

## HiPure Pathoen RNA/DNA Kit

### 病原总核酸提取试剂盒

#### 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原总 RNA 和 DNA，包括病毒DNA和RNA，以及细菌DNA和RNA，真菌DNA和RNA，以及宿主细胞总DNA和RNA。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。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	R4176-01	R4176-02	R4176-03
纯化次数	20 次	50 次	250 次
匀浆管 C	20	50	250
HiPure Viral Micro Columns	20	50	250
2ml Collection Tubes	20	50	250
Proteinase K Solution	0.5 ml	1.2 ml	6.0 ml
Buffer MlBN	15 ml	30 ml	150 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。

## 准备事项

- 无水乙醇(96-100%)
- 离心管
- 无 RNA 酶的枪头
- Buffer RV2 使用前必须用无水乙醇稀释，并于室温保存。
- Buffer VHB 使用前必须用无水乙醇稀释，并于室温保存。

## 实验步骤

1. 在 2ml 匀浆管 C 中，加入 20 $\mu$ l Proteinase K 和 400~500 $\mu$ l 待检样品，如全血、血清、血浆、培养液、分泌液、拭子浸泡液，匀浆液等样品，盖紧盖子。  
**组织样品：**把组织样品处理成小碎片，转移 10-50mg 组织样品至匀浆管 C 中，加入 20 $\mu$ l Proteinase K 和 500 $\mu$ l Buffer TE、Buffer PBS 或生理盐水。  
**大体积样品：**取 1.5-5.0ml 血浆/腹水/积液样品至 2-5ml 离心管中，13,000 $\times$ g 离心 10 分钟收集微生物和细胞，倒弃上清液，余下 500 $\mu$ l 残液或细胞沉淀，涡旋重悬后待用。  
**痰液：**取适量痰液，加入 2-4 倍 0.1% DTT 进行液化，13,000 $\times$ g 离心 10 分钟收集微生物和细胞，倒弃上清液，余下 500 $\mu$ l 残液或细胞沉淀，涡旋重悬后待用。  
**富含色素或抑制因子样品：**如粪便、土壤、或其它环境类样品，建议使用 R4176B。
2. 根据实验室条件，选择涡旋仪或珠磨仪进行珠磨裂解。
  - 涡旋仪：把样品插到涡旋仪中，最高速度涡旋 5-10 分钟。推荐使用美基涡旋仪 MagMix A，这台涡旋仪带 2ml 离心管的夹具，可一次高效处理 10~20 个样品。
  - Powerlyzer 珠磨仪：建议 2000rpm 珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 2000rpm 珠磨 30 秒。
  - FastPrep24 珠磨仪：建议 5m/s，珠磨 30 秒，暂停 30 秒，再 5m/s 珠磨 30 秒。
  - Tissue Lysis II 珠磨仪：建议 25Hz 珠磨 5 分钟，重新调整位置后再 25Hz 珠磨 5 分钟。
3. 室温或 55 $^{\circ}$ C 静置 10 分钟进一步消化样品，12,000 $\times$ g 离心 1 分钟。  
处理血清、血浆、拭子浸泡液等样品时，无需离心。
4. 转移 250 $\mu$ l 匀浆液至 1.5ml 离心管中，加入 500 $\mu$ l Buffer MLB，涡旋混匀 5-10 秒。

5. 把 HiPure Viral Micro Column 装在 2ml 收集管中。转移全部混合液至柱子中。  
10,000 × g 离心 30-60 秒。
6. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500μl Buffer VHB(已用无水乙醇稀释)至柱子中。10,000 × 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。
7. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500μl Buffer RW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。10,000 × 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。
8. 倒弃滤液把柱子装回收集管。加入 500μl Buffer RW2(已用无水乙醇稀释)至柱子中。10,000×g 离心 30-60 秒。
9. 倒弃滤液把柱子套回收集管。13,000 × g 离心空柱 3 分钟甩干柱子。
10. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。加入 30~100μl Nuclease Free Water 至柱子的膜中央。13,000 × g 离心 1 分钟。
11. 弃去柱子，把 DNA/RNA 保存于-80℃。

## 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℃。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 x 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℃。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℃ 后再进行洗脱，有利于提高 DNA 得率。