

## HiPure Pathoen RNA/DNA Kit B

病原总核酸提取试剂盒（环境类）

### 产品简介

本产品适合于从体液、组织匀浆液、粪便、土壤、发酵液等环境类样品中提取病原总 RNA 和 DNA，包括病毒DNA和RNA，以及细菌DNA和RNA，真菌DNA和RNA，以及宿主细胞总DNA和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。获得的 RNA 可直接用于 RT-PCR、Northern 杂交、以及各种病毒检测等。获得的 DNA 可直接用于 PCR、荧光定量 PCR、病毒检测等。

### 产品组份

产品编号	R4176-01B	R4176-02B	R4176-03B
纯化次数	10 次	50 次	250 次
2ml Beads Tubes	10	50	250
HiPure RNA Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer STL	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer SL	3 ml	10 ml	50 ml
Buffer PCI	3 ml	6 ml	30 ml
Buffer MLBN	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer VHB*	4 ml	13 ml	66 ml
Buffer RW2*	3 ml	20 ml	2 x 50 ml
Nuclease Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml

## 保存条件

本产品室温(15~25℃)可保存 18 个月。

## 准备事项

- 无水乙醇(96-100%)
- 无 RNA 酶的枪头
- Buffer RW2 使用前必须用无水乙醇稀释，并于室温保存。
- Buffer VHB 使用前必须用无水乙醇稀释，并于室温保存。

## 实验步骤

1. 在 2ml Bead Tubes 中，加入 0.3~0.5g 土壤、0.1~0.2g 粪便、0.3~0.5g 环境类样品、0.3ml 发酵悬浊液、0.3ml 微生物悬浊液、0.3ml 组织匀浆液、0.3ml 全血、0.3ml 分泌液等样品。
2. 加入 800 $\mu$ l Buffer STL 和 100 $\mu$ l Buffer PCI 至样品中，盖紧盖子。转移涡旋仪上最高速度涡旋混匀 10~15 分钟或珠磨仪上高速珠磨 30-60 秒。
  - 涡旋仪：推荐使用美基涡旋仪 MagMix A，这台涡旋仪带 2ml 离心管的夹具，可一次高效处理 10~20 个样品。裂解时间应尽可能短，以避免剪切的时间和尽量减少腐殖酸的释放。然而，根据样品的不同，使用涡旋仪时，珠磨裂解时间增加到 15min 可能是有利的，可以根据目标菌群特性和下游应用来调整。
  - Powerlyzer 珠磨仪：建议 2000rpm 珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 2000rpm 珠磨 30 秒。
  - FastPrep24 珠磨仪：建议 5m/s，珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 5m/s 珠磨 30 秒。
  - Tissue Lysis II 珠磨仪：建议 25Hz 珠磨 5 分钟，重新调整位置后再 25Hz 珠磨 5 分钟。
3. 室温下，12,000  $\times$  g 离心 5 分钟。
4. 转移 300 $\mu$ l 上清液至新的离心管中。组织或体液等非环境类样品，按第 7 步进行操作。

环境类样品按第 5 步，用 Buffer SL 进一步去除抑制因子。

5. 进一步去除色素或抑制因子：加入 100 $\mu$ l Buffer SL 至上清液，涡旋混匀 15 秒。
6. 室温下，12,000  $\times$  g 离心 5 分钟，转移 300 $\mu$ l 至新的离心管中。
7. 加入 450 $\mu$ l MLBN 至上清液中，颠倒混匀 6-8 次。
8. 把 HiPure RNA Mini Columns I 装在 2ml 收集管中。转移全部混合液至柱子中。10,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
9. 倒弃滤液把柱子装回收集管。加入 500 $\mu$ l Buffer VHB 至柱子。10,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。

Buffer VHB 在使用之前，必须按说明书或瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。

10. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 600 $\mu$ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。

Buffer RW2 在使用之前，必须按说明书或瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。

11. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 600 $\mu$ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。

12. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。10,000  $\times$  g 离心空柱 3 分钟甩干柱子的基质。

13. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中。加入 50~100 $\mu$ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。室温静置 2 分钟。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。

HiPure RNA Column 最小的洗脱体积是 15 $\mu$ l，小于 15 $\mu$ l 会导致 RNA 的洗脱效率下降。

14. 丢弃 RNA 柱子，把 RNA 样品保存-80 $^{\circ}$ C。

