

HiPure Viral RNA/DNA Kit

病毒总核酸抽提试剂盒

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	R4173-01	R4173-02	R4173-03
纯化次数	20 次	50 次	250 次
HiPure Viral Micro Columns	20	50	250
2ml Collection Tubes	20	50	250
Proteinase K	12 mg	24 mg	120 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	15 ml
Carrier RNA	120 µg	310 µg	3 x 310 µg
Buffer AL	6 ml	15 ml	60 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	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 AL 可能会有沉淀形成，需 55℃ 水浴让沉淀完全溶解。Proteinase K/Carrier RNA 干粉室温运输和保存，长期保存建议保存于-20~8℃，溶解后的 Proteinase K/Carrier RNA 需保存于-20℃。

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 。
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml，轻轻颠倒让蛋白酶 K 充分溶解。Proteinase K 干粉可在室温下保存一年，但溶解的 Proteinase K 须分装保存于 $-20\sim 8^{\circ}\text{C}$ 。
- 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 20 μl Proteinase K 至 1.5ml 离心管中。
2. 转移 200 μl 样品，如血清、血浆、尿液、培养液上清、或其它无细胞体液至装有 Proteinase K 的离心管中，振荡混匀 5 秒。若样品不足 200 μl ，用 Buffer PBS 或 Nuclease Free Water 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 200 μl Buffer AL/Carrier RNA 至样品中，涡旋混匀 15 秒。
使用前，按每 1ml Buffer AL 加入 1.5 μl Carrier RNA($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$)。该混合液室温可保存 2 天。
4. 56°C 水浴 10 分钟。
5. 加入 250 μl 无水乙醇至裂解液中，涡旋混匀 15 秒。室温静置 3 分钟。

6. 把 HiPure Viral Micro Column 装在 2ml 收集管中。转移混合液至柱子中。10,000 \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。10,000 \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。10,000 \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。10,000 \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

1. 柱子堵塞

- **样品用量太多：**处理动物抗凝血时，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 $^{\circ}$ C。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°C。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°C 后再进行洗脱, 有利于提高 DNA 得率。