

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	R4179-02	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	2.4 ml	15 ml
DNase I (Powder)	10 mg	10 mg	3 x 10mg
DNase Buffer	6 ml	6 ml	30 ml
Buffer CLB	25 ml	60 ml	270 ml
Buffer ATL	10 ml	30 ml	60 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 DNase I:** 每支加入 1 ml Protease Dissolve Buffer, 颠倒混匀 10~15 次充分溶解, 保存于 -20℃
- **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 A (富集)

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 × 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 × 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 × 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 $\times$ g 离心 10 分钟，转移~0.5ml 上清用于病毒总核酸提取。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 $\times$ 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 $\times$ 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 I 至悬液中，室温放置 30 分钟消化细胞 DNA 和 RNA。13,000 $\times$ 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 ACL 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 $\times$ 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 $\times$ 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 $\times$ 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 $\times$ 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。

10,000×g 离心 30-60 秒。

15. 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。

16. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。加入 15~30µl Nuclease Free Water 至柱子的膜中央。13,000 × g 离心 1 分钟。

17. 弃去柱子，把 DNA/RNA 保存于-80℃。

实验步骤 B（直接抽提）

1. 在 2ml 离心管中，加入~400mg 混合玻璃珠（0.1-0.6mm）。

2. 转移 400µl 样品至离心管中，加入 400µl Buffer ACL 至样品于，在涡旋仪上最高速度涡旋 10 分钟。

3. 短暂离心，转移消化液至新的离心管中，加入 20µl Proteinase K，颠倒混匀，60 度处理 10 分钟。

4. 加入 400µl 无水乙醇至样品中，颠倒混匀。

5. 把 HiPure Viral Micro Column 装在 2ml 收集管中。转移一半混合液至柱子中。10,000 × g 离心 30-60 秒。

6. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。把余下的混和液转移至柱子中。10,000 × g 离心 30-60 秒。

7. 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。

8. 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。

9. 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。

10. 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。

11. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。加入 15~30µl Nuclease Free Water 至柱子的膜中央。13,000 × g 离心 1 分钟。

12. 弃去柱子，把 DNA/RNA 保存于-80℃。