

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。
- HiPure Viral RNA/DNA 96 Kit 采用 96 孔板，适合于从 96 个 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。

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
Extender 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，把 Extender Tubes 插到柱子中。
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。