

体液RNA试剂盒 (BW-R2301)

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、血清、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。

试剂盒组成

产 品 编 号	R2301-01	R2301-02	R2301-03
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

贮存条件

所有试剂及耗材室温（4-28℃）保存，产品有效期自生产之日起12个月。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 Reagent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，1.5ml的血液，需加入7.5 ml 1 x RBC Lysis Buffer。

2.4℃,500xg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1x，并装在合适的瓶子中。

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 μl	-	750 μl
细胞重悬液 (< 1x10 ⁷)	250 μl		750 μl
血液黄层	250 μl	-	750 μl
哺乳动物血液	250 μl	-	750 μl

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		

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℃放置1个星期, 或-20℃或-80℃保存六个月以上。处理全血样品时, 混合液先于4℃, 12,000xg离心10分钟去除杂质后再按第3步进行操作。

- 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℃, 12,000xg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

- 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。

- 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。12,000xg离心30~60秒。

- 倒弃滤液把柱子装回收集管。转移剩余混合液至柱子中。12,000xg离心30~60秒。

- 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×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。

9. 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。

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。

11. 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。

12. 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2分钟。12,000×g离心1分钟。丢弃RNA柱子，把RNA样品保存-80℃。HiPure Viral Mini Column最小的洗脱体积是15μl，小于15μl会导致RNA的洗脱效率下降。若RNA产量超过10μg，推荐按进行第二次洗脱以获得更高产量。

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MagZolReagent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>10ug)时，OD260/230可以明显改善。

登录官方网站获取产品手册等更多信息：<http://www.beiwobiomedical.com/>

