

## HiPure Viral RNA/DNA Midi Kit

### 病毒总核酸中提试剂盒

本产品适合于从抗凝血液、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	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
Support Tube	10	50	250
Extender Tubes	10	50	250
50ml Centrifuge Tube	10	50	250
Buffer ACL	25 ml	120 ml	550 ml
Carrier RNA	120 µg	310 µg	3 x 310 µg
Proteinase K Solutuion	1.2 ml	6.0 ml	27 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。Carrier RNA 干粉室温运输和保存, 长期保存建议保存于-20~-8℃。

## 准备事项

- 无水乙醇(96-100%)
- 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。
- Carrier RNA 固体使用前必须用 Nuclease Free Water 至 1µg/µl, 涡旋 30 秒, 保存-20℃。  
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℃。
- (组织样品)匀浆器
- (可选)Buffer PBS

## 实验步骤

1. 转移 100 $\mu$ l Proteinase K 至 15ml 离心管中。
2. 转移 1~2ml 待检样品，如血清、血浆、细胞培养液上清、组织匀浆液上清等无细胞液体样品至装有 Proteinase K 的离心管中，混匀 5 秒
3. 加入等倍样品体积的 Buffer ACL 和 5 $\mu$ l Carrier RNA 至样品中，颠倒混匀 6-8 次，55 度温育 15-30 分钟。
4. 加入等倍样品体积的无水乙醇至样品中，颠倒混匀 6-8 次，冰上放置 5 分钟。
5. 把 Extender Tubes 插到 HiPureViral Mini Column 中，然后再 Column 插到 Support Tube 中。把三个连接好的组件一起放到 50ml Collection Tube 中。
6. 把第 4 步的混合液倒入 Extender Tubes 中，盖上盖子。3,000  $\times$  g 离心 5 分钟。
7. 打开离心管的盖子，倒弃 Extender Tube、密封圈和 Support Tube。
8. 把 HiPure Viral Mini Column 装在 2ml 收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer VHB(已用乙醇稀释)至柱子中。12,000  $\times$  g 离心 30 秒。
9. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。12,000  $\times$  g 离心 30 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。
10. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。12,000  $\times$  g 离心 30 秒。
11. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。12,000  $\times$  g 离心空柱 3 分钟甩干柱子的基质。
12. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中。加入 15~50 $\mu$ l RNASE Free Water 至柱子的膜中央。室温静置 1 分钟。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。丢弃 RNA 柱子，把总 RNA(含小分子 RNA)样品保存-80 $^{\circ}$ C。

当 RNA 总量高于 10 $\mu$ g 时，OD260/230 一般都在 1.3-2.2；当 RNA 总量在 5~10 $\mu$ g 时，A260/230 会在 1.0~2.0；当 RNA 总量低于 3 $\mu$ g，A260/230 会低于 1。这是因为 Buffer ACL

含异硫氰酸胍，以及玻璃滤膜有吸水性或本底吸附。异硫氰酸胍在 230nm 有强烈吸光值，因此 A260/230 主要受该胍盐影响，而不是来源于样品。研究表明，低浓度异硫氰酸胍不影响反转录，定量 RT-PCR，二代测序等相关应用。出现 260/230 在 0.2-1.0 时，可以忽略并直接用于反转录等下游应用。

## 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 1~2ml。尽量使用无细胞的样品，如血浆、血清、组织匀浆液的上清等。
- **延长消化时间：**加入 Buffer ACL 后，延长室温静置时间。
- **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 ACL 不能预先混合。

### 2. 下游应用结果不理想

- **样品被反复解冻：**避免反复冻融样品。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。
- **盐分残留：**重复用 500 $\mu$ l Buffer RW2 洗涤柱子。
- **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。