

## HiPure Pathogen RNA/DNA Kit

### 病原总核酸抽提试剂盒

本产品适合于从血清、血浆、体液、培养液、组织匀浆液、拭子等样品中提取病毒 RNA 和 DNA、游离 DNA 以及微生物 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	R4179-01	R417902	R4179-03
纯化次数	20 次	50 次	250 次
Glass Beads(0.1-0.6mm)	5 g	15 g	70 g
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
DNase Mixture	0.25 ml	0.6 ml	5 x 0.6 ml
DNase Buffer	6 ml	6 ml	30 ml
Buffer CLB	20 ml	60 ml	270 ml
Buffer ACL	15 ml	40 ml	200 ml
Buffer VHB*	6.6 ml	13 ml	66 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
Nuclease Free Water	30 ml	60 ml	250 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 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 需保存于-20℃。

## 准备事项

- 无水乙醇(96-100%)
- 离心管
- 无 RNA 酶的枪头
- 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-20~8℃。
- 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. 按以下方式进行前处理:

**抗凝血液:** 转移 1.0~1.2ml 全血至 2ml 离心管中, 2,000 x g 离心 10 分钟, 转移血浆至新的离心管中, 用于病毒总核酸和游离 DNA 制备。下层部分用于微生物 DNA 富集提取。

**大体积的血浆/腹水样品等:** 取 1.5-5ml 血浆/腹水/积液样品至 2-5ml 离心管中, 13,000 x g 离心 10 分钟收集微生物和细胞。转移全部上清液至新的离心管中, 备用, 用于病毒总核酸和游离 DNA 制备。沉淀部分用于微生物 DNA 富集提取。

**组织样品:** 取 50-100mg 组织样品, 用 1ml 生理盐水或 Buffer PBS 进行充分匀浆, 于 13,000 x g 离心 10 分钟收集微生物和细胞。转移全部上清液至新的离心管中, 备用, 用于病毒总核酸制备。沉淀部分用于微生物 DNA 富集提取。

**痰液:** 取适量的痰液, 加入适量的生理盐水或 Buffer PBS, 剧烈涡旋样品, 于 2,000

x g 离心 10 分钟，转移~0.5ml 上清用于病毒总核酸提酸。余下部分用于微生物 DNA 富集提取。加入适量的 DTT 至余下的部分样品中进行液化，充分液化后，于 13,000 x g 离心 10 分钟收集微生物和细胞。

2. 加入 1ml Buffer CLB 至沉淀中，涡旋打散沉淀，室温放置 10 分钟裂解真核细胞。13,000 x g 离心 10 分钟收集微生物，小心吸弃上清液。
3. 加入 450ul Nuclease Free Water 至沉淀中，涡旋悬液样品。
4. 加入 50ul DNase Buffer 和 10ul DNase Mixture 至悬液中，室温放置 30 分钟消化细胞 DNA 和 RNA。13,000 x g 离心 10 分钟收集微生物，小心吸弃上清液[上清含宿主细胞 DNA 片段]。
5. 加入 150ul Buffer ATL 和~200mg 混合玻璃珠 (0.1-0.6mm)至样品中，于涡旋仪上高速涡旋 10 分钟裂解微生物。
6. 短暂离心，转移上清至新的离心管中，加入 600ul Buffer ACL 至上清液中，颠倒混匀。
7. 加入 450ul 血浆等病毒上清（第 1 步保留的上清部分）至装有 ACE 的离心管中，颠倒混匀。
8. 加入 20ul Proteinase K，颠倒混匀，55 度处理 30 分钟。
9. 加入 600ul 无水乙醇于样品中，颠倒混匀。
10. 把 HiPure Viral Micro Column 装在 2ml 收集管中。转移 750ul 混合液至柱子中。10,000 x g 离心 30-60 秒。
11. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。把余下的混和液转移至柱子中。10,000 x g 离心 30-60 秒。
12. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500ul Buffer VHB(已用无水乙醇稀释)至柱子中。10,000 x g 离心 30-60 秒。
13. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500ul Buffer RW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。10,000 x g 离心 30-60 秒。
14. 倒弃滤液把柱子装回收集管。加入 500ul Buffer RW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。10,000xg 离心 30-60 秒。
15. 倒弃滤液把柱子套回收集管。13,000 x g 离心空柱 3 分钟甩干柱子。

16. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。加入 15~30 $\mu$ l Nuclease Free Water 至柱子的膜中央。13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
17. 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**：处理动物抗凝血液时，样品量控制在 100~150 $\mu$ 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 ACL 混匀不充分。重新提取，加入 Buffer ACL 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 后再进行洗脱，有利于提高 DNA 得率。