

## HiPure Viral RNA/DNA 96 Kit

病毒总核酸抽提试剂盒

### 产品简介

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                     | R4175-01   | R4175-02   |
|--------------------------|------------|------------|
| 纯化次数                     | 96 次       | 4 × 96 次   |
| HiPure Viral Plate       | 1          | 4          |
| 1.6ml Collection Plate   | 1          | 4          |
| 0.5ml Elute Plate        | 1          | 4          |
| Seal Film                | 2          | 8          |
| Buffer AL                | 30 ml      | 100 ml     |
| Carrier RNA              | 2 × 310 µg | 6 × 310 µg |
| Proteinase K             | 50 mg      | 170 mg     |
| Protease Dissolve Buffer | 5 ml       | 15 ml      |
| Buffer VHB*              | 44 ml      | 2 × 110 ml |
| Buffer RW2*              | 50 ml      | 3 × 50 ml  |
| Nuclease Free Water      | 30 ml      | 120 ml     |
| 说明书                      | 1          | 1          |

## 保存条件

本产品可在室温(15-25°C)保存 18 个月，长期保存时需置于 2-8°C。

## 需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- (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 $\mu$ g/ $\mu$ 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. 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 $\mu$ l Proteinase K。
2. 转移 200 $\mu$ 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 96 孔板，混匀 10 秒。
3. 转移 200 $\mu$ l Buffer AL/Carrier RNA 至样品中，贴上封口膜，900-1200rpm 振荡混匀 1~2 分钟。  
使用前，按每 1ml Buffer AL 加入 15 $\mu$ l Carrier RNA(1 $\mu$ g/ $\mu$ l)。该混合液室温可保存一天。
4. 56°C 放置 10 分钟。
5. 加入 250 $\mu$ l 无水乙醇至裂解液中，贴上封口膜，900-1200rpm 振荡混匀 1~2 分钟。

6. 取出 HiPure Viral Plate 放置于 1.6ml 收集板上，转移全部混合液至 HiPure Viral Plate。  
3,000~4,000 × g 离心 3 分钟。
7. 倒弃滤液，把 HiPure Viral Plate 放回 1.6ml 收集板上，加入 700µl Buffer VHB 至结合板。  
3,000~4,000 × g 离心 3 分钟。
8. 倒弃滤液，把 HiPure Viral Plate 放回 1.6ml 收集板上，加入 700µl Buffer RW2 至结合板。  
3,000~4,000 × g 离心 3 分钟。
9. 倒弃滤液，把 HiPure Viral Plate 放回 1.6ml 收集板上，加入 700µl Buffer RW2 至结合板。  
3,000~4,000 × g 离心 3 分钟。
10. 倒弃滤液，把 HiPure Viral Plate 放回 1.6ml 收集板上，3,000~4,000 × g 离心 10 分钟。
11. 取下 HiPure Viral Plate，室温放置 10~15 分钟晾干 96 孔板。
12. 将 HiPure Viral Plate 至新的 0.5ml 收集管上，加入 75~100µl Nuclease Free Water 至的膜中央。室温静置 3 分钟，3,000~4,000 × g 离心 3 分钟。
13. 弃去 96 孔板，贴上封口膜，把 DNA/RNA 保存于-20°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。盖上真空抽滤盒上盖，把 HiPure Viral Plate 放在上盖的内槽中。连接好真空泵和真空抽滤盒。
3. 把第 5 步获得的混合液转移至结合板中。打开真空泵，抽滤 3 分钟。
4. 每孔中加入 700µl Buffer VHB(已用无水乙醇稀释)，抽滤 3 分钟。
5. 每孔中加入 700µl Buffer RW2(已用无水乙醇稀释)，抽滤 2 分钟。
6. 每孔中加入 700µl Buffer RW2(已用无水乙醇稀释)，抽滤 5 分钟。

7. 关闭真空泵，当压力降至零度时，取下结合板，在一叠吸水纸上用力垂直拍打 7-8 次使孔壁的液滴流出。
8. **把结合板重新放回抽滤盒中。打开真空泵，继续抽滤 10~15 分钟。**
9. 移开抽滤盒的上盖，倒弃废液槽中的液体。把 500 $\mu$ l 收集板放在抽滤盒的内槽中，盖上抽滤盒的上盖，调整结合板的位置，使之结合板底部的每个突出部分都插入收集板。
10. **加入 100~150 $\mu$ l Nuclease Free Water 至结合板的膜中央，静置 2 分钟。**打开真空泵抽滤 3 分钟，关闭真空泵。
11. 取出洗脱板上贴上封口膜，把质粒保存于 4 $^{\circ}$ C 或 -20 $^{\circ}$ C。

## 常见问题

### 1. 柱子堵塞

#### ● 样品用量太多

- 抗凝血液：样品量控制在 50 $\mu$ l。尽量血浆、血清或其它无细胞样品。
- 组织样本：用生理盐水充分匀浆，10,000  $\times$  g 离心 3 分钟取上清进行抽提。
- 精液样品：用等体积生理盐水稀释，10,000  $\times$  g 离心 3 分钟取上清进行抽提。
- **样品裂解不充分**：样品与 Buffer VLF 混匀不充分。重新提取，加入 Buffer VLF 后先颠倒混匀 3~5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer VLF 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。
- **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。