNA 的提取效率。

►匀浆速度太快容易导致 DNA 断裂。

2.3.8 12,000×g 离心 1 分钟，吸取 250μL 上清转入至 1.5mL 离心管中。

二、植物组织的处理

按下表说明使用植物组织的量

植物种子和嫩叶	20-50mg
植物纤维组织	50-100mg

1. 液氮研磨法

1.1 取≤100mg 细碎的植物组织，转移至预冷的研钵中，加液氮磨成粉末。

1.2 将组织粉末转移至 1.5mL 离心管中，将液氮充分挥发。

►液氮挥发和研磨必须充分，否则将影响 RNA 的提取效率。

1.3 加入 250μL 细胞悬浮液悬浮组织粉末。

2. 高速匀浆法

2.1 取≤100mg 细碎的植物组织，尽量搅碎（捣碎）后转入 2mL 平底离心管，加入 300μL 细胞悬浮液，高速匀浆器充分匀浆。42℃孵育 5 分钟。

►植物组织使用前应尽量搅碎（捣碎）。

►果肉（需挤干水分后取果肉纤维）、果皮等组织推荐使用液氮研磨法进行处理。

►匀浆必须充分，否则影响 DNA 的提取效率。

►匀浆速度太快容易导致 DNA 断裂和大量泡沫产生。

2.2 取出离心管，12,000×g 离心 1 分钟，吸取 250μL 上清转入至 1.5mL 离心管中。

【操作步骤】

1. 在上述含 250μL 细胞悬浮液的离心管中，加入 250μL 细胞裂解液，闭盖，温和的上下翻转 6-8 次，室温放置 4 分钟，使组织细胞充分裂解。

►此时组织细胞液应变得清亮粘稠，如果未变得清亮，可能由于组织用量过多，裂解不彻底，应减少组织用量。

►不要剧烈敲打，以免打断基因组 DNA，造成提取物中混有基因组 DNA 片断。

►室温放置时间不应超过 5 分钟，以免病毒受到破坏。

►细胞裂解液使用前充分孵育确保沉淀完全溶解。

2. 再加入 300μL 中和缓冲液 K，闭盖，立即温和上下翻转 6-8 次，使液体充分混匀。12,000×g 离心 10 分钟，吸取上清。

►中和缓冲液 K 加入后应立即轻轻颠倒混匀，避免产生局部沉淀。

►细胞裂解液增加时，中和缓冲液 K 的量要相应增加。

►尽量不要吸出沉淀。

►中和缓冲液 K 在温度较低时容易产生沉淀；出现沉淀时，使用前充分孵育确保沉淀完全溶解。

3. 将吸附柱放入收集管中，将步骤 4 产生的上清全部转移至吸附柱中，闭盖 12,000×g 离心 1 分钟。取出吸附柱，弃去收集管中的废液，将吸附柱重新放入收集管中。

4. 开盖，在吸附柱中加入 600μL RAW1，闭盖 12,000×g 离心 20 秒。取出吸附柱，弃去收集管中的废液，将吸附柱重新放入收集管中。

5. 开盖，在吸附柱中加入 600μL 80%乙醇水溶液，闭盖 12,000×g 离心 20 秒。取出吸附柱，弃去收集管中的废液，将吸附柱重新放入收集管中。

6. 开盖，在吸附柱中加入 600μL 无水乙醇，闭盖 12,000×g 离心 20 秒。取出吸附柱，弃去收集管中的废液，将吸附柱放入新的 1.5mL 离心管中。闭盖。

7. 12,000×g 离心 3 分钟。取出吸附柱，丢弃离心管。

8. 将吸附柱放入新的 1.5mL 离心管中，开盖，加入 50μL 洗脱液 B 至吸附柱中心位置。闭盖室温静置 3 分钟，12,000×g 离心 1 分钟，收集洗脱液，-20℃保存备用。

►洗脱液 B 的使用量可以根据需要调整，但不得低于 30 μ L。

【组织 DNA 提取（中和柱式法）常见问题解答】

1. 未提出病毒或病毒得率较低

- ①低病毒拷贝的样本：使用低病毒拷贝数的样本时，增加样本用量的同时需要增加相应试剂的使用量。
- ②裂解不充分：样本使用过多易导致样本裂解不充分，可减少样本用量（动物组织不超过 20 mg，植物组织不超过 100 mg）或增加相应试剂的用量。
- ③富含纤维的组织样品：肌肉、心脏以及皮肤等富含肌纤维的动物组织及植物组织建议增加研磨时间和力度。
- ④溶液使用不当：细胞裂解液和中和缓冲液在温度较低时可能出现浑浊或结晶，应置于 37 $^{\circ}$ C 以上孵育直至完全溶解。
- ⑤洗脱不完全：洗脱时，适当加温（37-60 $^{\circ}$ C）或延长洗脱时间，可提高病毒特别是大病毒的洗脱效率。
- ⑥乙醇残留：漂洗液洗涤后应离心尽量去除残留液体。
- ⑦洗脱液 pH 值对洗脱的影响：洗脱效率与洗脱液的 pH 值有关，请确保洗脱液 pH >7.0，pH 过低可能导致洗脱量降低。
- ⑧洗脱体积对洗脱的影响：洗脱体积增大提取率增高，但病毒浓度降低。
- ⑨洗脱时间对洗脱的影响：洗脱时放置 1 分钟可达到较好的效果。如果是低拷贝病毒时，可以分两次洗脱，并且延长放置时间。
- ⑩洗脱液加入位置不正确：洗脱液应加在硅胶膜中心部位以确保洗脱液会完全覆盖硅胶膜的表面。
- ⑪溶液失效：细胞裂解液长期暴露在空气中容易失效，请每次使用完后，立即盖紧瓶塞，以免失效，造成碱裂解不充分。

2. 病毒 DNA 纯度不高

- ①蛋白残留：样本使用量过多时，减少样本用量或增加试剂使用量。经细胞悬浮液，细胞裂解液和中和缓冲液 K 处理，离心后的上清应为澄清的液体，如果还混有微小蛋白悬浮物可再次离心，并延长离心时间，使蛋白完全沉淀后再取上清至吸附柱中。
- ② RNA 残留：RNA 清除剂处理不彻底，减少样本用量或加入中和缓冲液 K 后室温再延长放置时间 5-10 分钟，或增加 RNA 清除剂的使用量。如果细胞悬浮液已保存 6 个月以上，请在细胞悬浮液中添加新鲜的 RNA 清除剂。
- ③混有基因组 DNA：加入细胞裂解液后应温和混匀，如果剧烈振荡，可能把基因组 DNA 打断从而混杂在病毒中。如果加入细胞裂解液后过于粘稠，无法温和混匀，请减少样本用量。

【说明书编制日期】 2024 年 01 月 25 日

【基本信息】

企业名称：无锡迈德泰克生物医药有限公司

公司地址：江苏省无锡市惠山经济开发区惠山大道 1699 号生命科技产业园 C5 楼 C50206 室

网 址：www.wuxi-medtech.com

联系电话：173 1562 0564（微信同号）； 138 6175 7779（微信同号）