

## HiPure Serum/Plasma miRNA Kit

血浆血清 miRNA 抽提试剂盒

### 产品简介

本产品采用两个提取方案，方案 1 采用浓缩型的 MagZol LS Reagent，适合于 0.25ml 血液、冻藏血液、血浆、血清、白膜层、细胞悬液或体液样品中直接抽提 RNA 和 miRNA。方案 2 采用重金属除蛋白质试剂，适合于从 0.3-0.9ml 无细胞体液，如血清，血浆、尿液、分泌液中提取游离 RNA 和 miRNA。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	R4314-01	R4314-02	R4314-03
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	40 ml	200 ml
Buffer CFL	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer CFP	1.5 ml	6 ml	30 ml
Buffer MGW1	5 ml	30 ml	125 ml
Buffer RW2*	6 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：202401

## 保存条件

本产品可在室温保存 18 个月。

## 实验步骤

- 在 Buffer RW2 中，加入适量体积的无水乙醇，于室温保存。
- 在 Buffer MGW1 中，加入等倍的异丙醇，于室温保存。
- 若需要彻底去除 DNA，请另外订购 DNase Set B, R4911B。

### 实验步骤 A: 全血、血浆或体液总 RNA 提取(含 miRNA)

1. 在 1.5ml 离心管中，加入 0.75ml MagZol LS Reagent。
2. 按下表加入适量液体样品至 MagZol LS Reagent 中，立即用手上下剧烈振荡 10-15 秒混匀样品，涡旋 5~10 秒充分匀浆样品，室温放置 5-10 分钟。

样品	体液样品	RNase Free Water	MagZol LS Reagent
血液	250 $\mu$ l	-	750 $\mu$ l
细胞重悬液	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
其它体液样品	250 $\mu$ l	-	750 $\mu$ l
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蛋白质，血液与裂解液混合时会产生大量的沉淀，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。

3. 按 1ml 混合液的体积，加入 200 $\mu$ l 氯仿至裂解液中，用手上下剧烈振荡 15 秒，室温放置 3 分钟。

4. 4°C, 12,000 × 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，而 DNA 和蛋白质位于有机层(下层)和中间层。中间层的多少取决于样本类型，有些样品的中间层非常少。

5. 转移上清至新的离心管中，加入 1.5 倍体积的无水乙醇，颠倒混匀 6-8 次，按第 6 步进行操作。

## 实验步骤 B: 血浆、血清或体液中提取游离 RNA 和 miRNA

1. 转移血浆、血清或体液至离心管中，4°C, 13,000 × g 离心 10 分钟进一步去除细胞和细胞碎片。
2. 转移 0.3~0.9 ml 上清液至新的离心管中，加入 1/3 倍样品体积的 Buffer CFL，涡旋混匀 10 秒，室温静置 10 分钟。
3. 加入 0.1 倍样品体积的 Buffer CFP，高速涡旋 20 秒以上，冰上放置 3 分钟。  
加入 Buffer CFP 后会产生大量的沉淀物，充分涡旋打散沉淀物，以防止核酸被沉淀物包裹在一起而损失产量。例：900µl 样品，加入 300µl ml Buffer CFL 进行裂解，再加入 90µl Buffer CFP 进行混匀。
4. 室温下，13,000 × g 离心 10 分钟。
5. 转移上清至新离心管中，加入等体积预冷的异丙醇（含 2%冰醋酸）至上清液，颠倒混匀 6-8 次，按第 6 步进行操作。

## RNA 过柱纯化

6. 把 HiPure Viral Mini Column 装在 2ml 收集管中。转移 ≤750µl 混合液至柱子中。12,000 × g 离心 60 秒。
7. 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。重复这一步直至所有溶液都转移至柱子并过滤。
8. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500µl Buffer MGW1 至柱子中。12,000 × g 离心 60 秒。

9. (可选:彻底去除 DNA)

9.1. 把柱子装在收集管中,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	70 $\mu$ l
DNase I (10Units/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l

9.2. 把 DNase I 反应液加到柱子的膜中央, 室温(15-30°C)静置 15 分钟。

10. 加入 500 $\mu$ l Buffer MGW1 至柱子上, 静置 1 分钟。12,000  $\times$  g 离心 60 秒。

11. 取出柱子装在新的收集管中, 把滤液再转移至柱子中。12,000  $\times$  g 离心 60 秒。

12. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。12,000  $\times$  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。

13. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。12,000  $\times$  g 离心 60 秒。

14. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。12,000  $\times$  g 离心空柱 3 分钟甩干柱子的基质。

15. 打开柱子的盖子, 室温放置 10 分钟让柱子的基质充分干燥。

16. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中。加入 20-50 $\mu$ 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。丢弃 RNA 柱子, 把 RNA 样品保存-80°C。当 RNA 总量高于 10 $\mu$ g 时, OD260/230 一般都在 1.3-2.2; 当 RNA 总量在 5~10 $\mu$ g 时, A260/230 会在 1.0~2.0; 当 RNA 总量低于 3 $\mu$ g, A260/230 会低于 1。这是因为 MagZol Reagent 含异硫氰酸胍, 以及玻璃滤膜有吸水性或本底吸附。异硫氰酸胍在 230nm 有强烈吸光值, 因此 A260/230 主要受该胍盐影响, 而不是来源于样品。研究表明, 低浓度异硫氰酸胍不影响反转录, 定量 RT-PCR, 二代测序等相关应用。出现 260/230 在 0.2-1.0 时, 可以忽略并直接用于反转录等下游应用。在不堵塞柱子的情况下, 适量提高样品用量和裂解液用量, 提高核酸浓度(核酸总量>10 $\mu$ g)时, OD260/230 可以明显改善。若您的研究项目需要最好的 A260/230 比值, 您可以使用 MD025。MD025 全程不使用异硫氰酸胍, 所以 A260/230 的比值更高。