

HiPure Total RNA/DNA Mini to Midi Kit

总核酸小柱中提试剂盒

产 品 简 介

本产品适合于从血清、血浆、牛奶、体液、培养液、组织匀浆液、拭子等样品中提取病毒RNA和DNA。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。该产品已经成功地提取了对虾乙肝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。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	R4170-01	R4170-02	R4170-03
纯化次数	2 次	10 次	50 次
纯化大柱 F4	2	10	50
5ml 圆底离心管	2	10	50
50ml 离心管（垫片）	2	10	50
Proteinase K Solution	0.5 ml	3 ml	11 ml
Carrier RNA	110 µg	110 µg	310 µg
Buffer ACL	15 ml	60 ml	300 ml
Buffer VHB*	4.4 ml	13 ml	26 ml
Buffer RW2*	2 ml	10 ml	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。低温下，Buffer ACL 可能会有沉淀形成，需 55℃ 水浴让沉淀完全溶解。Proteinase K/Carrier RNA 室温运输和保存，长期保存建议保存于-20~8℃。

准备事项

- 无水乙醇(96-100%)
- 离心管
- 无 RNA 酶的枪头
- Carrier RNA 固体使用前必须用 Nuclease Free Water 至 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，涡旋 30 秒，保存 -20°C 。为方便使用，可以把溶解好的 Carrier RNA 全部转移至溶解好的 Proteinase K，混匀后，保存于 -20°C 。
- Buffer VHB 使用前必须用无水乙醇稀释，并于室温保存。
- Buffer RW2 使用前必须用无水乙醇稀释，并于室温保存。

实验步骤

1. 转移 1~10ml 待测样品，如血清、血浆、尿液、组织匀浆液上清、培养液上清、或其它无细胞体液至装有 5~15ml 离心管中。

若需要去除胞外 DNA，加入 0.01 倍样品体积的 DNase I (10mg/ml, 货号: R4914) 和 0.1 倍样品体积的 DNase Buffer，颠倒混匀，室温放置 30 分钟，消化去除胞外的 DNA 和 RNA。

血浆血清类样品，富集蛋白质，样品用量最好不要超过 3ml，以免产生堵柱现象。尿液，培养液上清液等，样品用量可以高达 10ml，不足的 Proteinase K 和 Buffer ACL 需要另外订购。

2. 加入 0.1 倍样品体积的 Proteinase K 至样品中，颠倒混匀 5 次。
3. 加入等倍样品体积的 Buffer ACL 和 5 μl Carrier RNA，涡旋混匀 10 秒， 55°C 温育 30 分钟，其间颠倒混匀数次。
4. 加入 0.6 倍样品体积的异丙醇，涡旋混匀 10 秒，室温静置 3 分钟。

例：5ml 样品，加入 500 μl Proteinase K，5ml Buffer ACL、5 μl Carrier RNA 和 3.0ml 异丙醇。

5. 取纯化大柱 F4 放在 50ml 离心管中，转移不超过 15ml 混合液至柱子中，8000 rpm 离心

1 分钟。

这一步推荐用水平桶装离心机，柱子可以一次加入 15ml 液体进行离心。

采用角度离心机，柱子每次装量不要超过 10ml，分两次离心过柱，以免液体因角度离心从瓶口处甩出液体造成产量下降。柱子的滤膜厚且压得紧，加入液体时滤膜吸水膨胀而造成表面滤膜脱落飘浮，是正常现象不影响产量。

6. **倒弃滤液，把柱子装回收集管中，加入 1.5 ml Buffer VHB，8000 rpm 离心 1 分钟。**
7. **倒弃滤液，把柱子装回收集管，加入 4.5 ml Buffer RW2，8000 rpm 离心 1 分钟。**
8. **倒弃滤液，把柱子套回收集管中。11,000rpm 离心 3 分钟甩干柱子。**
9. **倒弃滤液，把收集管反扣于吸水纸拍打吸尽残液。把 1.5ml 离心管装在 5ml 离心管中，并一起放到 50ml 收集管中。**
10. **加入 60~100 μ l Elution Buffer 至纯化大柱 F4 的膜中央，然后纯化大柱 F4 放回收集管中，并让柱子底部插入 5ml 离心管的管口，静置 2 分钟，11000rpm 离心 1 分钟。**

这一步推荐高速角度离心机以充分甩出洗脱液。若需得到最高产量，再加入 20~30 μ l Elution Buffer 进行第二次洗脱。采用只有水平桶状离心机，调整至最高速度，并进行两次洗脱，每次用 80 μ l 洗脱液。
11. **弃去柱子，用镊子挑出 5ml 离心管或 1.5ml 离心管，盖好盖子，待用或保存于-20 度。**

常见问题

1. 柱子堵塞

- **样品用量太多:** 处理动物抗凝血液时, 样品量控制在 100~150 μ l。尽量使用无细胞的样品, 如血浆、血清、组织匀浆液的上清等。
- **Proteinase K 活性下降:** 重新制备 Proteinase K。使用后 Proteinase K 必须保存于-20℃。Proteinase K 与 Buffer AL 不能预先混合。
- **样品含固体颗粒:** 在第 5 步加入乙醇前, 10,000 $\times$ g 离心 3 分钟去除未消化的杂质, 转移上清液至新的离心管后再加入乙醇。
- **样品裂解不充分:** 样品与 Buffer AL 混匀不充分。重新提取, 加入 Buffer AL 后先颠倒混匀 3~5 次, 然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer AL 充分混匀。

2. 下游应用结果不理想

- **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。
- **Nuclease Free Water 被污染:** 更换新的 Nuclease Free Water 或 DEPC 处理水。
- **试剂准备有误:** 按瓶子标签所示, 加入合适体积的无水乙醇至 Buffer VHB 和 Buffer RW2 中。
- **Proteinase K 活性下降:** 重新制备 Proteinase K。使用后 Proteinase K 必须立即保存于-20℃。分装保存 Proteinase K, 避免反复冻融。
- **乙醇残留:** 柱子在洗脱前, 需要空甩去除乙醇。对于敏感的应用, 柱子在洗脱后, 打开柱子的盖子, 放置 10~15 分钟让乙醇彻底挥发。
- **洗脱效率:** 处理富含 DNA 的样品时, 把 Nuclease Free Water 预热至 55℃ 后再进行洗脱, 有利于提高 DNA 得率。