

目 录

简介.....	2
原 理.....	2
试剂盒组成.....	3
保质期.....	4
准备工作.....	5
方案 1:单管式小体积病毒 RNA/DNA 抽提(离心方案).....	6
方案 2:单管式大体积病毒 RNA/DNA 抽提(抽滤方案).....	7
方案 3:96 孔板病毒 RNA/DNA 抽提(离心方案).....	8
方案 4:96 孔板病毒 RNA/DNA 抽提(抽滤方案).....	9
附加流程:全血样品的总核酸抽提(含基因组/病毒/细菌 DNA 以及病毒 RNA).....	10
常见问题回答.....	11

版本: 2013-03

简介

HiPure Viral RNA/DNA Kits 适合于从血清、血浆、牛奶、无细胞体液或培养液上清中样品中提取病毒 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。试剂盒适合于从无细胞液体样品如血清、血浆、无细胞体液或培养液中提取病毒 RNA 和 DNA。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。获得的 DNA 可直接用于 PCR、荧光定量 PCR、病毒检测等。

- HiPure Viral RNA/DNA Spin Kit 采用离心法硅胶柱操作方法，适合于从 200 μ l 无细胞液体样品如血清、血浆、无细胞体液或培养液上清中提取病毒 RNA 和 DNA。
- HiPure Viral RNA/DNA Vacuum Kit 采用负压法硅胶柱操作方法，适合于从 1ml 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 和 DNA。
- HiPure Viral RNA/DNA 96 Kit 采用 96 孔板，适合于从 96 个 200 μ l 无细胞液样品如血清、血浆、无细胞体液或培养液上清中提取病毒 RNA 和 DNA。

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 DNA/RNA Kits 基于硅胶柱纯化方式。样品在裂解液中匀浆裂解，DNA/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/DNA 受到保护不被降解。加入乙醇调节结合条件后，转移至柱子中过滤，DNA/ RNA 被吸附上柱子的膜上，而蛋白质则不被吸附而去除。柱子经 Buffer VHB 洗涤蛋白质和其它杂质，经 Buffer RW2 洗涤去除盐分，最后 RNA/DNA 被 Nuclease Free Water 洗脱。

组 成

HiPure Viral RNA/DNA Vacuum Kit

产品编号	R4174-01	R4174-02	R4174-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure Viral Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer AL	15 ml	60 ml	270 ml
Carrier RNA	120 µg	310 µg	3 x 310 µg
Proteinase K	24 mg	120 mg	520 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	15 ml	30 ml
Buffer VHB*	6.6 ml	13 ml	66 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
Nuclease Free Water	1.8 ml	15 ml	30 ml
说明书	1	1	1

保 质 期

HiPure Viral DNA/RNA Kits 可在室温下（15-25℃）干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。Carrier RNA 干粉和 Proteinase K 干粉在室温下运输，收到试剂盒后，把 Proteinase K 和 Carrier RNA 保存于-20~8℃。

组 成

HiPure Viral DNA/RNA 96 Kit

产品编号	R4175-01	R4175-02	R4175-03
纯化次数	96 次	4 × 96 次	20 × 96 次
HiPure DNA Plate	1	4	20
2ml Collection Plate	1	4	20
Buffer AL	30 ml	100 ml	500 ml
Carrier RNA	2 × 310 µg	6 × 310 µg	24 × 310 µg
Proteinase K	50 mg	170 mg	840 mg
Protease Dissolve Buffer	5 ml	15 ml	60 ml
Buffer VHB*	44 ml	2 × 110 ml	4 × 220 ml
Buffer RW2*	50 ml	3 × 50 ml	8 × 100 ml
Nuclease Free Water	30 ml	120 ml	250 ml
说明书	1	1	1

保 质 期

HiPure Viral DNA/RNA Kits 除 Carrier RNA 和 Proteinase K 外，其它组份可在室温下（15-25℃）干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。Carrier RNA 干粉和 Proteinase K 干粉在室温下运输，收到试剂盒后，把 Proteinase K 和 Carrier RNA 保存于-20℃。

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 离心管
- 无 RNase 酶的枪头
- (可选)真空泵和真空抽滤盒
- Carrier RNA 固体使用前必须用 Nuclease Free Water 溶解至 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。涡旋溶解。分装保存-70°C。Carrier RNA 解冻次数不能超过 5 次。
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml。Proteinase K 干粉在 2-8°C 保存一年, 但溶解的 Proteinase K 须分装保存于-20°C。反复冻溶 Proteinase K 会影响其活性。
- 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。

方案 1. 单管式小体积病毒 RNA/DNA 离心抽提 (R4173)

该方案采用离心操作，适合于从 200 μ l 无细胞液体样品，如血清、血浆、牛奶、体液、无细胞培养液上清中抽提病毒 DNA 和 RNA。以下离心条件都在室温下进行。

1. 转移 20 μ l Proteinase K 至 1.5ml 离心管中。
2. 转移 200 μ l 样品，如血清、血浆、尿液、无细胞培养液上清、或体液至装有 Proteinase K 的离心管中，振荡混匀 10 秒。
咽/口腔拭子，或固体组织样品先用 Buffer PBS 浸泡或匀浆后，离心取上清进行操作。
3. **转移 200 μ l Buffer AL/Carrier RNA 至样品中，涡旋混匀 20 秒；**
使用前，按每 1ml Buffer AL 加入 1.5 μ l Carrier RNA(1 μ g/ μ l)。该混合液室温可保存 2 天。
4. 56 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟消化样品。
5. **加入 250 μ l 无水乙醇至裂解液中，涡旋混匀 20 秒。室温静置 5 分钟。**
6. 把 HiPure Viral Mini Column 装在 2ml 收集管中。**转移混合液至柱子中。**8,000 \times g 离心 30-60 秒。
7. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer VHB(已用无水乙醇稀释)至柱子中。**8,000 \times g 离心 30-60 秒。
使用前 Buffer VHB 必须按瓶子标签所示用无水乙醇稀释。
8. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。**8,000 \times g 离心 30-60 秒。
使用前 Buffer RW2 必须按瓶子标签所示用无水乙醇稀释。
9. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。**8,000 \times g 离心 30-60 秒。
10. 倒弃滤液把柱子套回收集管。13,000 \times g 离心空柱 3 分钟甩干柱子。
11. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。**加入 15-30 μ l Nuclease Free Water 至柱子的膜中央。**13,000 \times g 离心 1 分钟。
12. 弃去柱子，把 DNA/RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

方案 2. 单管式大体积病毒 RNA/DNA 负压抽滤方案 (R4174)

该方案采用负压抽滤方案，适合于从 1ml 无细胞液体样品中，如血清、血浆、培养液上清，尿液或体液中抽提病毒 DNA 和 RNA。

1. 转移 100 μ l Proteinase K 至 5ml 离心管中。
2. 转移 1ml 样品，如血清、血浆、尿液或体液至装有 Proteinase K 的离心管中。振荡混匀 10 秒。若样品体积小于 1ml，加入灭菌水补足。
咽/口腔拭子，或固体组织样品先用 Buffer PBS 浸泡或匀浆后，离心取上清进行操作。
3. **转移 1ml Buffer AL/Carrier RNA 至样品中，立即涡旋混匀 30 秒。**
使用前，按每 1ml Buffer AL 加入 3 μ l Carrier RNA(1 μ g/ μ l)。该混合液室温可保存一天。
4. 56 $^{\circ}$ C 水浴 15 分钟，期间颠倒混匀 2 次。
5. **加入 1ml 无水乙醇至裂解液中。**涡旋混匀 30 秒，室温静置 5 分钟。
6. 连接好真空泵和抽滤盒。
7. 把 HiPure Viral Mini Column 柱子插到抽滤盒的接口处。
8. 把第 5 步获得的混合液转移至柱子中。打开真空泵进行抽滤，继续把剩余混合液转入柱子中直到所有混合液转移至柱子中并过滤。
9. 溶液过滤完毕后，**加入 500 μ l Buffer VHB(已用无水乙醇稀释)至柱子中。**
10. 溶液过滤完毕后，**加入 500 μ l Buffer RW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。**
使用前 Buffer RW2 必须按瓶子标签所示用无水乙醇稀释。
11. 溶液过滤完毕后，**再加入 500 μ l Buffer RW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。**过滤完毕，关闭真空泵。
12. 取下柱子并套在收集管中。13,000 \times g 离心 3 分钟干燥柱子。
13. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。**加入 30-50 μ l Nuclease Free Water 至柱子的膜中央。**室温静置 2 分钟。室温，13,000 \times g 离心 1 分钟。
14. 弃去柱子，把 DNA/RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

方案 3. 96 孔板病毒 RNA/DNA 离心方案 (R4175)

该方案适合于高通量地从 96 个无细胞液体样品，如血清、血浆、牛奶或体液中抽提病毒 DNA 和 RNA。以下离心条件都在室温下进行。

1. 在 96 孔深孔板中，每孔中加入 20 μ l Proteinase K。
2. 转移 150-200 μ l 样品，如血清、血浆、唾液、培养液上清、或其它体液至装有 Proteinase K 的离心管中，振荡混匀 10 秒。
3. **转移 200 μ l Buffer AL/Carrier RNA 至样品中，振荡混匀 1 分钟。**
使用前，按每 1ml Buffer AL 加入 15 μ l Carrier RNA(1 μ g/ μ l)。该混合液室温可保存一天。
4. 56 $^{\circ}$ C 放置 10 分钟，期间振荡混匀一次。
5. **加入 250 μ l 无水乙醇至裂解液中。**振荡混匀 1 分钟。
6. 把 HiPure DNA Plate 放在 1.6ml 收集板上。转移混合液至结合板中。3,000 \times g 离心 3 分钟。
7. 倒弃收集板中的滤液。把结合板放回收集板中。**转移 0.6ml Buffer VHB(已用无水乙醇稀释)至每一个孔中。**3,000 \times g 离心 3 分钟。
8. 倒弃收集板中的滤液。把结合板放回收集板中。**转移 0.6ml Buffer RW2 (已用无水乙醇稀释)至每一个孔中。**3,000 \times g 离心 3 分钟。
9. 倒弃收集板中的滤液。把结合板放回收集板中。**转移 0.6ml Buffer RW2 (已用无水乙醇稀释)至每一个孔中。**3,000 \times g 离心 3 分钟。
10. 倒弃收集板中的滤液。把结合板放回收集板中。3,000 \times g 离心 15 分钟。
11. 把 DNA 结合板放在 1.2ml 收集板中。加入 60-80 μ l 至膜的正中央。室温静置 2 分钟。3,000 \times g 离心 3 分钟。
12. 弃去结合板。用盖子盖好 96 孔板。把 DNA/RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

方案 4. 96 孔板病毒 RNA/DNA 负压抽滤方案 (R4175)

该方案采用负压抽滤方法，适合于从 96 个无细胞液体样品，如血清、血浆、牛奶或体液中抽提病毒 DNA 和 RNA。

1. 按方案 1 的第 1-5 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. 盖上真空抽滤盒上盖，把 HiPure DNA Plate 放在上盖的内槽中。连接好真空泵和真空抽滤盒。
4. 把第 5 步获得的混合液转移至结合板中。打开真空泵，抽滤 2 分钟。
5. 每孔中加入 700 μ l Buffer VHB(已用无水乙醇稀释)。抽滤 2 分钟。
6. 每孔中加入 700 μ l Buffer RW2(已用无水乙醇稀释)。抽滤 2 分钟。
7. 每孔中加入 700 μ l Buffer RW2(已用无水乙醇稀释)。抽滤 2 分钟。
8. 每孔中加入 500 μ l 无水乙醇。抽滤 2 分钟。
9. 关闭真空泵，当压力降至零度时，取下 RNA 结合板，在一叠吸水纸上用力垂直拍打 5-10 次。
10. 把结合板放回抽滤盒中。打开真空泵，最大压力抽滤 15 分钟干燥结合板。
11. 关闭真空泵。取下抽滤盒上盖。把废液槽的废液倒弃。把 1.2ml 收集板放在抽滤盒中。盖好上盖。调整结合板的位置，使其底部的出口插到 1.2ml 收集板中。
12. 加入 75-100 μ l Nuclease Free Water 至结合板的膜中央。室温静置 5 分钟。打开真空泵抽滤 3 分钟。
13. 弃去 RNA 结合板。用盖子盖好 96 孔板。把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

附加流程. 从全血样品中提取总 DNA/RNA

该方案采用离心操作，适合于从 100 μ l 全血样品中提取基因组 DNA、病毒 DNA、细菌 DNA 以及病毒 RNA。以下离心条件都在室温下进行。

1. 转移 20 μ l Proteinase K 至 1.5ml 离心管中。
2. 转移 100 μ l 抗凝全血样品至装有 Proteinase K 的离心管中，振荡混匀 10 秒。咽/口腔拭子，或固体组织样品先用 Buffer PBS 浸泡或匀浆后，离心取上清进行操作。
3. **转移 200 μ l Buffer AL 至样品中，涡旋混匀 20 秒。**
4. 55 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟消化样品。
5. **加入 150 μ l 无水乙醇至裂解液中，涡旋混匀 20 秒。室温静置 5 分钟。**
6. 把 HiPure Viral Micro Column 装在 2ml 收集管中。**转移混合液至柱子中。**8,000 \times g 离心 30-60 秒。
7. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer VHB(已用无水乙醇稀释)至柱子中。**8,000 \times g 离心 30-60 秒。
使用前 Buffer VHB 必须按瓶子标签所示用无水乙醇稀释。
8. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。**8,000 \times g 离心 30-60 秒。
使用前 Buffer RW2 必须按瓶子标签所示用无水乙醇稀释。
9. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。**8,000 \times g 离心 30-60 秒。
10. 倒弃滤液把柱子套回收集管。13,000 \times g 离心空柱 3 分钟甩干柱子。
11. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。**加入 15-30 μ l Nuclease Free Water 至柱子的膜中央。**13,000 \times g 离心 1 分钟。
12. 弃去柱子，把 DNA/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。另外，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
核酸产量低或无	
Carrier RNA 没有加到 Buffer AL 中	Carrier RNA 可提取 RNA 的回收效率。用 DEPC 水溶解 Carrier RNA 固体至终浓度为 1 µg/µl。加入适量的 Carrier RNA 至 Buffer AL。
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。Buffer AL/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。
Buffer AL 裂解能力下降	Buffer AL/Carrier RNA 在低温保存时，可能会有沉淀析出，使用前必须在 70°C 短暂水浴让沉淀溶解并恢复室温后使用。水浴时间不能超过 3 分钟。
乙醇用量不对	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 Nuclease Free Water 的用量以提高 RNA 的浓度。
RNA 产量太低或无	参见上面

盐类污染

加入 Buffer RW2 后，静置 5 分钟再离心。

乙醇污染

确保按照说明书中的条件进行操作，如 Mini kit 空柱离心时速度确保大于等于 12,000xg，离心时间为 2 分钟。

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。