

HiPure Plasma/Seruma RNA Maxi Kit

血清血浆 RNA 大提试剂盒

产品简介

本产品适合于从 3~5ml 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	R4318-01	R4318-02
纯化次数	10 次	50 次
HiPure CFDNA Mini Columns	10	50
2ml Collection Tubes	10	50
Support Tube	10	50
Extender Tube	10	50
50 ml Collection Tubes	10	50
Buffer SML1	60 ml	270 ml
Buffer PCI2	100 ml	500 ml
Buffer RWC*	5 ml	20 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml
Proteinase K	36 mg	160 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	15 ml
说明书	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. 大体积血清血浆小分子 RNA 抽提

1. 4℃, 1900 × g 离心 10 分钟分离血浆或血清, 转移血浆或血清至新的离心管中。
2. 4℃, 5,000 × g 离心 20 分钟进一步去除细胞残片等杂质, 转移 1~5ml 上清液至新的离心管中。
3. 在 15~50ml 离心管中, 加入 0.03 倍样品体积 Proteinase K(20mg/ml), 以及血清/血浆样品至, 混匀 5 秒。
4. 加入等倍样品体积的 Buffer SML1, 涡旋混匀 10 秒。室温静置 20 分钟, 其间颠倒混匀 2 次。
5. 加 2 倍样品体积的 Buffer PCI2, 涡旋混匀 20 秒, 冰上放置 10 分钟。室温下, 4,000~5,000 × g 离心 15 分钟。
例: 5ml 血浆或血清, 则加入 150µl Proteinase K, 5ml Buffer SM1 以及 10ml Buffer PCL2。
6. 把上清液全部转移至新的离心管中, 加等倍体积的异丙醇, 颠倒混匀 6-8 次, 室温静置 3 分钟。
7. 把 Extender Tubes 插到 HiPure CFDNA Mini Column 中, 然后再 Column 插到 Support Tube 中。把三个连接好的组件一起放到 50ml Collection Tube 中。
8. 把第 6 步的混合液倒入 Extender Tubes 中, 盖上盖子。3,000 × g 离心 5 分钟。
若混合液体积超过 15ml 时, 则分次两次加入。
9. 打开离心管的盖子, 倒弃 Extender Tube、密封圈和 Support Tube。
10. 把 HiPure CFDNA Mini Column 装在 2ml 收集管中。加入 500µl Buffer RWC(已用乙醇稀释)至柱子中。12,000 × g 离心 30 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 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。
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 30 秒。

13. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。12,000 × g 离心空柱 3 分钟甩干柱子的基质。
14. **将柱子转移至 1.5ml 离心管中。加入 15~50µl RNASE Free Water 至柱子的膜中央。室温静置 1 分钟。**12,000 × g 离心 1 分钟。丢弃 RNA 柱子，把总 RNA(含小分子 RNA) 样品保存-80°C。

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