

目 录

简介.....	2
原理.....	2
试剂盒组成.....	3
保质期.....	3
准备工作.....	4
方案 1: 96 孔板病毒 RNA 抽提(离心方案).....	5
方案 2: 96 孔板病毒 RNA 抽提(抽滤方案).....	7
常见问题回答.....	8

版本: 2018-10

简介

HiPure Viral RNA 96 Kit 适合于从无细胞体液或培养液等样品中纯化病毒 RNA。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 25 分钟。试剂盒适合于从 1-560 μ l 无细胞液样品如血清、血浆、无细胞体液或培养液中提取病毒 RNA。该产品已经成功地提取了乙肝 A/C，丙肝 RNA、SARS 以及 HIV 等。获得的 RNA 可直接用于 RT-PCR、Northern 杂交、以及各种病毒检测等。

原理

HiPure 硅胶柱以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化学作用吸附核酸，而蛋白质和其它杂质则不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除残留的蛋白质和盐，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。

HiPure Viral RNA 96 Kit 基于硅胶柱纯化方式。样品在裂解液中匀浆裂解，RNA 释放到裂解液中。裂解液中含有的高浓度异硫氰酸胍使内源性或外源性的 RNase 变性失活，RNA 受到保护不被降解。加入乙醇调节结合条件后，转移至 96 孔板中过滤，RNA 被吸附上 96 孔板的膜上，而蛋白质则不被吸附而去除。96 孔板经 Buffer RW1 洗涤蛋白质和其它杂质，经 Buffer RW2 洗涤去除盐分，最后 RNA 被 RNase-Free Water 洗脱。洗脱的 RNA 可直接用于 RT-PCR、Northern blot、poly-A 纯化、体外翻译等实验。

组 成

HiPure Viral RNA 96 Kit

产品编号	R4172-01	R4172-02	R4172-03
纯化次数	96 次	4 x 96 次	20 x 96 次
HiPure RNA Plate	1	4	20
2ml Collection Plates	1	4	20
Buffer VRL	60 ml	200 ml	4 x 230 ml
Carrier RNA (Poly A)	1 mg	4 x 1 mg	20 x 1 mg
Buffer GW1	80 ml	2 x 160 ml	6 x 250 ml
Buffer RW2	50 ml	4 x 50 ml	20 x 50 ml
RNase Free Water	30 ml	90 ml	2 x 200 ml
说明书	1	1	1

保 质 期

HiPure Viral RNA 96 Kit 除 Carrier RNA 外，可在室温下（15-25℃）干燥保存 12 个月。长期保存时需置于 2-8℃。低温下，溶液可能会有沉淀形成，需 55℃ 水浴让沉淀完全溶解后使用。Carrier RNA 干粉可在 2-8℃ 保存 1 年，长期保存时，可把 Carrier RNA 保存于 -20℃。Carrier RNA 溶解后，必须保存于 -80℃ 以防止发生降解。因 RNase Free Water 中不含任何抑菌因子，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。我们推荐分装 RNase Free Water 并保存于 -20℃，以减少污染。若 RNase Free Water 受到污染，请按以下方法重新配制。

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 无 RNase 酶的 1.5ml 离心管
- 无 RNase 酶的枪头
- 手套
- (<15,000xg)小型离心机
- (可选) 真空泵和真空抽滤盒
- Carrier RNA 固体使用前必须用 RNase Free Water 溶解至 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。涡旋溶解。分装保存-80℃。Carrier RNA 解冻次数不能超过 5 次。
- Buffer RW2 提供是浓缩液，使用前必须用无水乙醇稀释，并于室温保存。

R4172-01	加入 200ml 无水乙醇
R4172-02	每瓶中加入 200ml 无水乙醇
R4172-03	每瓶中加入 200ml 无水乙醇

方案 1. 96 孔板病毒总 RNA 抽提(离心方案)

该方案适合于从小体积 (140 μ l) 的血清、血浆、尿液、无细胞培养液以及各种无细胞体液中抽提病毒 RNA。该方案也能从这些样品中提取到病毒 DNA，但是效率较低。我们推荐使用 HiPure Viral Nucleic Acid Kit 来提取样品中的病毒 DNA 和 RNA。以下离心均在室温下进行。

- **配制 Buffer VRL/Carrier RNA 混合液:** Carrier RNA(Poly A)可以提高病毒 RNA 的回收效率。每 Buffer VRL, 加入 5 μ l Carrier RNA(1 μ g/ μ l)。VTL Lysis Buffer/Carrier RNA 混合液可在 2-8 $^{\circ}$ C 稳定放置 1 个月。低温放置时, 混合液可能会有沉淀析出, 使用前, 于 60-80 $^{\circ}$ C 水浴 3 分钟让沉淀完全溶解。由于 Carrier RNA 可能会抑制 RT-PCR 反应, 可根据实验情况, 减少 Carrier RNA 的用量。
1. **转移 400 μ l Buffer VRL(含 Carrier RNA)至 96 孔深孔板中。**
 2. **转移 100 μ l 血清, 血浆, 尿液, 无细胞培养液或体液至装有 Buffer VRL/Carrier RNA 的离心管中, 振荡混匀 1 分钟。为充分裂解细胞, 加入样品后应立即剧烈涡旋匀浆。冻藏的样品只能解冻一至二次。**
 3. **室温(15-25 $^{\circ}$ C)静置 10 分钟。**

注: 室温静置 10 分钟后, 病毒颗粒可彻底裂解。延长时间并不能提高产量。此时样品可在 -20 $^{\circ}$ C 长期保存。某些样品静置后仍浑浊, 14,000 \times g 离心 5 分钟去除不溶解的杂质, 以免出现堵柱情况。
 4. **加入 300 μ l 无水乙醇至裂解液中, 振荡混匀 1 分钟。**
 5. **把 96 孔 RNA 结合板放在 2ml 收集板上。转移混合液至每一个孔中。3,000 \times g 离心 3 分钟。**
 6. **倒弃收集板中的滤液。把 RNA 结合板放回收集板上。转移 0.7 ml Buffer GW1 至每一个孔中。3,000 \times g 离心 3 分钟。**
 7. **倒弃收集板中的滤液。把 RNA 结合板放回收集板上。转移 0.7 ml Buffer RW2 至每一个孔中。3,000 \times g 离心 5 分钟。**
 8. **倒弃收集板中的滤液。把 RNA 结合板放回收集板上。转移 0.7 ml Buffer RW2 至每一个孔中。3,000 \times g 离心 5 分钟。**
 9. **倒弃收集板中的滤液。把 RNA 结合板放回收集板上。5,000 \times g 离心 15 分钟。**

10. 把 RNA 结合板放在 1.2ml 收集板中。加入 75 μ l 至每一个孔中膜中央。室温静置 2 分钟。5,000 \times g 离心 3 分钟。
11. 再加入 75 μ l 至每一个孔中膜中央。室温静置 2 分钟。5,000 \times g 离心 3 分钟。
12. 弃去 RNA 结合板。用盖子盖好 96 孔板。把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

方案 2. 96 孔板病毒总 RNA 抽提(负压方案)

该方案采用负压，适合于从 96 个血清、血浆、尿液、无细胞培养液以及各种无细胞体液中抽提病毒 RNA。

1. 按方案 1 的第 1-4 步进行操作。
2. 把废液盒放在真空抽滤盒的底部的内槽中。
3. 盖上真空抽滤盒的上盖，把 96 孔 RNA 板放在上盖的内槽中。连接好真空泵和真空抽滤盒。
4. **把第 4 步获得的混合液转移至 RNA 板中。**打开真空泵，用手压住真空抽滤盒的上盖，当压力开始上升，松开手。抽滤 5 分钟。
5. 关闭真空泵，当压力降至零度时。**每孔中加入 700 μ l Buffer GW1。**打开真空泵，用手压住真空抽滤盒，当压力开始上升时，松开手。抽滤 5 分钟。
6. 关闭真空泵，当压力降至零度时。**每孔中加入 700 μ l Buffer RW2。**打开真空泵，用手压住真空抽滤盒，当压力开始上升时，松开手。抽滤 5 分钟。
7. 关闭真空泵，当压力降至零度时。**每孔中加入 700 μ l Buffer RW2。**打开真空泵，用手压住真空抽滤盒，当压力开始上升时，松开手。抽滤 5 分钟。
8. 关闭真空泵，当压力降至零度时，取下结合板并放在 2ml 收集板上。
9. 4,000 x g 离心 15 分钟干燥 96 孔板。
10. 把 RNA 结合板放在 1.2ml 收集板中。加入 75 μ l 至每一个孔中膜中央。室温静置 2 分钟。5,000 x g 离心 3 分钟。
11. 再加入 75 μ l 至每一个孔中膜中央。室温静置 2 分钟。5,000 x g 离心 3 分钟。
12. 弃去 RNA 结合板。用盖子盖好 96 孔板。把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

常见问题回答

该列表可能有利于解决您在提取过程中所碰到的问题。此外，Magen 的技术人员也可以随时为您提供咨询服务，若您对试剂盒存在疑问或有良好的建议，又或者您在分子生物学实验中碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
RNA 产量低或无	
Carrier RNA 没有加到 VTL Lysis Buffer 中	Carrier RNA 可提取 RNA 的回收效率。用 DEPC 水溶解 Carrier RNA 固体直至浓度为 1 µg/µl。按每 Buffer VRL 加入 10 µl Carrier RNA。
Carrier RNA 发生降解	溶解的 Carrier RNA 必须分装保存于 -70°C，不能反复冻溶超过 5 次。VTL Lysis Buffer/Carrier RNA 不能在室温放置，在 2-8°C 放置时间不能超过 2 天。
样品被反复解冻	避免反复冻溶样品。推荐使用新鲜样品或只解冻过一次的样品。
样品中病毒滴度太低	用小量浓缩柱浓缩病毒样品或提高样品的用量至 560 µl。
VTL Lysis Buffer 裂解能力下降	VTL Lysis Buffer/Carrier RNA 在低温保存时，可能会有沉淀析出，使用前必须在 80°C 短暂水浴让沉淀溶解。水浴时间不能超过 3 分钟。
乙醇用量不对	<ul style="list-style-type: none"> ● 样品上柱之前，没有加入乙醇或加入的量不对。 ● Buffer RW2 必须用无水乙醇进行稀释才能使用。
RNA 下游应用结果不理想	
Carrier RNA 用量太多	根据 RT-PCR 的灵敏度，调整 Carrier RNA 的用量。
RNA 浓度太低	减少洗脱时 RNase Free Water 的用量以提高 RNA 的浓度。
RNA 产量太低或无	参见上面
乙醇污染	确保按照说明书中的条件进行空甩或抽滤，如仍有污染，可能是室温较低所致，可延长离心或抽滤时间。
DNA 污染	
样品中含有 DNA 和 RNA	为减少 DNA 的干扰，应尽量使用无细胞的样品。含细胞的样品如血液、唾液、骨髓等样品应用离心或过滤去除细胞。

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。