

目 录

简 介	2
原 理	2
保质期	2
试剂盒组成	3
准备工作	4
柱式操作(D3191)	
方案 1:从液体样品中提取病毒 DNA	5
方案 2:从固体样品中提取病毒 DNA	6
方案 3:负压抽滤方案	7
96 孔板操作(D3192)	
方案 4:从液体样品中提取病毒 DNA	8
方案 5:从固体样品中提取病毒 DNA	9
方案 6:负压抽滤方案	11
常见问题回答	12

版本: 2010-01

简介

HiPure Viral DNA Kits 为血清、血浆、牛奶、细胞培养液上清、以及各种无细胞体液样品的病毒 DNA 提取提供了一个简单快速的解决方案。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，整个提取过程只需 30-60 分钟。得到的 DNA 可直接用于 PCR、定量 PCR、Southern Blot、芯片分析等实验。

- HiPure Viral DNA Kit 采用硅胶柱,适合于处理 1 个至多个样品的抽提。
- HiPure Viral DNA 96 Kit 采用 96 孔硅胶板, 适合于同时处理 96 个样品。

原理

HiPure 硅胶柱是采用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作用吸附核酸, 而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除蛋白质和盐, 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。

试剂盒基于硅胶柱纯化方式。血清, 血浆或无细胞液体样品在裂解液和蛋白酶作用下裂解消化, 病毒 DNA 释放到裂解液中。加入乙醇后, 转移至柱子中过滤, DNA 被吸附至柱子的膜上, 而蛋白质则不被吸附而随而滤液流出去除。柱子经 Buffer GW1 洗涤蛋白质和其它杂质, 经 Buffer GW2 洗涤去除盐分, 最后 DNA 被低盐缓冲液洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于荧光定量 PCR、Southern blot, 基因芯片分析等实验。

保质期

本产品室温(15~25℃)可保存 18 个月。Proteinase K/Carrier RNA 干粉室温运输和保存, 收到产品后, 建议保存于-20~8℃。溶解后的 Proteinase K/Carrier RNA 需保存于-20~8℃。低温下, Buffer ACL 可能会有沉淀形成, 需 55℃水浴让沉淀完全溶解。

注: 本产品 2019 年 10 月进行升级, 将 Buffer ACL 升级为 Buffer ACL, 以提升复杂样品的提取能力。

组 成

HiPure Viral DNA Mini Kit

产品编号	D3191-01	D3191-02	D3191-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure Viral Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer ACL	3 ml	30 ml	100 ml
Buffer GW1 *	6.6 ml	13 ml	66 ml
Buffer GW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Carrier RNA	120 µg	310 µg	3 x 310 µg
Proteinase K	6 mg	24 mg	120 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	15 ml
Elution Buffer	5 ml	15 ml	60 ml
说明书	1	1	1

HiPure Viral DNA 96 Kit

产品编号	D3192-01	D3192-02	D3192-03
纯化次数	1 x 96	4 x 96	20 x 96
HiPure gDNA Plate	1	4	20
1.6ml Collection Plate	1	4	20
0.5ml Elute Plate	1	4	20
Seal Films	1	4	20
Buffer ACL	30 ml	120 ml	500 ml
Buffer GW1 *	44 ml	2 x 110 ml	2 x 440 ml
Buffer GW2*	50 ml	2 x 100 ml	3 x 200 ml
Proteinase K	50 mg	180 mg	900 mg
Protease Dissolve Buffer	4 ml	15 ml	60 ml
Elution Buffer	30 ml	100 ml	2 x 200 ml
说明书	1	1	1

版本升级

本产品于 2019 年 10 月将 Buffer ACL 升级为 Buffer ACL。升级后的 Buffer ACL 在低浓度样品中，有更好的扩增曲线。

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 55℃水浴锅
- Proteinase K (20mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 至 Proteinase K 管中，使其终浓度为 20mg/ml。轻轻振荡混匀使之溶解，分装保存于-20℃。反复冻溶会影响其活性。
- Carrier RNA(1 μ g/ μ l): 加入适量的 Elution Buffer 至 Carrier RNA 干粉中，使其终浓度为 1 μ g/ μ l。涡旋溶解后分装保存于-80℃。反复冻融不要超过 3 次。
- 用无水乙醇稀释 Buffer GW1，并于室温保存。
- 用无水乙醇稀释 Buffer GW2，并于室温保存。

方案 1. 从液体样品中小量提取病毒 DNA(D3191)

该方案采用离心方案，适合于从血清，血浆，牛奶或其它无细胞的体液样品中提取病毒 DNA。

1. 在 1.5ml 离心管中加入 20 μ l Proteinase K。
2. 转移 250 μ l 血清、血浆或无细胞液体样品至装有 Proteinase K 的离心管中，振荡混匀。
若样品体积小于 250 μ l，用 Elution Buffer 调整总体积至 250 μ l。若样品体积超过 250 μ l，按比例扩大 Proteinase K, Buffer ACL 和无水乙醇的用量。
3. **加入 3 μ l Carrier RNA 和 250 μ l Buffer ACL 至样品中。** 涡旋混匀 15 秒，55 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟。
处理复杂的样品，于 10,000 \times g 离心 3 分钟去除固体杂质，转移上清至新的离心管中。(Buffer ACL 和 Carrier RNA 可预先混合，该混合液 2-8 $^{\circ}$ C 可保存两天。)
4. **加入 250 μ l 无水乙醇至样品中。** 涡旋混匀 15 秒。
处理复杂样品（粪便悬液/污水等富含抑制物的样品时），加入 90 μ l 异丙醇代替无水乙醇，涡旋混匀后，按第 5 步进行操作。
5. 把 DNA 柱装在收集管中。**转移混合液(<750 μ l)至柱子中。** 13,000 \times g 离心 30-60 秒。
6. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子中。** 13,000 \times g 离心 30-60 秒。
7. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 600 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中，** 13,000 \times g 离心 30-60 秒。
8. (可选)倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 600 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中，** 13,000 \times g 离心 30-60 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。13,000 \times g 离心空柱 3 分钟以甩干柱子的基质，这一步可彻底去除柱子中残留的乙醇。
10. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中。**加入 20-50 μ l Elution Buffer 至柱子的膜中央。** 静置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存-20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C。

方案 2. 从固体样品中小量提取病毒 DNA(D3191)

该方案采用离心方案，适合于从培养细胞或固体样品中提取病毒 DNA。

1. 样品预处理:

- **培养细胞:** 若病毒是分泌到培养液中，2,000xg 离心 5 分钟离心去除细胞，取 250 μ l 上清液按步骤 2 进行操作。若病毒是位于细胞内部，收集细胞后，加入 300 μ l Buffer NL，涡旋重悬裂解细胞。14,000 x g 离心 1 分钟去除细胞核，转移 250 μ l 上清液至 1.5ml 离心管中。按方案 2 进行操作；(Buffer NL 需另外订购。)
- **粪便样品:** 取 200mg 粪便样品至 1.5ml 离心管中，加入 1ml Buffer PBS，最高速度涡旋 1 分钟重悬粪便样品。13,000 x g 离心 5 分钟，转移 250 μ l 上清液至 1.5ml 离心管中。按方案 2 进行操作；
- **动物组织:** 取 100mg 组织样品，加入 1ml Buffer PBS，然后用玻璃匀浆器匀浆样品。14,000 x g 离心 3 分钟，转移 250 μ l 上清液至 1.5ml 离心管中。按方案 2 进行操作；
- **植物样品:** 取 100mg 植物样品，加入 1ml Buffer PBS，然后用研磨钵进行匀浆。14,000xg 离心 3 分钟，转移 250 μ l 上清液至 1.5ml 离心管中。按方案 2 进行操作；

2. 加入 20 μ l Proteinase K、3 μ l Carrier RNA 和 250 μ l Buffer ACL 至样品中。涡旋混匀 15 秒，55 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟，期间偶尔混匀 2-3 次。

处理复杂的样品，于 10,000 x g 离心 3 分钟去除固体杂质，转移上清至新的离心管中。(Buffer ACL 和 Carrier RNA 可预先混合，该混合液 2-8 $^{\circ}$ C 可保存两天。)

3. 加入 250 μ l 无水乙醇至样品中，涡旋混匀 15 秒。

处理复杂样品(粪便悬液/污水等富含抑制物的样品时)，加入 90 μ l 异丙醇代替无水乙醇，涡旋混匀后，按第 5 步进行操作。

4. 把 DNA 柱装在收集管中。转移混合液(<750 μ l)至柱子中。13,000 x g 离心 30-60 秒。

5. (可选：混合液超过 750 μ l) 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。转移剩余混合液至柱子中。13,000 x g 离心 30-60 秒。

6. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子中。13,000 x g 离心 30-60 秒。

注：Buffer GW1 使用之前，须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示。

7. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。加入 600 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中，13,000 \times g 离心 30-60 秒。
注：Buffer GW2 使用之前，须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示。
8. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。加入 600 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中，13,000 \times g 离心 30-60 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。13,000 \times g 离心空柱 3 分钟以甩干柱子的基质，这一步可彻底去除柱子中残留的乙醇。
10. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中。加入 20-50 μ l 预热至 56 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至柱子的膜中央。静置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
11. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C。

方案 3: 负压抽滤方案(D3191B)

该方案采用负压抽滤方法，适合于处理方案 1 和方案 2。

1. 按离心方案 1 的第 1-4 步，或方案 2 的第 1-3 步进行操作获得混合液。
2. 连接好真空泵和抽滤盒，把 DNA 柱子插到抽滤盒的接口处。
3. 把混合液转移至柱子中。打开真空泵进行抽滤，继续把剩余上清液转入柱子中。
4. 溶液过滤完毕后，加入 500 μ l Buffer GW1 至柱子中。
5. 溶液过滤完毕后，加入 600 μ l Buffer GW2 至柱子中；
6. 溶液过滤完毕后，再加入 600 μ l Buffer GW2 至柱子中。过滤完毕，关闭真空泵；
7. 取下柱子并套在收集管中。13,000 \times g 离心空柱 3 分钟以甩干柱子的基质。
8. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中。加入 20-50 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至柱子的膜中央。静置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
9. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C。

方案 4. 从液体样品中高通量提取病毒 DNA(D3192)

该方案采用离心方案, 适合于从 96 个血清、血浆、尿液、牛奶等无细胞液体样品中提取病毒 DNA。

1. 加入 20 μ l Proteinase K 至 2ml 96 孔板中的每一个孔中。
2. **转移 300 μ l 血清、血浆或无细胞液体样品至装有 Proteinase K 的 96 孔板中。** 涡旋混匀 10 秒。若样品体积不够 200 μ l, 用灭菌水补足。
3. **加入 3 μ l Carrier RNA 和 300 μ l Buffer ACL 至样品中。** 贴上封口膜, 振荡混匀 60 秒。55 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟, 期间偶尔振荡混匀 2-3 次。
注: Buffer ACL 和 Carrier RNA 可预先混合, 该混合液 2-8 $^{\circ}$ C 可保存两天。建议使用 IKA MS3 涡旋仪, 振荡速度设为 1500-2000rpm。
4. **加入 150 μ l 异丙醇至样品中。** 振荡混匀 60 秒。
注: 混匀时, 建议使用 IKA MS3 涡旋仪, 振荡速度设为 800-1000rpm。振荡速度不能过高, 否则裂解液会溢出孔口。
5. 把 96 孔结合板装在收集板中。**转移混合液至柱子中。** 4,000 \times g 离心 3 分钟。
6. 倒弃流出液, 把结合板装在收集板中。**加入 600 μ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上。** 4,000 \times g 离心 3 分钟。
7. 倒弃流出液, 把结合板装在收集板中。**加入 600 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。** 4,000 \times g 离心 3 分钟。
8. 倒弃流出液, 把结合板装在收集板中。**加入 600 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。** 4,000 \times g 离心 3 分钟。
9. 倒弃流出液, 把结合板装在收集板中。4,000 \times g 离心 15 分钟。
10. (可选)把结合板放置于 55 $^{\circ}$ C 烘箱中干燥 10 分钟。
11. 把结合板装在 0.5ml 收集板。**加入 75 μ l Elution Buffer 至柱子的膜中央。** 放置 5 分钟。4,000 \times g 离心 3 分钟。
12. 丢弃结合板, 用封口膜密封好保存板, 把 DNA 保存于-20 $^{\circ}$ C。

方案 5. 从固体样品中高通量提取病毒 DNA(D3192)

该方案采用离心方案，适合于从固体样品中提取病毒 DNA。

1. 样品预处理：

- a) **培养细胞：**若病毒是分泌到培养液中，500xg 离心 5 分钟离心去除细胞，转移 200 μ l 上清液至 2ml 96 孔板中。若病毒是位于细胞内部，加入 250 μ l Buffer NL，涡旋重悬细胞。2,000 x g 离心 5 分钟去除细胞核，转移 300 μ l 上清液至 2ml 96 孔板中。按步骤 2 进行操作；
- b) **粪便样品：**取 200mg 粪便样品至 1.5ml 离心管中，加入 1ml Buffer PBS，最高速度涡旋 1 分钟重悬粪便样品。10,000 x g 离心 5 分钟，转移 300 μ l 上清液至 2ml 96 孔板中。按步骤 2 进行操作；
- c) **动物组织：**取 100mg 组织样品至 1.6ml 深孔板中，加入 1ml Buffer PBS 和一粒研磨球。用封口膜封住 96 孔板，并转移至珠磨仪上进行匀浆（详细参数照仪器说明书）。（可选 3,000 x g 离心 5 分钟。）转移 300 μ l 上清液或匀浆液至新的 1.6ml 96 孔板中。按步骤 2 进行操作；
- d) **植物样品：**取 100-200mg 植物样品，加入 1ml Buffer PBS，用研磨钵进行匀浆。10,000xg 离心 3 分钟，转移 300 μ l 上清液至 2.2ml 96 孔板中。按步骤 2 进行操作；

2. 加入 20 μ l Proteinase K 至每一孔中，振荡混匀 10 秒。
3. **加入 300 μ l Buffer ACL 至样品中。**振荡混匀 60 秒。55 $^{\circ}$ C 水浴 10 分钟。
4. **加入 100 μ l 异丙醇至样品中。**振荡混匀 60 秒或吸打混匀 5-10 次。
5. 把 96 孔结合板装在 1.6ml 收集板中。**转移混合液至 96 孔结合板中。**4,000 x g 离心 3 分钟。
6. 倒弃流出液，把 96 孔结合板装在收集板中。**加入 600 μ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上。**4,000 x g 离心 3 分钟。
7. 倒弃流出液，把 96 孔结合板装在收集板中。**加入 600 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**4,000 x g 离心 3 分钟。
8. 倒弃流出液，把 96 孔结合板装在收集板中。**加入 600 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱**

子中。4,000 × g 离心 3 分钟。

9. 倒弃流出液，把 96 孔结合板装在收集板中。4,000 × g 离心 10 分钟。
10. (可选)把结合板放置于 55°C 烘箱中干燥 10 分钟。
11. 把结合板装在 0.5ml 收集板。**加入 100µl Elution Buffer 至柱子的膜中央。**放置 3 分钟。4,000 × g 离心 3 分钟。
12. 丢弃结合板，用封口膜密封好保存板，把 DNA 保存于-20°C。

方案 6: 负压抽滤方案(D3192)

该方案采用负压抽滤方案, 适合于从血清、血浆、尿液、牛奶等无细胞液体样品中提取病毒 DNA。

1. 按方案 4 第 1-4 步、或方案 5 的第 1-4 步进行样品裂解、消化以及调节结合条件;
2. 连接好抽滤盒与真空泵; 把废液收集槽放置在真空抽滤盒的底盒中;
3. 盖上真空抽滤盒上盖, 把 96 孔结合板放置真空抽滤盒的上盖中;
4. 把混合液转移至 96 孔板中; 打开真空泵, 用手用力压住 96 孔板, 当真空泵压力上升后, 轻开手。抽滤 3-5 分钟让裂解液完全过滤。
5. 关闭真空泵。每孔中**加入 600 μ l Buffer GW1**(已用乙醇稀释)。打开真空泵, 用手用力压住 96 孔板, 当真空泵压力上升后, 轻开手。抽滤 3 分钟让裂解液完全过滤。
6. 关闭真空泵。每孔中**加入 600 μ l Buffer GW2**(已用乙醇稀释)。打开真空泵, 用手用力压住 96 孔板, 当真空泵压力上升后, 轻开手。抽滤 3 分钟让裂解液完全过滤。
7. 关闭真空泵。每孔中**加入 600 μ l Buffer GW2**(已用乙醇稀释)。打开真空泵, 用手用力压住 96 孔板, 当真空泵压力上升后, 轻开手。抽滤 3 分钟让裂解液完全过滤。
8. 关闭真空泵, 取下 96 结合板在吸水纸上轻轻拍打几次。把 96 结合板放回抽滤盒中。打开真空泵, 以最大的压力抽滤 15 分钟以干燥 96 孔板。
9. 关闭真空泵, 打开真空抽滤盒, 取出废液收集槽, 把 0.5ml 收集板放在抽滤盒底部, 盖回上盖。
10. **每孔加入 100 μ l Elution Buffer 至膜中央**。室温放置 3 分钟。打开真空泵, 用手用力压住 96 孔板, 当真空泵压力上升后, 轻开手。抽滤 3 分钟。关闭真空泵。
11. 取出收集板, 贴上封口膜。把 DNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C, 长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C。

常见问题解答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。Magen 的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学上碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽全力为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
DNA 产量低	
样品 DNA 含量低	处理无细胞的体液时可用超滤柱浓缩至 250 μ l。
柱子堵塞	样品用量太多，或 Proteinase K 活性下降
加入 Buffer ACL 后没有充分涡旋混匀	重新提取，并确保加入 Buffer ACL 后，立即以最高速度涡旋 30 秒让样品与 Buffer ACL 充分混匀。
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 $^{\circ}$ C。分装保存 Proteinase K，避免反复冻融。
洗脱效率不够	洗脱时 Elution Buffer 加到膜中央，室温放置 3 分钟。增加洗脱的体积。
Buffer GW1 和 Buffer GW2 中乙醇没有加入或加量不够	按说明书或瓶子标签所示，加入正确的乙醇。
柱子没有空甩	柱子必须甩 2 分钟以去除膜上残留的乙醇。
OD260/OD280 比值不正常	
核酸浓度很低	病毒核酸很低，通过紫外分光光度计测量时不在可信范围，读数不可信。
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 $^{\circ}$ C。分装保存 Proteinase K，避免反复冻融。
下游应用不理想	
乙醇污染	确保空柱离心时速度 12,000 \times g，离心时间为 2 分钟。
膜材料脱落	硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落的颗粒是不溶解的，可通过 12,000 \times g 离心 2 分钟去除。