

HiPure Plasma/Seruma RNA Midi Kit

血清血浆 RNA 中提试剂盒

产品简介

本产品适合于从 0.5~1ml 血浆、血清或体液中抽提 RNA 和 miRNA，试剂盒基于硅胶柱纯化技术和酸性酚抽提技术，提取过程无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 40 分钟。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	R4317-01	R4317-02	R4317-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer SML1	15 ml	60 ml	270 ml
Buffer PCI2	20 ml	120 ml	2 x 280 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	20 ml
Proteinase K	24 mg	120 mg	550 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	15 ml	30 ml
说明书	1	1	1

保存条件

本产品除 Buffer PCI2 外，其它组分可在常温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。Buffer PCI2 采用室温运输，收到产品后，请保存于 2-8℃。

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条件下，可通过氢键和静电等物理作用吸附核酸，而蛋白质和其它杂质则不被吸附而去除。液体样品加胍盐和蛋白酶 K 的作用裂解，RNA 释放到裂解液中。加入酸性酚和氯仿抽提去除基因组 DNA 和蛋白质，加入乙醇调节结合条件，混合液转移至柱子中过滤，RNA 被吸附上柱子的膜上，而蛋白质则不被吸附而去除，经 Buffer RW2 洗涤去除盐分，最后 RNA 被 RNase-Free Water 洗脱。

准备事项

- 按瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇稀释 **Buffer RW2**，并于室温保存。
- 按瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇稀释 **Buffer RWC**，并于室温保存。
- 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 至 Proteinase K 干粉管中，使之终浓度为 20mg/ml。轻轻振荡使 Proteinase K 充分溶解，保存于-20℃。

方案 1. 中体积血清血浆小分子 RNA 抽提

- 按标准流程分离血清/血浆样品，或 37°C 水浴让样品快速解冻。**

血清/血浆分离后，可在 2-8°C 放置 6 小时。长时间保存时，最好分装保存在 -20°C 或 -80°C。使用前，从冰箱中取出 37°C 水浴让样品充分解冻，解冻后立即进行操作。
- 在 5-15ml 离心管中，加入 50 μ l Proteinase K(20mg/ml)，转移 1ml 血清/血浆样品至 2ml 离心管中，混匀 5 秒。**

若处理 1ml 样品时，把 1ml 样品分成两份进行操作，在第 7 步把两份上清合并在一起。
- 加入 1ml Buffer SML1 至样品中，涡旋混匀 10 秒。室温静置 20 分钟，其间颠倒混匀 2 次。**
- 加 2ml Buffer PCI2 至样品中，涡旋混匀 15 秒，室温放置 3 分钟。**
- 室温下，4,000~5,000 \times g 离心 10 分钟。**
- 把上清液全部转移至新的离心管中，加等倍异丙醇至上清液中。涡旋混匀 5 秒，室温静置 3 分钟。**
- 把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移 750 μ l 混合液至柱子中。12,000 \times g 离心 30 秒。**
- 倒弃滤液把柱子装回收集管中。继续转移剩余的混合液至柱子中，12,000 \times g 离心 30 秒。重复这一步直至所有混合液都转移至柱子中离心过滤。**
- 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer RWC(已用乙醇稀释)至柱子中。12,000 \times g 离心 30 秒。**
- 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。12,000 \times g 离心 30 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。
- 倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。12,000 \times g 离心 30 秒。**
- 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。**

13. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中。加入 15~50 μ l RNASE Free Water 至柱子的膜中央。**室温静置 1 分钟。**12,000 \times g 离心 1 分钟。丢弃 RNA 柱子，把总 RNA(含小分子 RNA) 样品保存-80 $^{\circ}$ C。

当 RNA 总量高于 10 μ g 时, OD260/230 一般都在 1.3-2.2; 当 RNA 总量在 5~10 μ g 时, A260/230 会在 1.0~2.0; 当 RNA 总量低于 3 μ 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 μ 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。