

## 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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  |
|-------------------|--|
| <b>离心后分层现象不明显</b> |  |
| 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。   |
| <b>RNA 产量低</b>    |  |
| 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；<br>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 $\mu$ l RNase Free Water 到膜上，室温静置 2 分钟，然后离心洗脱 RNA。 |
| <b>RNA 降解</b>     |  |
| 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   |
| <b>下游实验结果不理想</b>  |  |
| 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: