

目 录

简 介	2
原 理	2
保质期	2
试剂盒组成	3
方案 1:小体积(0.3ml)血清/血浆 RNA(含 miRNA)抽提	4
方案 2:0.5~1ml 血清/血浆 RNA(含 miRNA)抽提	6
方案 3:5ml 血清/血浆 RNA(含 miRNA)抽提	9
常见问题回答	11

版本: 2018-01

简介

HiPure Liquid miRNA Kit 是专门为小体积的血清/血浆游离 RNA 设计的。试剂盒适合于从 0.25ml 血清和血浆样品中提取高纯度的小分子 RNA(smRNA<200nt)。HiPure Serum/Plasma miRNA Kit 是专门为大体积的血清/血浆游离 RNA 设计的。试剂盒适合于从 0.5-3ml 血清和血浆样品中提取高纯度的小分子 RNA(smRNA<200nt)。与其它常规的方法不同的是,该方法采用蛋白酶消化样品,可高效地从核酸-蛋白质复合物中释放出小分子 RNA。得到的小分子 RNA 可直接用于芯片分析、Northern 杂交、RT-PCR 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 Serum/Plasma miRNA Kit 基于硅胶柱纯化方式。样品在含胍盐裂解液和蛋白酶 K 作用后,小分子 RNA 从核酸-蛋白质复合物中释放到裂解液中。由于裂解液中含有高浓度胍盐,内源性或外源性的 RNASE 变性失活, RNA 被保护起来。加入水饱和酚氯仿抽提去除 DNA 和蛋白质等杂质,加入乙醇调节结合条件,混合液转移至柱子中过滤, miRNA 被吸附在柱子的膜上。柱子经 Buffer VHB 洗涤去除蛋白质和其它杂质,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、核酸保护和体外翻译等实验。

保质期

HiPure Serum/Plasma miRNA Kit 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,溶液中可能会有沉淀形成,55℃水浴使沉淀完全溶解后使用。

组 成

HiPure Serum/Plasma miRNA Mini Kit

产品编号	R4314-01	R4314-02	R4314-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Micro Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer SDS (1.5%)	1.8 ml	1.8 ml	6 ml
Proteinase K	6 mg	12 mg	60 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	5 ml
MagZol LS Reagent	15 ml	80 ml	2 x 150 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

HiPure Serum/Plasma miRNA Midi Kit

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	100 ml	2 x 200 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

组 成

HiPure Serum/Plasma miRNA Maxi Kit

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

方案 1. 小体积血清/血浆小分子 RNA 抽提

该方案适合于从 0.3ml 血清、血浆、或其它液体样品中直接抽提总 RNA，包括小分子 RNA。

需要准备材料和工具

- 无水乙醇
 - 氯仿
 - 4°C, 12,000 × g 离心机
 - 室温(15-25°C), 13,000 × g 离心机
 - 1.5ml 离心管
 - 按瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇至 Buffer RW2
1. 按标准方法分离制备血清/血浆，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。
 2. 在 2.0ml 离心管中，加入 300µl 血浆、血清、全血、外泌体重悬液、细胞悬液或其它体液样品。
 3. (可选) 加入 10µl Proteinase K 和 30µl Buffer SDS(15%)至样品中，涡旋混匀 10 秒，37°C 放置 20 分钟消化样品。
 4. 加入 900µl MagZol LS Reagent，用移液枪打混匀 3-5 次充分打散沉淀，室温放置 10 分钟。
 5. 加入 240µl 氯仿至裂解液中，用手剧烈振荡混匀 15 秒，室温放置 3 分钟。
 6. 4°C, 12,000 × g 离心 15 分钟。
 7. 小心转移上清液至新的离心管中，加入 1.5 倍体积的无水乙醇至上清液中，涡旋混匀 10 秒，室温静置 3 分钟。

注：以下离心均在室温下(15-25°C)进行。

8. 把 HiPure RNA Micro Column 装在 2ml 收集管中。**转移一半体积的混合液至柱子中。** 8,000 × g 离心 30 秒。

9. 倒弃滤液把柱子装回收集管。转移剩余混合液至柱子中。8,000 × g 离心 30 秒。
10. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 300µl Buffer RWC(已用乙醇稀释)至柱子中。**
8,000 × g 离心 30 秒。
11. (可选:彻底去除 DNA)

10.1. **把 HiPure RNA Micro 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	20 µl
DNase I(10Units/µl)	5 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 分钟。
- 10.3. 加入 500µl Buffer RWC 至柱子上，静置 1 分钟。8,000 × g 离心 60 秒。
- 10.4. 把滤液再转移至柱子中，8,000 × g 离心 60 秒。
12. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**
8,000 × 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。。若需彻底去除盐离子污染,可重复第 11 步洗涤柱子一次。
13. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**
8,000 × g 离心 30 秒。
14. 倒弃滤液把柱子装回收集管。10,000 × g 离心空柱 3 分钟甩干柱子的基质。
15. 室温放置 10 分钟进一步干燥柱子。
16. 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。**
静置 1 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。
HiPure RNA Micro Column 最小的洗脱体积是 15µl,
17. 丢弃 RNA 柱子，把 RNA 样品保存-80°C。

方案 2. 中体积血清血浆小分子 RNA 抽提

该方案适合于从 0.5ml 或 1ml 血浆/血清的样品直接提取总 RNA，含小分子 RNA。按下列表准备材料和工具：

- 按瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇至 Buffer RW2 和 Buffer RWc 中。
 - 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°C。
1. 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。
 2. 在 2ml 离心管中，加入 50µl Proteinase K(20mg/ml)。
 3. **转移 0.5ml 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。
 4. **加入 0.5ml Buffer SML1 至样品中，涡旋混匀 10 秒。**室温静置 15 分钟，其间颠倒混匀 2 次。
 5. **加 0.8ml Buffer PCI2 至样品中。**涡旋混匀 15 秒，室温放置 3 分钟。
 6. 室温下，12,000 × g 离心 5 分钟。
 7. **把上清液全部转移至 5ml 离心管中，加 1.5 倍体积无水乙醇至上清液中。**涡旋混匀 15 秒，室温静置 3 分钟。
若处理 1ml 样品时，这一步把两管的上清液合并在一起。上清液的体积为 1000µl，则需加入 2000µl 无水乙醇。
 8. 把 HiPure RNA Mini Column 1 装在 2ml 收集管中。**转移 700µl 混合液至柱子中。**12,000 × g 离心 30 秒。
 9. 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 × 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。
 10. 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。

11. 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。
12. 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 15~30 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。
14. 丢弃 RNA 柱子，把总 RNA(含小分子 RNA)样品保存-80 $^{\circ}$ C。

方案 3. 大体积血清血浆小分子 RNA 抽提

该方案适合于从 1~5ml 血清、血浆或其它无细胞液体样品中直接提取循环 DNA/RNA，包括 miRNA，并有效去除大于 1kb 的 DNA 的片段。

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. **按 1ml 血浆或血清样品比例，加入 1ml Buffer SML1 和 30μl Proteinase K，颠倒混匀，室温静置 15~30 分钟。**
4. **按 1ml 血浆或血清样品比例，加入 1.6 ml Buffer PCI2 至样品中，高速涡旋 15 秒以上，冰上放置 10 分钟。**
5. 4℃，4,000~5,000 × g 离心 15 分钟。（若无低温离心，也可以室温离心）
6. **转移上清液至新的离心管中，加入 1.5 倍体积无水乙醇至上清液，涡旋混匀 15 秒，室温放置 3 分钟，然后选择离心操作或负压操作。**

离心操作

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 放到 2ml Collection Tube 中。**加入 500μl Buffer RWC(已用乙醇稀释)至柱子中。**13,000 × g 离心 30 秒。
Buffer RWC 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。
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。**13,000 × 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 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**
13,000 \times g 离心 30 秒。
13. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。13,000 \times g 离心空柱 3 分钟甩干柱子的基质。
14. 将柱子转移至 1.5ml 离心管中。**加入 30~50 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。**室温静置 1 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
15. 丢弃柱子，把总 DNA/RNA(含小分子 RNA)样品保存-80°C。

负压操作进行

7. 把 Extender Tubes 插到 HiPure CFDNA Mini Column 中，然后再 Column 插到抽滤盒中。
8. 把第 7 步的的混合液倒入 Extender Tubes 中，打开真空泵进行抽提，完全过滤后，弃去 Extender Tube。
9. 把 HiPure CFDNA Mini Column 放到 2ml Collection Tube 中，加入 500 μ l Buffer RWC(已用乙醇稀释)至柱子中。13,000 \times g 离心 30 秒。
Buffer RWC 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。
10. 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。**
13,000 \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。
11. 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。**
13,000 \times g 离心 30 秒。
12. 倒弃滤液把柱子装回收集管中。13,000 \times g 离心 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 30~50 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。**室温静置 1 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
14. 丢弃柱子，把总 DNA/RNA(含小分子 RNA)样品保存-80°C。

常见问题回答

该列表可能有利于解决提取过程中所碰到的问题。Magen 的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，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
离心后分层现象不明显	
没有加氯仿或氯仿不纯	确保加入氯仿，氯仿不要含有异戊醇或其它添加成分。
加入氯仿后混匀效果不好	加入氯仿后，一定要剧烈振荡混匀 15 秒。颠倒或涡旋会导致分离不明显或大量的 DNA 污染。如果离心后分离不明显，重复振荡和静置，然后再离心。
样品中含有有机溶剂	若样品含有有机溶剂如 DMSO、乙醇、强碱试剂，会影响分层。
RNA 产量低	
样品匀浆不充分	处理培养细胞时，用注射器抽打裂解液 3-5 次进行匀浆； 处理动物组织时，推荐使用机器匀浆器匀浆；
样品起始用量太多	参照上面
RNA 的洗脱效率低	RNase Free Water 没有加到膜上，或洗脱体积不够。再加入 30-50 μ l RNase Free Water 到膜上，室温静置 2 分钟，然后离心洗脱 RNA。
RNA 降解	
组织/细胞用量太多	减少样品用量。正确的样品用量是获得理想结果的必要条件；
RNA 酶污染	操作过程引入 RNA 酶污染
下游实验结果不理想	
盐分污染	加入 Buffer RW2 后，静置 5 分钟后，再离心
乙醇污染	确保空柱离心速度高于或等于 12,000 \times g，离心时间为 2 分钟。
膜材料脱落	硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落到质粒中硅胶膜是不溶解的，可过 12,000 \times g 离心 2 分钟去除。

Note: