

## HiPure Liquid RNA Mini Kit

血液 RNA 抽提试剂盒

本产品适合于从各种液体生物样品中提取高纯度总 RNA(包括 miRNA)。试剂盒结合了两种高效的 RNA 抽提技术，将一步法的 RNA 抽提技术和硅胶柱 RNA 纯化技术结合起来，可最大程度上提高 RNA 的纯度。得到的 RNA 可直接用于 RT-PCR、Northern Blot、poly A+纯化、核酸保护和体外翻译等实验。

### 产品组份

产品编号	R4163-01	R4163-02	R4163-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure Viral Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
MagZol LS Reagent	10 ml	50 ml	200 ml
Buffer BCP	1 ml	7 ml	30 ml
Buffer RWC*	5 ml	20 ml	80 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

版本号：2018-01

### 保存条件

本产品除 Magzol LS Reagent 和 Buffer BCP 外,其它组份可在室温保存 18 个月。Magzol LS Reagent 和 Buffer BCP 室温运输,收到产品后保存于 2~8℃。

### 准备事项

- Buffer RWC 和 Buffer RW2 使用前需加入无水乙醇进行稀释,于室温保存。
- 氯仿

## 实验步骤

1. 在 1.5ml 离心管中，加入 0.75ml MagZol LS Reagent。
2. 按下表加入适量样品至 MagZol LS Reagent 中，用移液枪吸打混匀 3~5 次，然后涡旋混匀 15 秒以上让沉淀完全打散，室温放置 5-10 分钟。

血液样品	血液样品	RNase Free Water	MagZol LS Reagent
<b>血液类样品</b>			
人类血液样品	250 $\mu$ l	-	750 $\mu$ l
淋巴细胞重悬液 ( $<5 \times 10^6$ )	250 $\mu$ l	-	750 $\mu$ l
血液黄层	250 $\mu$ l	-	750 $\mu$ l
哺乳动物血液	250 $\mu$ l	-	750 $\mu$ l
禽类血液	50 $\mu$ l	200 $\mu$ l	750 $\mu$ l
其它低等动物血液	100 $\mu$ l	150 $\mu$ l	750 $\mu$ l
其它液体样品	250 $\mu$ l	-	750 $\mu$ l
唾液/分泌液	250 $\mu$ l	-	750 $\mu$ l
<b>血清/血浆 miRNA</b>			
血清、血浆	250 $\mu$ l	-	750 $\mu$ l

若血液体积超过 250  $\mu$ l，若需相应地增加 MagZol LS Reagent。MagZol LS Reagent 与样品体积比例为 3: 1。由于血液中含有大量的蛋白质，当血液加至裂解液后，混和会产生大量的沉淀，充分涡旋打散沉淀，才能防止核酸被包裹在沉淀而损失产量，还可以有用移液枪反复吸打 5~10 次进一步打散沉淀。该混合液可在 2-8°C 放置 1 个星期，或 -20°C 或 -80°C 保存六个月以上。

3. 加入 200 $\mu$ l 氯仿或 100 $\mu$ l Buffer BCP 至裂解液中，用手刷用烈振荡 15 秒。  
若样品含有大量的基因组 DNA(如禽类和鱼类等血液),加入 5 $\mu$ l 冰醋酸至裂解液,然后再加入氯仿。
4. 冰上放置 10 分钟。
5. 4°C, 12,000  $\times$  g 离心 15 分钟。  
离心后会形成三相体系。上层为水相层含有 RNA, DNA 和蛋白位于有机层(下层)和中间层。
6. 小心转移上清至新的离心管中，加入 1.5 倍体积的无水乙醇，涡旋混匀 15 秒。

过柱纯化 RNA(以下离心均在室温下进行!)

7. 把 HiPure Viral Mini Column 装在 2ml 收集管中。**转移一半体积的混合液至柱子中。** 12,000 × g 离心 60 秒。
8. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。转移剩余混合液至柱子中。12,000 × g 离心 60 秒。
9. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 350µl Buffer RWC(已用乙醇稀释)至柱子中。** 12,000 × g 离心 60 秒。  
处理淋巴细胞悬液或血液时，可以省略这一步。处理血浆/血清 mRNA，建议进行这一步操作。
10. (可选:彻底去除 DNA)

10.1. 把 HiPure Viral Mini Column 装在 2ml 离心管中，按下表配制 DNase I 反应液并混匀。(DNase Set B, R4911B 需要另外订购)。

成分	用量
DNase Buffer	40 µl
DNase I(10Units/µl)	10 µl

- 10.2. 把 DNase I 反应液加到柱子的膜中央，室温(15-30°C)静置 15~20 分钟。
- 10.3. **加入 450µl Buffer RWC 至柱子上，静置 1 分钟。** 12,000 × g 离心 60 秒。
- 10.4. 把滤液再转移至柱子中， 12,000 × g 离心 60 秒。
11. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。** 12,000 × g 离心 60 秒。  
Buffer RW2 在使用之前，必须按说明书或瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。
12. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。**加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。** 12,000 × g 离心 60 秒。
13. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。13,000 × g 离心空柱 3 分钟甩干柱子的基质。  
若需要把全部的洗脱产物加到反应中时，建议打开柱子的盖子，室温放置 10 分钟让柱子的基质充分干燥，再进行第 14 步的操作。
14. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中。**加入 15-30µl RNase Free Water 至柱子的膜中央。** 室温静置 2 分钟。13,000 × g 离心 1 分钟。
15. 丢弃 RNA 柱子，把 RNA 样品保存-80°C。

## 常见问题

### 1. 提取的 RNA 产量低或降解了

- **裂解问题**：样品在解冻前，需要在 MagZol Ls Reagent 中快速打散。样品只能充分裂解后，内源的核酸酶才能被灭活，RNA 才不会降解。
- **电泳原因**：常见的 RNA 降解现象都是电泳过程中引起的。更换新的 Loading Buffer 和电泳缓冲液。
- **RNase Free Water 被污染**：RNase Free Water 不含抑菌剂，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。更换新的 RNase Free Water 或 DEPC 处理水。
- **样品贮藏问题**：反复解冻会引起 RNA 降解，确保样品解冻次数不要超过 2 次。建议使用 RNASafer Reagent 来保存固体组织样品；
- **洗脱不充分**：RNase Free Water 需直接加到膜上，并静置几分钟后再离心，进行第二步洗脱以提高产量。
- **样品用量太多**：减少样品用量，超量的样品有时会引起产量下降。处理肝脏或脾脏样品，加入等倍体积的 50%乙醇代替无水乙醇。

### 2. DNA 的污染

- **上清液转移得太多**：建议只转移上清 400~450 $\mu$ l，中间层富含 DNA。
- 样品用量太多。
- 样品中含有丰富的基因组 DNA，样品在 MagZol<sup>TM</sup> LS Reagent 裂解匀浆后，按 1 ml MagZol<sup>TM</sup> Ls Reagent 加入 5  $\mu$ l 冰醋酸，然后再加入氯仿抽提。
- 加入氯仿时没有剧烈振荡，或采用涡旋代替振荡；
- 氯仿过量加入；
- 进行 RT-PCR 时，建议使用 DNase I 消化去除残留的 DNA。

### 3. 纯度低(OD260/OD280<1.65)

- 加入氯仿时没有剧烈振荡，不要用涡旋或颠倒混匀
- 氯仿过量加入
- 裂解不够充分，匀浆后须室温放置 5 分钟
- 减少样品用量