

目 录

简 介-----	2
原 理-----	2
保质期-----	2
试剂盒组成-----	3
准备工作-----	3
方案 1: 200µl 液体样品病毒 RNA/DNA 的 KingFisher Flex 操作方案-----	4
方案 2: 200µl 液体样品病毒 RNA/DNA 的 KingFisher Duo 操作方案-----	5
方案 3: 200µl 液体样品病毒 RNA/DNA 的 KingFisher ML 操作方案-----	7
常见问题回答-----	8

版本: 2013-11

简介

MagPure Viral Nucleic Acid KF Kits 为血清、血浆、牛奶、拭子等液体样品的病毒 DNA 和 RNA 提取提供了一个简单快速的解决方案。试剂盒基于超顺磁性的磁性粒子纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 30 分钟。该试剂盒可在自动化核酸提取仪 KingFisher ML、KingFisher Flex、KingFisher Duo 上使用。得到的 RNA 可直接用于定量 RT-PCR、病毒 RNA 检测等实验；得到的 DNA 可直接用于定量 PCR 等实验。

原理

MagPure 纯化系统采用高结合力的超顺磁性的磁性粒子为基质，在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，纳米磁性粒子可通过氢键和静电吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的纳米粒子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，洗脱出粒子上的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。MagPure 系统采用的溶液体系和纯化方式是专门为自动化核酸提取而设计的，已在 KingFisher 自动化核酸纯化仪上广泛运用。其它提取仪或移液工作站也可以使用。

MagPure Viral Nucleic Acid KF Kit 基于高结合力的纳米磁性粒子的纯化方式。样品在裂解液作用下裂解消化，RNA/DNA 释放到裂解液中。加入乙醇和磁性粒子吸附 RNA/DNA，而蛋白质则不被吸附而去除。吸附了 RNA/DNA 的粒子经洗涤液洗涤去除蛋白质和其它杂质，经乙醇液洗涤去除盐分；最后 RNA/DNA 被 DEPC 处理水洗脱。洗脱的 RNA/DNA 可直接用于 RT-PCR、PCR、病毒检测等实验。

保质期

本产品可以在室温下(15-25℃)保存 18 个月。Carrier RNA 干粉、Proteinase K 干粉和 MagBind Particles 在室温下运输和保存，长期贮藏(>3 个月)，建议把 Carrier RNA 和 Proteinase K 干粉保存于-20-8℃，MagBind Particles 保存于 2~8℃，MagBind Particles 不能冻藏，结冰会破坏磁珠结构。

组 成

MagPure Viral Nucleic Acid KF Kit

产品编号	MD5412-00	MD5412-01	MD5412-02	MD5412-03
纯化次数	24 Preps	50 Preps	200 Preps	500 Preps
MagBind Particles	0.6 ml	1.1 ml	4.4 ml	11 ml
Carrier RNA	120 µg	310 µg	2 x 310 µg	4 x 310 µg
Proteinase K	12 mg	24 mg	96 mg	220 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	15 ml	15 ml
Buffer MLB	15 ml	30 ml	100 ml	250 ml
Buffer MW1*	13 ml	22 ml	66 ml	2 x 110 ml
Buffer MW2*	5 ml	20 ml	50 ml	3 x 50 ml
Nuclease Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml	2 x 30 ml
说明书	1	1	1	1

准备工作

- 无水乙醇
- KingFisher 相应的耗材
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入适量的 Proteinase Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml。Proteinase K 干粉在 2-8℃ 保存 18 个月，但溶解的 Proteinase K 须分装保存于 -20℃。
- 溶解 Carrier RNA: 加入适量的 RNase Free Water 至 Carrier RNA 干粉中，使其终浓度为 1µg/µl。涡旋使 Carrier RNA 充分溶解。分装保存于 -80℃。Carrier RNA 反复解冻的次数不要超过 5 次。
- 按瓶子标签所示，加入 4 倍体积无水乙醇稀释 Buffer MW2，并于室温保存。
- 按瓶子标签所示，用无水乙醇稀释 Buffer MW1，并于室温保存。
- MagBind Particles 初次使用时，必须剧烈摇晃 1 分钟让磁珠充分分散。

方案 1. 从 200 μ l 样品中提取病毒总核酸(KingFisher Flex)

该方案采用 KingFisher Flex 核酸提取仪，适合于从 200 μ l 血清、血浆或液体样品中直接提取病毒 RNA 和 DNA。

1. 准备洗板和洗脱板:

按下表把相应的洗涤液(Buffer MW1 和 Buffer MW2)和洗脱液(Nuclease Free Water)加到 96 孔板中，并标记好名称。把磁力外套放到洗板 1 中。

板的名称	板类型	试剂类型和用量
洗板 1(Wash 1)	深孔板	Buffer MW1: 600 μ l 磁力外套(Tip)
洗板 2(Wash 2)	深孔板	Buffer MW2: 600 μ l
洗脱板(Elute)	浅孔板	Nuclease Free Water: 50 μ l

2. 准备样品板:

板的名称	板类型	试剂类型和用量
样品板 (Sample)	深孔板	2.1 加入 20 μ l Proteinase K、20 μ l MagBind Particles 和 2 μ l Carrier RNA(可选)。 2.2 然后加入 400 μ l Buffer MLB。 2.3 最后加入 200 μ l 血清、血浆或其它液体样品

为减少加液的次数，Proteinase K、MagBind Particles 和 Carrier RNA 可预先混合，混合液可 2~8 $^{\circ}$ C 放置 2 天。使用前颠倒混匀 10~20 次让磁珠充分分散。由于 Buffer MLB 对蛋白酶 K 的抑制作用，加入 Buffer MLB 后，样品要尽快加入。

3. 上机运作

- 3.1. 打开 KingFisher Flex，导入 MagPure Viral_5412_KF。
- 3.2. 启动程序。按仪器提示，把装好样品和试剂的 96 孔板放到仪器中。
- 3.3. 约 30 分钟后程序结束。
- 3.4. 取出洗脱板贴上封口膜，把产物保存于 -80 $^{\circ}$ C。
- 3.5. 按标准流程，丢去废液和耗材。

方案 2. 从 200 μ l 样品中提取病毒总核酸(KingFisher Duo)

该方案采用 KingFisher Duo 核酸提取仪，适合于从 200 μ l 血清、血浆或液体样品中直接提取病毒 RNA 和 DNA，根据实际情况选择合适的方案进行操作。

标准方案

1. 把洗涤液/样品等加到 DW Plate 对应的孔中，把洗脱液加到洗脱条中。

耗材 (深孔板)	试剂类型和用量
孔 F/G/H	空
孔 E	Buffer MW2: 600 μ l
孔 D	Buffer MW2: 600 μ l
孔 C	Buffer MW1: 600 μ l
孔 B	磁力外套
孔 A	<ol style="list-style-type: none"> 1. 先加入 20μl Proteinase K 和 20μl MagBind Particles。 2. 再加入 400μl Buffer MLB。 3. 最后加入 200μl 血清、血浆或其它液体样品。

注：为减少加液的次数，Proteinase K、MagBind Particles 和 Carrier RNA 可预先混合，混合液可 2~8 $^{\circ}$ C 放置 2 天。使用前颠倒混匀 10~20 次让磁珠充分分散。由于 Buffer MLB 对蛋白酶 K 的抑制作用，加入 Buffer MLB 后，样品要尽快加入。

2. 上机运作

- 2.1 打开 KingFisher Duo，导入 MagPure Viral_5412_Std_Duo。
- 2.2 把装好样品和试剂的 DW Plate 和洗脱条放到仪器中，启动程序。
- 2.3 约 30 分钟后程序结束。取出洗脱条，转移至 1.5ml 离心管中。
- 2.4 把产物保存于-80 $^{\circ}$ C。按标准流程，丢去废液和耗材。

节省耗材型方案

1. 把洗涤液/洗脱液/裂解液和样品加到深孔板的孔中。把磁力外套放到对应的孔

中。

深孔板	试剂类型和用量
孔 H	1. 先加入 20 μ l Proteinase K 和 20 μ l MagBind Particles。 2. 再加入 400 μ l Buffer MLB。 3. 最后加入 200 μ l 血清、血浆或其它液体样品。
孔 G	Buffer MW1: 600 μ l/磁力外套
孔 F	Buffer MW2: 600 μ l
孔 E	Nuclease Free Water: 50 μ l
孔 D	Nuclease Free Water: 50 μ l
孔 C	Buffer MW2: 600 μ l
孔 B	Buffer MW1: 600 μ l/磁力外套
孔 A	1. 先加入 20 μ l Proteinase K 和 20 μ l MagBind Particles。 2. 再加入 400 μ l Buffer MLB。 3. 最后加入 200 μ l 血清、血浆或其它液体样品。

注：为减少加液的次数，Proteinase K、MagBind Particles 和 Carrier RNA 可预先混合，混合液可 2~8 $^{\circ}$ C 放置 2 天。使用前颠倒混匀 10~20 次让磁珠充分分散。由于 Buffer MLB 对蛋白酶 K 的抑制作用，加入 Buffer MLB 后，样品要尽快加入。

2. 上机运作

- 2.1 选择合适的程序进行操作规程。处理 12 个样品时，试剂添加在孔(A-D)，选择 MagPure Viral_5412_AD 进行操作。若试剂添加在孔(E-H)，选择 MagPure Viral_5412_EH 进行操作。处理 24 个样品时，选择 MagPure Viral_5412_2x12。
- 2.2 把装好样品和试剂的 DW Plate 和洗脱条放到仪器中，启动程序。
- 2.3 程序结束后，转移产物至离心管中，把产物保存于-80 $^{\circ}$ C。按标准流程，丢去废液和耗材。

方案 3. 从 200 μ l 样品中提取病毒总核酸(KingFisher ML)

该方案采用 KingFisher ML 核酸提取仪，适合于从 200 μ l 血清、血浆或液体样品中直接提取病毒 RNA 和 DNA。

1. 把洗涤液和洗脱液加到 5 联管对应的孔中:

按下表把相应的洗涤液(Buffer MW1 和 Buffer MW2)和洗脱液(Nuclease Free Water)加到 5 联管的孔中。

5 联管	试剂类型和用量
孔 2 (Wash 1)	Buffer MW1: 600 μ l
孔 3 (Wash 2)	Buffer MW2: 600 μ l
孔 4 (Wash 3)	Buffer MW2: 600 μ l
孔 5 (Elute)	Nuclease Free Water: 50 μ l

注: 为减少加液的次数, Proteinase K、MagBind Particles 和 Carrier RNA 可预先混合, 混合液可 2~8 $^{\circ}$ C 放置 2 天。使用前颠倒混匀 10~20 次让磁珠充分分散。由于 Buffer MLB 对蛋白酶 K 的抑制作用, 加入 Buffer MLB 后, 样品要尽快加入。

2. 准备样品孔:

2.1. 在 5 联管的孔 1 中, 加入 20 μ l Proteinase K 和 20 μ l MagBind Particles。

2.2. 加入 400 μ l Buffer MLB 至孔 1 中。

2.3. 转移 200 μ l 血清、血浆或其它液体样品至孔 1 中。

3. 上机运作

3.1. 打开 KingFisher ML, 导入 MagPure Viral_5412_ML。

3.2. 按仪器提示, 把装好样品和试剂的 5 联管孔放到仪器中。

3.3. 把磁力外套插到仪器对应的位置。启动程序。

3.4. 约 30 分钟后程序结束。

3.5. 取出 5 联管, 把样品转移至 1.5ml 离心管中, 把产物保存于-80 $^{\circ}$ C。

3.6. 按标准流程，丢去废液和耗材。

常见问题解答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。**Magen** 技术人员可随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们，我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象及原因	解决方法
RNA 有颜色	
Proteinase K 与 Buffer MLB 不能预先混合	Proteinase K 与 Buffer MLB 不能预先混合。样品与蛋白酶 K 先进行混匀后，才能加入 Buffer MLB。
Proteinase K 活性下降	使用新制备的 Proteinase K。Proteinase K 需要分装保存，用完后，立即保存于-20℃。
RNA 产量低	
样品中细胞或病毒含量低	处理无细胞的体液时可用超滤柱浓缩于 250µl。
Buffer MW1/MW2 没有加入无水乙醇稀释	按说明书或瓶子标签所示，加入正确的乙醇。
Proteinase K 活性下降	使用新制备的 Proteinase K。Proteinase K 需要分装保存，用完后，立即保存于-20℃。
Proteinase K/MagBind Particles 混合液放置时间过长	Proteinase K/MagBind Particles 混合时间不要超过 1 天。
MagPure Particles 没有充分打散	初步使用 MagPure Particles 时，必须充分剧烈振荡 1-2 分钟以打散 MagPure Particles。
洗脱体积不够	增加洗脱体积以提高洗脱效率