

HiPure Liquid RNA Mini Kit

体液 RNA 试剂盒

产品简介

本产品采用浓缩型的 MagZol LS Reagent 和柱子纯化技术，适合于 0.25~0.5ml 血液、冻藏血液、血浆、白膜层、细胞悬液或体液样品中直接抽提 RNA 和 miRNA，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	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
10 x RBC Lysis Buffer	10 ml	50 ml	250 ml
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

保存条件

本产品除 MagZol LS Reagent 和 Buffer BCP 外，其它组分可在常温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。MagZol Reagent 和 Buffer BCP 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。液体样品加入 3 倍体积的 MagZol LS Regaent 匀浆裂解，RNA 释放到裂解液中。经 BCP 或氯仿抽提去除基因组 DNA；滤液中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。

淋巴细胞的分离

1. 在 15ml 离心管中，加入 1 倍体积的血液(1.0~2.0ml)和 3 倍体积 1x RBC lysis Buffer，颠倒混匀 5-10 次。冰上放置 10-15 分钟，其间颠倒混匀 2~3 次。
试剂盒提供 10 x RBC lysis Buffer，使用前须用灭菌水稀释至 1 x。举例，1.5 ml 的血液，需加入 7.5 ml 1 x RBC lysis Buffer。
2. 4℃，500 x g 离心 10 分钟，小心倒弃上清液，余下 250µl 残液和细胞沉淀，涡旋 5-10 秒重悬淋巴细胞。

准备事项

- 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
- 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。
- 10 x RBC lysis Buffer 使用前用灭菌水稀释至 1 x，并装在合适的瓶子中。
- Buffer BCP 是氯仿代替物，中文名为 1-溴-3-氯丙烷，是一种无色透明液体，不溶于水，有低毒性，为安全起见，请在通风橱或通风条件的环境中使用。

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，然后涡旋混匀 5~10 秒以上让沉淀完全打散，室温放置 5-10 分钟。

样品	体液样品	RNase Free Water	MagZol LS Reagent
人类血液样品	250 μ l	-	750 μ l
细胞重悬液 ($<1 \times 10^7$)	250 μ l		750 μ l
血液黄层	250 μ l	-	750 μ l
哺乳动物血液	250 μ l	-	750 μ l
禽类血液	50 μ l	200 μ l	750 μ l
其它低等动物血液	100 μ l	150 μ l	750 μ l
其它液体样品	250 μ l	-	750 μ l
唾液/分泌液	250 μ l	-	750 μ l
血清、血浆	250 μ l	-	750 μ l
固体样品	按 750 μ l MagZol LS Reagent 加入 250 μ l RNase Free Water，混匀后当作 MagZol Reagent，参考 R4130 进行操作。		

若血液体积超过 250 μ 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。该混合液可在 2-8 $^{\circ}$ C 放置 1 个星期，或 -20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C 保存六个月以上。处理全血样品时，混合液先于 4 $^{\circ}$ C，12,000 \times g 离心 10 分钟去除杂质后再按第 3 步进行操作。

3. 按 1ml 混合液的体积，加入 200 μ l 氯仿或 100 μ l Buffer BCP 至裂解液中，用手上下剧烈振荡 15 秒，室温放置 3 分钟。

用涡旋取代振荡会带来更多的基因组 DNA 污染。氯仿/BCP 必须按比例加入，过多的氯仿会迫使 DNA 和蛋白质回到水相中，导致 RNA 的纯度下降。由于氯仿挥发性强，毒性较大，可以用 100 μ l BCP(1-Bromo-2 chloropropane)代替。

4. 4 $^{\circ}$ 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，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 0.5 倍或 1.5 倍体积的无水乙醇，颠倒混匀 6-8 次。**
若需要提取 miRNA，加入 1.5 倍体积的无水乙醇至上清液中。若只需提取 mRNA(>200nt)，加入 0.5 倍无水乙醇时，可有效去除小于 200nt 的 5S RNA, tRNA 等短片段 RNA，提高 mRNA 的纯度。
6. **把 HiPure Viral Mini Column 装在 2ml 收集管中，转移混合液(不要超过 750 μ l)至柱子中。**
12,000 \times g 离心 30~60 秒。
7. **倒弃滤液把柱子装回收集管。转移剩余混合液至柱子中。12,000 \times g 离心 30~60 秒**
8. **倒弃滤液把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer RWVC(已用乙醇稀释)至柱子中。**
12,000 \times g 离心 30 秒。
Buffer RWVC 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
9. **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。
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。**
12,000 \times g 离心 30 秒。
11. **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。**
12. **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 2 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。丢弃 RNA 柱子，把 RNA 样品保存-80 $^{\circ}$ C。**
HiPure Viral Mini Column 最小的洗脱体积是 15 μ l，小于 15 μ l 会导致 RNA 的洗脱效率下降。
若 RNA 产量超过 10 μ g，推荐按进行第二次洗脱以获得更高产量。
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。