

## 目 录

简 介	2
原 理	2
保质期	2
试剂盒组成	3
准备工作	4
柱式操作(D3191B)	
方案 1:从液体样品中提取病毒 DNA	5
方案 2:从固体样品中提取病毒 DNA	6
方案 3:负压抽滤方案	7
96 孔板操作(D3192B)	
方案 4:从液体样品中提取病毒 DNA	8
方案 5:从固体样品中提取病毒 DNA	9
方案 6:负压抽滤方案	11
常见问题回答	12

版本: 2010-01

## 简介

HiPure Viral DNA Kits 为血清、血浆、牛奶、细胞培养液上清、以及各种无细胞体液样品的病毒 DNA 提取提供了一个简单快速的解决方案。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，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 30-60 分钟。得到的 DNA 可直接用于 PCR、定量 PCR、Southern Blot、芯片分析等实验。

- HiPure Viral DNA Kit 采用硅胶柱,适合于处理 1 个至多个样品的抽提。
- HiPure Viral DNA 96 Kit 采用 96 孔硅胶板, 适合于同时处理 96 个样品。

## 原理

HiPure 硅胶柱是采用高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下, 可通过氢键和静电等物理作用吸附核酸, 而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜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, 洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高, 可直接用于各种下游实验。

试剂盒基于硅胶柱纯化方式。血清, 血浆或无细胞液体样品在裂解液和蛋白酶作用下裂解消化, 病毒 DNA 释放到裂解液中。加入乙醇后, 转移至柱子中过滤, DNA 被吸附至柱子的膜上, 而蛋白质则不被吸附而随而滤液流出去除。柱子经 Buffer GW1 洗涤蛋白质和其它杂质, 经 Buffer GW2 洗涤去除盐分, 最后 DNA 被低盐缓冲液洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于荧光定量 PCR、Southern blot, 基因芯片分析等实验。

## 保质期

本产品室温(15~25℃)可保存 18 个月。Magen Protease/Carrier RNA 干粉室温运输和保存, 收到产品后, 建议保存于-20~8℃。溶解后的 Magen Protease/Carrier RNA 需保存于-20~8℃。低温下, Buffer AL 可能会有沉淀形成, 需 55℃水浴让沉淀完全溶解。

## 组 成

### HiPure Viral DNA Mini Kit

产品编号	D3191-01B	D3191-02B	D3191-03B
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure Viral Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer ACL	3 ml	30 ml	100 ml
Buffer GW1 *	6.6 ml	13 ml	66 ml
Buffer GW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Carrier RNA	120 µg	310 µg	3 x 310 µg
Magen Protease	0.5 ml	1.4 ml	6 ml
Elution Buffer	5 ml	15 ml	60 ml
说明书	1	1	1

### HiPure Viral DNA 96 Kit

产品编号	D3192-01	D3192-02	D3192-03
纯化次数	1 x 96	4 x 96	20 x 96
HiPure gDNA Plate	1	4	20
1.6ml Collection Plate	1	4	20
0.5ml Elute Plate	1	4	20
Seal Films	1	4	20
Buffer ACL	30 ml	120 ml	500 ml
Buffer GW1 *	44 ml	2 x 110 ml	2 x 440 ml
Buffer GW2*	50 ml	2 x 100 ml	3 x 200 ml
Magen Protease	3 ml	12 ml	5 x 12 ml
Elution Buffer	30 ml	100 ml	2 x 200 ml
说明书	1	1	1

## 需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 55℃水浴锅
- Carrier RNA(1 $\mu$ g/ $\mu$ l): 加入适量的 Elution Buffer 至 Carrier RNA 干粉中, 使其终浓度为 1 $\mu$ g/ $\mu$ l。涡旋溶解后分装保存于-80℃。反复冻融不要超过 3 次。
- 用无水乙醇稀释 **Buffer GW1**, 并于室温保存。

### 柱式操作

D3191-01B 加入 8.4 ml 无水乙醇

D3191-02B 加入 17 ml 无水乙醇

D3191-03B 加入 84 ml 无水乙醇

### 96 孔板操作

D3192-01B 加入 56 ml 无水乙醇

D3192-0B 加入 140 ml 无水乙醇

D3192-03B 加入 560 ml 无水乙醇

- 用无水乙醇稀释 **Buffer GW2**, 并于室温保存。

### 柱式操作

D3191-01B 加入 24 ml 无水乙醇

D3191-02B 加入 80 ml 无水乙醇

D3191-03B 每瓶中加入 200 ml 无水乙醇

### 96 孔板操作

D3192-01B 加入 200 ml 无水乙醇

D3192-02B 每瓶中加入 400 ml 无水乙醇

D3192-03B 每瓶中加入 800 ml 无水乙醇

## 方案 1. 从液体样品中小量提取病毒 DNA(D3191B)

该方案采用离心方案，适合于从血清，血浆，牛奶或其它无细胞的体液样品中提取病毒 DNA。

1. 在 1.5ml 离心管中加入 20 $\mu$ l Magen Protease。
2. 转移 250 $\mu$ l 血清、血浆或无细胞液体样品至装有 Magen Protease 的离心管中，振荡混匀。  
若样品体积小于 250 $\mu$ l，用 Elution Buffer 调整总体积至 250 $\mu$ l。若样品体积超过 250 $\mu$ l，按比例扩大 Magen Protease, Buffer ACL 和无水乙醇的用量。
3. **加入 3 $\mu$ l Carrier RNA 和 250 $\mu$ l Buffer ACL 至样品中。**涡旋混匀 15 秒，55 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟。  
处理复杂的样品，于 10,000  $\times$  g 离心 3 分钟去除固体杂质，转移上清至新的离心管中。(Buffer ACL 和 Carrier RNA 可预先混合，该混合液 2-8 $^{\circ}$ C 可保存两天。)
4. **加入 250 $\mu$ l 无水乙醇至样品中。**涡旋混匀 15 秒。  
处理复杂样品（粪便悬液/污水等富含抑制物的样品时），加入 70 $\mu$ l 异丙醇代替无水乙醇，涡旋混匀后，按第 5 步进行操作。
5. 把 DNA 柱装在收集管中。**转移混合液(<750 $\mu$ l)至柱子中。**13,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
6. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**加入 500 $\mu$ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子中。**13,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
7. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 600 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中，**13,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
8. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 600 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中，**13,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。13,000  $\times$  g 离心空柱 3 分钟以甩干柱子的基质，这一步可彻底去除柱子中残留的乙醇。
10. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中。**加入 20-50 $\mu$ l Elution Buffer 至柱子的膜中央。**静置 3 分钟。13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存-20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C。

## 方案 2. 从固体样品中小量提取病毒 DNA(D3191B)

该方案采用离心方案，适合于从培养细胞或固体样品中提取病毒 DNA。

### 1. 样品预处理:

- **培养细胞:** 若病毒是分泌到培养液中，2,000xg 离心 5 分钟离心去除细胞，取 250 $\mu$ l 上清液按步骤 2 进行操作。若病毒是位于细胞内部，收集细胞后，加入 300 $\mu$ l Buffer NL，涡旋重悬裂解细胞。14,000 x g 离心 1 分钟去除细胞核，转移 250 $\mu$ l 上清液至 1.5ml 离心管中。按方案 2 进行操作；(Buffer NL 需另外订购。)
- **粪便样品:** 取 200mg 粪便样品至 1.5ml 离心管中，加入 1ml Buffer PBS，最高速度涡旋 1 分钟重悬粪便样品。14,000 x g 离心 5 分钟，转移 250 $\mu$ l 上清液至 1.5ml 离心管中。按方案 2 进行操作；
- **动物组织:** 取 100mg 组织样品，加入 1ml Buffer PBS，然后用玻璃匀浆器匀浆样品。14,000 x g 离心 3 分钟，转移 250 $\mu$ l 上清液至 1.5ml 离心管中。按方案 2 进行操作；
- **植物样品:** 取 100mg 植物样品，加入 1ml Buffer PBS，然后用研磨钵进行匀浆。14,000xg 离心 3 分钟，转移 250 $\mu$ l 上清液至 1.5ml 离心管中。按方案 2 进行操作；

### 2. 加入 20 $\mu$ l Magen Protease、3 $\mu$ l Carrier RNA 和 250 $\mu$ l Buffer ACL 至样品中。涡旋混匀 15 秒，55 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟，期间偶尔混匀 2-3 次。

处理复杂的样品，于 10,000 x g 离心 3 分钟去除固体杂质，转移上清至新的离心管中。(Buffer ACL 和 Carrier RNA 可预先混合，该混合液 2-8 $^{\circ}$ C 可保存两天。)

### 3. 加入 250 $\mu$ l 无水乙醇至样品中，涡旋混匀 15 秒。

处理复杂样品（粪便悬液/污水等富含抑制物的样品时），加入 90 $\mu$ l 异丙醇代替无水乙醇，涡旋混匀后，按第 5 步进行操作。

### 4. 把 DNA 柱装在收集管中。转移混合液(<750 $\mu$ l)至柱子中。13,000 x g 离心 30-60 秒。

### 5. (可选：混合液超过 750 $\mu$ l) 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。转移剩余混合液至柱子中。13,000 x g 离心 30-60 秒。

### 6. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子中。13,000 x g 离心 30-60 秒。

注：Buffer GW1 使用之前，须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示。

7. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 600 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)**至柱子中，13,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。  
注：Buffer GW2 使用之前，须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示。
8. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 600 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)**至柱子中，13,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。13,000  $\times$  g 离心空柱 3 分钟以甩干柱子的基质，这一步可彻底去除柱子中残留的乙醇。
10. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中。**加入 20-50  $\mu$ l 预热至 56 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至柱子的膜中央。**静置 3 分钟。13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
11. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C。

### 方案 3: 负压抽滤方案(D3191B)

该方案采用负压抽滤方法，适合于处理方案 1 和方案 2。

1. 按离心方案 1 的第 1-4 步，或方案 2 的第 1-3 步进行操作获得混合液。
2. 连接好真空泵和抽滤盒，把 DNA 柱子插到抽滤盒的接口处。
3. 把混合液转移至柱子中。打开真空泵进行抽滤，继续把剩余上清液转入柱子中。
4. 溶液过滤完毕后，加入 500 $\mu$ l Buffer GW1 至柱子中。
5. 溶液过滤完毕后，加入 600 $\mu$ l Buffer GW2 至柱子中；
6. 溶液过滤完毕后，再加入 600 $\mu$ l Buffer GW2 至柱子中。过滤完毕，关闭真空泵；
7. 取下柱子并套在收集管中。13,000  $\times$  g 离心空柱 3 分钟以甩干柱子的基质。
8. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中。**加入 20-50 $\mu$ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至柱子的膜中央。**静置 3 分钟。13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
9. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C。

## 方案 4. 从液体样品中高通量提取病毒 DNA(D3192B)

该方案采用离心方案, 适合于从 96 个血清、血浆、尿液、牛奶等无细胞液体样品中提取病毒 DNA。

1. 加入 20 $\mu$ l Magen Protease 至 2ml 96 孔板中的每一个孔中。
2. **转移 300 $\mu$ l 血清、血浆或无细胞液体样品至装有 Magen Protease 的 96 孔板中。** 涡旋混匀 10 秒。若样品体积不够 200 $\mu$ l, 用灭菌水补足。
3. **加入 3 $\mu$ l Carrier RNA 和 300 $\mu$ l Buffer ACL 至样品中。** 贴上封口膜, 振荡混匀 60 秒。55 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟, 期间偶尔振荡混匀 2-3 次。  
注: Buffer AL 和 Carrier RNA 可预先混合, 该混合液 2-8 $^{\circ}$ C 可保存两天。建议使用 IKA MS3 涡旋仪, 振荡速度设为 1500-2000rpm。
4. **加入 150 $\mu$ l 异丙醇至样品中。** 振荡混匀 60 秒。  
注: 混匀时, 建议使用 IKA MS3 涡旋仪, 振荡速度设为 800-1000rpm。振荡速度不能过高, 否则裂解液会溢出孔口。
5. 把 96 孔结合板装在收集板中。**转移混合液至柱子中。** 4,000  $\times$  g 离心 3 分钟。
6. 倒弃流出液, 把结合板装在收集板中。**加入 600 $\mu$ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上。** 4,000  $\times$  g 离心 3 分钟。
7. 倒弃流出液, 把结合板装在收集板中。**加入 600 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。** 4,000  $\times$  g 离心 3 分钟。
8. 倒弃流出液, 把结合板装在收集板中。**加入 600 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。** 4,000  $\times$  g 离心 3 分钟。
9. 倒弃流出液, 把结合板装在收集板中。4,000  $\times$  g 离心 15 分钟。
10. (可选)把结合板放置于 55 $^{\circ}$ C 烘箱中干燥 10 分钟。
11. 把结合板装在 0.5ml 收集板。**加入 75 $\mu$ l Elution Buffer 至柱子的膜中央。** 放置 5 分钟。4,000  $\times$  g 离心 3 分钟。
12. 丢弃结合板, 用封口膜密封好保存板, 把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。



## 方案 5. 从固体样品中高通量提取病毒 DNA(D3192)

该方案采用离心方案，适合于从固体样品中提取病毒 DNA。

### 1. 样品预处理：

- a) **培养细胞：**若病毒是分泌到培养液中，500xg 离心 5 分钟离心去除细胞，转移 200 $\mu$ l 上清液至 2ml 96 孔板中。若病毒是位于细胞内部，加入 250 $\mu$ l Buffer NL，涡旋重悬细胞。2,000 x g 离心 5 分钟去除细胞核，转移 300 $\mu$ l 上清液至 2ml 96 孔板中。按步骤 2 进行操作；
- b) **粪便样品：**取 200mg 粪便样品至 1.5ml 离心管中，加入 1ml Buffer PBS，最高速度涡旋 1 分钟重悬粪便样品。10,000 x g 离心 5 分钟，转移 300 $\mu$ l 上清液至 2ml 96 孔板中。按步骤 2 进行操作；
- c) **动物组织：**取 100mg 组织样品至 1.6ml 深孔板中，加入 1ml Buffer PBS 和一粒研磨球。用封口膜封住 96 孔板，并转移至珠磨仪上进行匀浆（详细参数照仪器说明书）。（可选 3,000 x g 离心 5 分钟。）转移 300 $\mu$ l 上清液或匀浆液至新的 1.6ml 96 孔板中。按步骤 2 进行操作；
- d) **植物样品：**取 100-200mg 植物样品，加入 1ml Buffer PBS，用研磨钵进行匀浆。10,000xg 离心 3 分钟，转移 300 $\mu$ l 上清液至 2.2ml 96 孔板中。按步骤 2 进行操作；

2. 加入 20 $\mu$ l Magen Protease 至每一孔中，振荡混匀 10 秒。
3. **加入 300  $\mu$ l Buffer ACL 至样品中。**振荡混匀 60 秒。55 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟。
4. **加入 100  $\mu$ l 异丙醇至样品中。**振荡混匀 60 秒或吸打混匀 5-10 次。
5. 把 96 孔结合板装在 1.6ml 收集板中。**转移混合液至 96 孔结合板中。**4,000 x g 离心 3 分钟。
6. 倒弃流出液，把 96 孔结合板装在收集板中。**加入 600  $\mu$ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上。**4,000 x g 离心 3 分钟。
7. 倒弃流出液，把 96 孔结合板装在收集板中。**加入 600  $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**4,000 x g 离心 3 分钟。
8. 倒弃流出液，把 96 孔结合板装在收集板中。**加入 600  $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱**

**子中。**4,000 × g 离心 3 分钟。

9. 倒弃流出液，把 96 孔结合板装在收集板中。4,000 × g 离心 10 分钟。
10. (可选)把结合板放置于 55°C 烘箱中干燥 10 分钟。
11. 把结合板装在 0.5ml 收集板。**加入 100µl Elution Buffer 至柱子的膜中央。**放置 3 分钟。4,000 × g 离心 3 分钟。
12. 丢弃结合板，用封口膜密封好保存板，把 DNA 保存于-20°C。

## 方案 6: 负压抽滤方案(D3192)

该方案采用负压抽滤方案, 适合于从血清、血浆、尿液、牛奶等无细胞液体样品中提取病毒 DNA。

1. 按方案 4 第 1-4 步、或方案 5 的第 1-4 步进行样品裂解、消化以及调节结合条件;
2. 连接好抽滤盒与真空泵; 把废液收集槽放置在真空抽滤盒的底盒中;
3. 盖上真空抽滤盒上盖, 把 96 孔结合板放置真空抽滤盒的上盖中;
4. 把混合液转移至 96 孔板中; 打开真空泵, 用手用力压住 96 孔板, 当真空泵压力上升后, 轻开手。抽滤 3-5 分钟让裂解液完全过滤。
5. 关闭真空泵。每孔中**加入 600 $\mu$ l Buffer GW1**(已用乙醇稀释)。打开真空泵, 用手用力压住 96 孔板, 当真空泵压力上升后, 轻开手。抽滤 3 分钟让裂解液完全过滤。
6. 关闭真空泵。每孔中**加入 600 $\mu$ l Buffer GW2**(已用乙醇稀释)。打开真空泵, 用手用力压住 96 孔板, 当真空泵压力上升后, 轻开手。抽滤 3 分钟让裂解液完全过滤。
7. 关闭真空泵。每孔中**加入 600 $\mu$ l Buffer GW2**(已用乙醇稀释)。打开真空泵, 用手用力压住 96 孔板, 当真空泵压力上升后, 轻开手。抽滤 3 分钟让裂解液完全过滤。
8. 关闭真空泵, 取下 96 结合板在吸水纸上轻轻拍打几次。把 96 结合板放回抽滤盒中。打开真空泵, 以最大的压力抽滤 15 分钟以干燥 96 孔板。
9. 关闭真空泵, 打开真空抽滤盒, 取出废液收集槽, 把 0.5ml 收集板放在抽滤盒底部, 盖回上盖。
10. **每孔加入 100 $\mu$ l Elution Buffer 至膜中央**。室温放置 3 分钟。打开真空泵, 用手用力压住 96 孔板, 当真空泵压力上升后, 轻开手。抽滤 3 分钟。关闭真空泵。
11. 取出收集板, 贴上封口膜。把 DNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C, 长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C。

## 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 的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学上碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽能力为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
<b>DNA 产量低</b>	
样品 DNA 含量低	处理无细胞的体液时可用超滤柱浓缩至 250 $\mu$ l。
柱子堵塞	样品用量太多，或 Magen Protease 活性下降
加入 Buffer AL 后没有充分涡旋混匀	重新提取，并确保加入 Buffer AL 后，立即以最高速度涡旋 30 秒让样品与 Buffer AL 充分混匀。
Magen Protease 活性下降	重新制备 Magen Protease。使用后 Magen Protease 必须立即保存于-20 $^{\circ}$ C。分装保存 Magen Protease，避免反复冻融。
洗脱效率不够	洗脱时 Elution Buffer 加到膜中央，室温放置 3 分钟。增加洗脱的体积。
Buffer GW1 和 Buffer GW2 中乙醇没有加入或加量不够	按说明书或瓶子标签所示，加入正确的乙醇。
柱子没有空甩	柱子必须甩 2 分钟以去除膜上残留的乙醇。
<b>OD260/OD280 比值不正常</b>	
核酸浓度很低	病毒核酸很低，通过紫外分光光度计测量时不在可信范围，读数不可信。
Magen Protease 活性下降	重新制备 Magen Protease。使用后 Magen Protease 必须立即保存于-20 $^{\circ}$ C。分装保存 Magen Protease，避免反复冻融。
<b>下游应用不理想</b>	
乙醇污染	确保空柱离心时速度 12,000 $\times$ g，离心时间为 2 分钟。
膜材料脱落	硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落的颗粒是不溶解的，可通过 12,000 $\times$ g 离心 2 分钟去除。