

## 目 录

简 介.....	2
原 理.....	2
试剂盒组成.....	3
保质期.....	3
准备工作.....	4
方案 1:病毒 RNA 抽提(离心方案).....	5
方案 2:病毒 RNA 抽提(抽滤方案).....	7
方案 3:大体积病毒 RNA 抽提.....	8
方案 4:病毒样品的浓缩.....	9
方案 5:病毒 DNA 的抽提.....	9
方案 6:固体样品病毒 RNA 的抽提.....	10
常见问题回答.....	11

版本: 2008-10

## 简介

HiPure Viral RNA Kit 适合于从无细胞体液或培养液等样品中纯化病毒 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，整个提取过程只需 25 分钟。试剂盒适合于从 1-560 $\mu$ l 无细胞液样品如血清、血浆、无细胞体液或培养液中提取病毒 RNA。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。

## 原理

HiPure 硅胶柱以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化学作用吸附核酸，而蛋白质和其它杂质则不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除残留的蛋白质和盐，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。

HiPure Viral RNA Kit 基于硅胶柱纯化方式。样品在裂解液中匀浆裂解，RNA 释放到裂解液中。裂解液中含有的高浓度异硫氰酸胍使内源性或外源性的 RNase 变性失活，RNA 受到保护不被降解。裂解液经离心去除不溶解的杂质，加入乙醇调节结合条件后，转移至柱子中过滤，RNA 被吸附上柱子的膜上，而蛋白质则不被吸附而去除。柱子经 Buffer VHB 洗涤蛋白质和其它杂质，经 Buffer RW2 洗涤去除盐分，最后 RNA 被 RNase-Free Water 洗脱。洗脱的 RNA 可直接用于 RT-PCR、Northern blot、poly-A 纯化、体外翻译等实验。

## 组 成

### HiPure Viral RNA Kit

产品编号	R4171-01	R4171-02	R4171-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure Viral Micro Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
Buffer VRL	10 ml	50 ml	200 ml
Carrier RNA	120 µg	310 µg	3 x 310 µg
Buffer VHB*	6.6 ml	13 ml	110 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

## 保 质 期

HiPure Viral RNA Kit 试剂盒可在室温下（15-25℃）干燥保存 18 个月，长期保存时需置于 2-8℃。低温下，部分溶液可能会有沉淀形成，需 55℃ 水浴让沉淀完全溶解并冷却至室温后使用。Carrier RNA 干粉室温运输和保存，长期贮藏建议保存于-20℃。Carrier RNA 溶解后，必须保存于-20℃。因 RNase Free Water 中不含任何抑菌因子，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。我们推荐分装 RNase Free Water 并保存于-20℃，以减少污染。若 RNase Free Water 受到污染，请重新配制。

## 需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 无 RNase 酶的 1.5ml 离心管
- 无 RNase 酶的枪头
- 手套
- (<15,000 x g)小型离心机
- (可选) 真空泵和真空抽滤盒
- Carrier RNA 干粉，使用前加入适量的 RNase Free Water 至  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，涡旋溶解，保存-20℃。
- Buffer VHB 提供是浓缩液，使用前必须用无水乙醇稀释，并于室温保存。

R4171-01	加入 8.4 ml 无水乙醇
R4171-02	加入 28 ml 无水乙醇
R4171-03	加入 140 ml 无水乙醇

- Buffer RW2 提供是浓缩液，使用前必须用无水乙醇稀释，并于室温保存。

R4171-01	加入 20 ml 无水乙醇
R4171-02	加入 80 ml 无水乙醇
R4171-03	每瓶中加入 200 ml 无水乙醇

## 方案 1. 病毒总 RNA 抽提(离心方案)

该方案适合于从 140 $\mu$ l 的血清, 血浆, 尿液, 无细胞培养液以及各种无细胞体液中抽提病毒 RNA。该方案也能提取得到病毒 DNA, 但是效率较低。推荐使用 HiPure Viral Nucleic Acid Kit(R4173)来提取样品中的病毒 DNA 和 RNA。以下离心均在室温下进行。

- **配制 Buffer VRL/Carrier RNA 混合液:** Carrier RNA 可以提高病毒 RNA 的回收效率。每 1ml Buffer VRL, 加入 4 $\mu$ l Carrier RNA(1 $\mu$ g/ $\mu$ l)。Buffer VRL/Carrier RNA 混合液可在 2-8 $^{\circ}$ C 稳定放置 1 个月。低温放置时, 混合液可能会有沉淀析出, 使用前, 于 60 $^{\circ}$ C 水浴 3 分钟让沉淀完全溶解。
1. **转移 560 $\mu$ l Buffer VRL(含 Carrier RNA)至 1.5ml 离心管中。**

注: 如果样品体积超过 140  $\mu$ l, 可相应扩大 Buffer VRL/Carrier RNA 的体积。举例而言, 处理 280 $\mu$ l 样品时, 需加入 1120  $\mu$ l Buffer VRL/Carrier RNA。若样品体积少于 140  $\mu$ l, 可加入 Buffer PBS 至样品体积为 140  $\mu$ l。
  2. **转移 140 $\mu$ l 血清, 血浆, 尿液, 无细胞培养液或体液至装有 Buffer VRL/Carrier RNA 的离心管中。涡旋混匀 20 秒。**

注: 为充分裂解细胞, 加入样品后应立即剧烈涡旋匀浆。冻藏的样品只能解冻一至二次。
  3. **室温(15-25 $^{\circ}$ C)静置 10 分钟。**

注: 室温静置 10 分钟后, 病毒颗粒可彻底裂解。延长不能提高产量。此时样品可在 -20 $^{\circ}$ C 长期保存。某些样品静置后仍浑浊, 14,000  $\times$  g 离心 5 分钟去除不溶解杂质, 以免出现堵柱情况。
  4. **加入 560 $\mu$ l 无水乙醇至裂解液中, 涡旋混匀 20 秒。**

注: 若样品体积超过 140 $\mu$ l, 则按比例调整无水乙醇的体积。
  5. 把 HiPure Viral Micro Columns 装在 2ml 收集管中。**转移 700 $\mu$ l 混合液至柱子中。** 10,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
  6. 倒弃滤液, 把柱子装在收集管中。转移剩余混合液至柱子中。10,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。重复此步直到所有混合液都从柱子中过滤。
  7. 把柱子装在新的收集管中。**加入 500 $\mu$ l Buffer VHB(已用乙醇稀释)至柱子中。** 10,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。

注: 使用前 Buffer VHB 须按瓶子标签所示用无水乙醇稀释。

8. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 500 $\mu$ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**10,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。  
注：使用前 Buffer RW2 必须按瓶子标签所示用无水乙醇稀释。
9. 倒弃滤液，把柱子重新装回收集管中。**加入 500 $\mu$ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，** 10,000 $\times$ g 离心 30-60 秒。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。13,000  $\times$  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 15-50 $\mu$ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。**室温静置 2 分钟。13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
12. 弃去柱子，把病毒 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

## 方案 2. 病毒总 RNA 抽提(负压抽滤)

该方案采用负压抽滤方案，适合于从 140  $\mu$ l 的血清、血浆、尿液、无细胞培养液以及体液中抽提病毒 RNA。进行该方案操作时，必须准备真空泵和真空抽滤盒。该方案也能从这些样品中提取到病毒 DNA，但是效率较低。我们推荐使用 HiPure Viral Nucleic Acid Kit 来提取样品中的病毒 DNA 和 RNA。

- **配制 Buffer VRL/Carrier RNA 混合液:** Carrier RNA(Poly A)可以提高病毒 RNA 的回收效率。每 1 ml Buffer VRL，加入 4  $\mu$ l Carrier RNA(1  $\mu$ g/ $\mu$ l)。Buffer VRL/Carrier RNA 混合液可在 2-8 $^{\circ}$ C 稳定放置 1 个月。低温放置时，混合液可能会有沉淀析出，使用前，于 60 $^{\circ}$ C 水浴 3 分钟让沉淀完全溶解。
  1. 按照方案 1 第 1-4 步操作得到混合液。
  2. 连接好真空泵和真空抽滤盒，把柱子插到真空抽滤盒的接口处。
  3. 把第 4 步获得的混合液转移至柱子中。打开真空泵进行抽滤，继续转移混合液至柱子中直到所有混合液都过滤完毕。
  4. **当溶液抽滤完毕后，加入 500  $\mu$ l Buffer VHB（已用无水乙醇稀释）至柱子中。**
  5. **当溶液抽滤完毕后，加入 500  $\mu$ l Buffer RW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中。**  
注：使用前 Buffer RW2 必须按瓶子标签所示用无水乙醇稀释。
  6. **当溶液抽滤完毕后，加入 500  $\mu$ l Buffer RW2（已用无水乙醇稀释）至柱子中。**
  7. 取下柱子，并套在 2ml 收集管中。13,000  $\times$  g 离心空柱 3 分钟甩干柱子。
  8. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。**加入 15-30  $\mu$ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。**室温静置 2 分钟。13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
  9. 弃去柱子，把病毒 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

### 方案 3: 大体积样品的病毒 RNA 的抽提

该方案适合于从大体积 560 $\mu$ l 的血清, 血浆, 尿液, 细胞培养液以及各种无细胞体液中抽提病毒 RNA。

- **配制 Buffer VRL/Carrier RNA 混合液:** Carrier RNA(Poly A)可以提高病毒 RNA 的回收效率。每 1ml Buffer VRL, 加入 4 $\mu$ l Carrier RNA(1 $\mu$ g/ $\mu$ l)。Buffer VRL/Carrier RNA 混合液可在 2-8 $^{\circ}$ C 稳定放置 1 个月。低温放置时, 混合液可能会有沉淀析出, 使用前, 于 60-80 $^{\circ}$ C 水浴 3 分钟让沉淀完全溶解。由于 Carrier RNA 可能会抑制 RT-PCR 反应, 可根据实验情况, 减少 Carrier RNA 的用量。

1. 转移 560 $\mu$ l 血清、血浆、无细胞体液样品转移至 5ml 离心管中。
2. 按每 140 $\mu$ l 样品加入 560 $\mu$ l Buffer VRL/Carrier RNA 的比例, **加入 2.24ml Buffer VRL/Carrier RNA, 涡旋混匀 20 秒。**

注: 为充分裂解细胞, 加入样品后应立即剧烈涡旋匀浆。冻藏的样品只能解冻一次。若样品不足 560 $\mu$ l, 按比例加入 Buffer VRL/Carrier RNA 和无水乙醇。

3. **室温静置 10 分钟彻底裂解病毒颗粒。**

注: 室温静置 10 分钟后, 病毒颗粒可彻底裂解。延长不能提高产量。此时样品可在-20 $^{\circ}$ C 长期保存。某些样品静置后仍浑浊, 14,000  $\times$  g 离心 5 分钟去除不溶解杂质, 以免出现堵柱情况。

4. 按每 140 $\mu$ l 样品加 560 $\mu$ l 乙醇比例, **加入 2.24ml 无水乙醇, 涡旋混匀 20 秒。**

举例: 处理 560 $\mu$ l 血清或血浆等样品时, 需加入 2240  $\mu$ l Buffer VRL/Carrier RNA; 需加入 2240  $\mu$ l 无水乙醇。

5. **按方案 1 或方案 2 的第 5-10 步进行操作。**

注: 由于混合液的体积较大, 第 5 步操作时, 需要分次把混合液转移至柱子中过滤。处理某些样品时, 柱子可能会出现堵塞现象。出现这种情况时, 可提高离心速度于 15,000 $\times$ g 和延长离心时间至 3 分钟, 以确保混合液全部过滤完毕。

## 方案 4. 病毒的浓缩

血清、血浆、尿液和其它体液常常只含很低的病毒滴度，处理这种情况时，推荐浓缩不超过 3.5ml 的样品至终体积为 140 $\mu$ l，然后再按方案 1 或方案 2 进行操作。

1. 采用小量病毒浓缩柱，如 Centricon-100 (Amicon: 2 ml, Cat. No.4211), Microsep 100 (Filtron: 3.5 ml, Cat. No. OD100C40), Ultrafree-CL(Millipore: 2 ml, Cat. No. UFC4 THK 25)或其它相关产品。
2. 转移<3.5ml 样品至浓缩柱。按病毒浓缩柱的说明书，离心将样品浓缩至 140 $\mu$ l。
3. 取 140 $\mu$ l 样品，按方案 1/2 进行操作。

## 方案 5. 病毒 DNA 的抽提

若样品中含有 DNA 病毒，HiPure Viral RNA Kit 也可以提取得到病毒 DNA。由于 DNA 病毒比较难裂解，需 Proteinase K 才能充分裂解，这个试剂盒提取病毒 DNA 的效率较低。推荐使用 HiPure Viral Nucleic Acid Kit 同时提供样品的病毒 DNA 和 RNA。由于 HiPure Viral RNA Kit 无法区别 DNA 和 RNA，我们建议使用无细胞的体液或培养液，以减少纯化产物中 DNA 和宿主 RNA 的干扰。骨髓，尿液，唾液和口腔拭子都含有较多的细胞，可用 1500 xg 离心 10 分钟沉淀去除细胞，取上清液再进行操作。纯化产物中的 DNA 污染，可采用 DNASE I 消化的方法来去除。若需要处理含细胞的样品，如全血、带细胞的体液、拭子等，也可以采用方案 1 进行操作。由于血液或含细胞的体液有丰富的蛋白质，样品用量不能超过 140 $\mu$ l，否则会引起柱子的堵塞。

## 方案 6. 固体样品病毒 RNA 提取

该方案适合于从粪便样品，动物组织，拭子等固体样品中提取病毒 RNA，用户需自配一瓶 Buffer PBS 或 Buffer LB1(细胞裂解液)。

### 粪便样品

1. 取 0.3g 粪便样品，加入 1ml Buffer PBS，高速涡旋 3 分钟。
2. 14,000 x g 离心 3 分钟。
3. 转移 140 $\mu$ l 上清液，按方案 1 或方案 2 进行操作。若得到的病毒 RNA 存在明显的抑制因子，推荐使用 HiPure Stool RNA Kit 进行抽提。

### 动物组织

1. 取 0.3g 组织样品，加入 1ml Buffer PBS，用玻璃匀浆器进行匀浆。
2. 14,000 xg 离心 3 分钟。
3. 转移 140 $\mu$ l 上清液，按方案 1 或方案 2 进行操作。

### 口腔拭子

1. 取 1 个口腔拭子至 1.5ml 离心管中。
2. 加入 0.3ml Buffer PBS，高速涡旋 2 分钟。
3. 转移 140 $\mu$ l 上清液，按方案 1 或方案 2 进行操作。

### 培养细胞(病毒位于细胞质)

1. 400 x g 离心 5 分钟收集细胞。小心吸弃培养液。
2. 加入 200 $\mu$ l Buffer LB1 至细胞中。涡旋重悬细胞。
3. 14,000 x g 离心 1 分钟沉淀去除细胞核。
4. 小心转移 140 $\mu$ l 上清液，按方案 1 或方案 2 进行操作。

### 血液样品(病毒位于红细胞内)

1. 取 140 $\mu$ l 全血样品至 1.5ml 离心管中。
2. 加入 560 $\mu$ l Buffer VRL，立即涡旋混匀 20 秒。
3. 室温静置 10 分钟。
4. 按方案 1 的第 4 步进行操作。

## 常见问题回答

该列表可能有利于解决您在提取过程中所碰到的问题。此外，Magentec 的技术人员也可以随时为您提供咨询服务，若您对试剂盒存在疑问或有良好的建议，又或者您在分子生物学实验中碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
<b>RNA 产量低或无</b>	
Carrier RNA 没有加到 Buffer VRL 中	Carrier RNA 可提取 RNA 的回收效率。用 DEPC 水溶解 Carrier RNA 固体直至浓度为 1 $\mu$ g/ $\mu$ l。按每 1ml Buffer VRL 加入 10 $\mu$ l Carrier RNA。
Carrier RNA 发生降解	溶解的 Carrier RNA 必须分装保存于-70 $^{\circ}$ C，不能反复冻溶超过 5 次。Buffer VRL/Carrier RNA 不能在室温放置，在 2-8 $^{\circ}$ C 放置时间不能超过 2 天。
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。
样品中病毒滴度太低	用小量浓缩柱浓缩病毒样品或提高样品的用量至 560 $\mu$ l。
Buffer VRL 裂解能力下降	Buffer VRL/Carrier RNA 在低温保存时，可能会有沉淀析出，使用前必须在 80 $^{\circ}$ C 短暂水浴让沉淀溶解。水浴时间不能超过 3 分钟。
乙醇用量不对	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 样品上柱之前，没有加入乙醇或加入的量不对；</li> <li>● Buffer VHB 和 RW2 必须用无水乙醇进行稀释才能使用；</li> </ul>
<b>RNA 下游应用结果不理想</b>	
Carrier RNA 用量太多	根据 RT-PCR 的灵敏度，调整 Carrier RNA 的用量。
RNA 浓度太低	减少洗脱时 RNase Free Water 的用量以提高 RNA 的浓度。
RNA 产量太低或无	参见上面
乙醇污染	确保按照说明书中的条件进行操作，如 Mini kit 空柱离心时速度确保大于等于 12,000xg，离心时间为 2 分钟。
<b>DNA 污染</b>	
样品中含有 DNA 和 RNA	为减少 DNA 的干扰，应尽量使用无细胞的样品。含细胞的样品如血液，唾液，骨髓等样品应用离心或过滤去除细胞。

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。

Note: