

环境样本（病毒）核酸提取试剂盒（磁珠法）

【产品名称】

通用名称：环境样本（病毒）核酸提取试剂盒

英文名称：Virus nucleic acid extraction kit for environmental samples

【包装规格】40 份/盒、60 份/盒、64 份/盒、96 份/盒

【预期用途】

本试剂盒是专门从养殖环境、运输车辆、养殖人员、屠宰场等环境中提取病毒 DNA 而设计的。试剂盒采用磁珠法纯化技术，并结合独创的腐殖酸吸附剂技术，适合于从各种养殖环境拭子、土壤（猪场附近 3 公里内）、猪的粪便、猪尿液、猪唾液以及运送饲料、生猪的车辆表面等进行非洲猪瘟病毒的筛查。目前广泛应用的例子：如猪场内的土壤，猪的粪便，猪的唾液，养殖饲料中；试剂盒能够从此类样品中提取高产量高纯度的总 DNA。

【实验原理】

试剂盒是采用高结合力的纳米磁珠为基质。磁珠在高浓度离子化剂（如盐酸胍或异硫氰酸胍）条件下，可通过氢键和静电等物理因素吸附核酸而形成磁珠核酸复合物，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的磁珠经洗涤去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液（如 Buffer TE）或水，洗脱出纳米磁珠上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。此外，S3-Cleanup Buffer 溶液是我们独创的腐殖酸吸附剂，该吸附剂可选择性吸附 DNA 样品中的腐殖酸等抑制因子，提高 DNA 纯度。

【主要组成成分】

试剂盒组成	111605-40	111605-60	111605-64	111605-96
纯化次数	40 次	60 次	64 次	96 次
S1-Lysis Buffer	50 ml	110 ml	50 ml	110 ml
S2-Lysis Enhancer *	15 ml	15 ml	15 ml	15ml
S3-Cleanup Buffer	25 ml	45 ml	25 ml	45 ml
Dry beads Tube	40 个	60 个	64 个	96 个
10 次预分装板	4 块	6 块	-	-
16 次预分装板	-	-	4 块	6 块
说明书	1 份	1 份	1 份	1 份

【储存条件及有效期】

室温保存，保存得当可稳定使用 12 个月。

【注意事项】

- 1、S2-Lysis Enhancer 使用前请先将其 60℃ 抚育至透明溶解状态，由于液体粘稠，移取液体时，慢吸快放，确保移取液体用量。
- 2、不同批次、不同组分试剂不能混用。

【核酸提取】

1. 样品处理

1.1 粪便、污泥、养殖饲料

取 <0.25 g 此类样本加入 Dry beads Tube 中，加入 750 μ l S1-Lysis Enhancer 涡旋彻底、混匀。

（此步骤中若饲料、污泥吸水过多，可以适当增加 S1-Lysis Enhancer 的用量。）

1.2 擦拭环境的抹布、拭子

取少量擦拭环境的抹布或拭子到 15ml 或 50 ml 离心管中，加入 1 ml PBS 缓冲溶液浸泡

后,用镊子挤压抹布或拭子,取 250 μ l 液体至 Dry beads Tube 中, 加入 750 μ l S1-Lysis Enhancer 涡旋彻底、混匀。

1.3 含猪尿液、养殖用水

使用负压设备, 配合抽滤装置抽滤 50ml~200mL 的养殖用水 (推荐使用 0.22 μ m 的微孔过滤器配合注射器进行过滤 50ml 的养殖用水), 将微孔过滤器中的滤膜取出, 用剪刀剪碎放入 Dry beads Tube 中, 加入 750 μ l S1-Lysis Enhancer 涡旋彻底、混匀。

2.加入 100 μ l S2-Lysis Enhancer 溶液至样品中, 65 $^{\circ}$ C 孵育 10 min。

3.剧烈涡旋震荡 10min。

(此步骤可选用研磨仪, 频率: 6.5 m/sec, 处理时间: 30S, 10 个循环)

4. 12000 rpm 离心 5 min, 转移上清 600 μ l 到新的 1.5 ml 的离心管中。

(注意: 离心后上清表面可能出现一层杂质, 避免吸取这些杂质, 因为这些杂质会影响下游的扩增)

5. 加入 400 μ l S3-Cleanup Buffer, 立即彻底混匀。

6. 12000 rpm 离心 2 min, 转移全部上清液 (约 400 μ l) 到 预分装板的孔(1)、(7)中。

打开核酸自动提取仪, 选择编辑程序并命名“环境病毒 DNA”, 按照下表进行编辑。

步骤	孔位	步骤说明	等待时间	混合时间	吸磁时间	容积	混合速度	加热设置	温度 $^{\circ}$ C
1	1	结合	0:0	5min	1: 0	800	中	关	
2	2	漂洗 1	0:0	60sec	1: 0	500	快	关	
3	3	漂洗 2	0:0	60sec	1: 0	500	快	关	
4	4	漂洗 3	0:0	60sec	1: 0	600	快	关	
5	5	漂洗 4	0:0	60sec	1: 0	600	快	开	
6	6	洗脱 DNA	2:0	2min	1: 0	80	中	开	75
7	4	去磁珠	0:0	30sec	0: 0	600	快	关	

7. 插入磁棒套, 运行编辑好的程序, 25min 左右程序结束, 转移洗脱孔 6、12 中的 DNA 至新的离心管-20 $^{\circ}$ C 保存或直接进入 q-PCR 检测。

【检验结果的判定】

DNA 纯度: OD260/OD280 $\approx$ 1.7~2.0 (>2.0, 表明有 RNA 污染; <1.7, 表明有蛋白质、酚等污染)

【产品性能指标】

1. 本产品批内、批间差异 $\leq$ 5%。
2. 利用仪器提取时, 可同时提取 1-32 个样本, 结果稳定且重复性好。

【参考文献】

1. Boom, R., C.J.A. Sol, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M.E.W. Dillen, and J. van der Noordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol. 28:495-503.
2. Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162:156-159.