BLOODmisi全血（液体样本）microRNA快速提取试剂盒

目录号：EN-214

❖ 适用范围：

适用于快速提取各种全血/血浆/液体样本miRNA和其它各种小RNA

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次(R214-50)
Lysis buffer	**4°C 避光**	**50 ml**
70%乙醇	**室温**	**9ml RNase-free H_2O** **第一次使用前按说明加指定量乙醇**
Wash Solution 1	**室温**	**12 ml** ***第一次使用前加入 28ml 无水乙醇***
Wash Solution 2/3	**室温**	**10 ml** ***第一次使用前加入 42ml 无水乙醇***
RNase-free H_2O	**室温**	**10 ml**
吸附柱 RA 和收集管	**室温**	**50 套**
microRNA 吸附柱 MA 和收集管	**室温**	**50 套**

本试剂盒按照指示储存 6 个月不影响使用效果。

储存事项

1. Wash Solution 1 和 Wash Solution 2/3 加入无水乙醇后，可以在常温保存。
2. Wash Solution 2/3 可能加入乙醇使用几天后出现沉淀晶体，并不影响使用，直接不吸晶体，吸上清使用就可以。

3. 运输在常温下进行，不影响使用效果。

4. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

❖ 产品介绍：

近年来对 RNA 干扰和调节性小 RNA 的广泛研究迫切需要一种能有效提取 15-30 核苷酸左右大小 RNA（包括 siRNA 和 miRNA）的试剂盒。但是传统的 RNA 提取方法如硅胶膜不能有效吸附回收，酚/胍抽提和乙醇沉淀并不能有效沉淀回收微小分子 RNA，对于血液样本更是由于其自身特点更难提取。本试剂盒采用独特的裂解液迅速直接裂解全血（液体样本）和灭活细胞 RNA 酶，强烈有机抽提去除蛋白和 DNA，RNA 包括微小分子 RNA 吸附于离心柱内特殊硅基质膜， 再通过一系列快速的漂洗－离心的步骤,漂洗液将细胞代谢物，蛋白等杂质进一步去除，最后低盐的洗脱液将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。

❖ 产品特点：

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。

2. 也不需要乙醇沉淀等容易丧失微小分子 RNA 的步骤。

3. 独有的裂解液配方，可直接裂解全血，不需要先裂解去除红细胞。

4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD_{260}/OD_{280} 典型的比值达 1.9～2.0，基本无 DNA 残留，可用于 RNAi，RT-PCR，Northern-blot 和各种实验。

❖ 注意事项

1. **第一次使用前请先在 70%乙醇、Wash Solution 1 瓶和 Wash Solution 2/3 瓶中加入指定量乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入!**

2. **所有的离心步骤均在室温完成**，使用转速可以达到 13，000 rpm 的传统台式离心机，如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。

3. 需要自备乙醇，氯仿，一次性注射器，研钵。

4. **Lysis buffer 和 Wash Solution 1 含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**

5. 预防 RNase 污染，应注意以下几方面：

1) 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致RNase 污染。

2) 使用无RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染。

3) RNA 在裂解液中时不会被RNase 降解。但提取后继续处理过程中应使用不含RNase 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在150℃烘烤4小时，塑料器皿可在0.5 M NaOH 中浸泡10 分钟，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除RNase。

4) 配制溶液应使用无RNase 的水。（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入DEPC至终浓度0.1%(v/v)，37℃放置过夜，高压灭菌。）

6. RNA 纯度及浓度检测：

完整性：RNA 可用普通琼脂糖凝胶电泳 (电泳条件：胶浓度 1.2%；0.5×TBE 电泳缓冲液；150v，15 分钟)检测完整性。由于细胞中 70%-80%的 RNA 为 rRNA，电泳后UV 下应能看到非常明显的rRNA 条带。动物rRNA 大小分别约为5 kb 和 2kb，分别相当于 28S 和 18S rRNA。动物 RNA 样品中最大 rRNA 亮度应为次大 rRNA 亮度的 1.5-2.0 倍，否则表示 RNA 样品的降解。出现弥散片状或条带消失表明样品严重降解。

纯度：OD260/OD280 比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的 RNA，OD260/OD280 读数（10mMTris, pH7.5）在 1.8-2.1 之间。OD260/OD280 读数受

测定所用溶液的 pH 值影响。同一个 RNA 样品，假定在 10mM Tris，pH7.5 溶液中测出的 OD260/OD280 读数 1.8-2.1 之间，在水溶液中所测读数则可能在 1.5-1.9 之间，但这并不表示 RNA 不纯。

浓度：取一定量的 RNA 提取物，用 RNase-free 水稀释 n 倍，用 RNase-free 水将分光光度计调零，取稀释液进行 OD260, OD280 测定，按照以下公式进行 RNA 浓度的计算：终浓度（ng/μl）= (OD260)×(稀释倍数 n)×40。

❖ **操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）**

⇨ **提示：**第一次使用前请先在 70%乙醇、Wash Solution 1 瓶和 Wash Solution 2/3 瓶中加入指定量乙醇！

1. 每0.25ml液体样品(血清，血浆，脑脊液等等)加入0.75ml Lysis buffer，用加样枪吹打液体样品几次以帮助裂解样品中细胞。每5~10×10^6个细胞至少加入0.75ml Lysis buffer。对于含有高污染物样品如全血样品，可以用灭菌水按照1：1比例稀释一倍后开始提取。Lysis buffer和液体样品的终体积比总是3：1。
2. 将样品剧烈震荡混匀，在15 -30°C条件下孵育5分钟以使核蛋白体完全分解。
3. 每0.75ml Lysis buffer加0.2 ml氯仿，剧烈振荡15秒并室温下放置2分钟。
4. 于4℃12，000rpm 离心10分钟，样品会分成三层：下层有机相，中间层和上层无色的水相，RNA存在于水相中。水相层的容量大约为所加Lysis buffer体积的70%。
5. 小心取上清（精确计算体积）转入到新的离心管，加入1.5倍体积的无水乙醇（必须是室温的），涡旋混匀。此时可能出现沉淀,但是不影响提取过程,立即吹打混匀,不要离心，立刻接下步。
6. 将混合物(每次小于 700μl,多可以分两次加入)加入一个吸附柱 RA 中，（吸附柱放

入收集管中）12,000 rpm 离心 30-60 秒，弃掉废液。

7. 加 700μl Wash Solution 1（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），12，000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

8. 加入 500μl Wash Solution 2/3（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），12,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。加入 500μl Wash Solution 2/3,重复一遍。

9. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，13,000 rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。

10. 取出吸附柱 RA，放入一个 RNase free 离心管中，根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-50μl RNase free water（事先在 100℃水浴中预热效果更好），室温放置 1 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟。

11. 如果预期 RNA 产量>30μg,加 30-50μl RNase free water 重复步骤 10，合并两次洗脱液,或者使用第一次的洗脱液加回到吸附柱重复步骤一遍(如果需要 RNA 浓度高)。

洗脱两遍的 RNA 洗脱液浓度高，分两次洗脱合并洗脱液的 RNA 产量比前者高 15–30%，但是浓度要低,用户根据需要选择。

附：microRNA 富集方法（仅仅提取 microRNA，不包含>200 nt 其它总 RNA 成份。）

1. 按照前面标准操作步骤 1－5 操作，直到得到上清。

2. 较精确估计上清体积，加入等体积 70％乙醇（**请先检查是否已加入无水乙醇!**）（必须是室温的），涡旋或者吹打充分混匀，不要离心。

3. 将混合物加入一个吸附柱 RA 中，（吸附柱放入收集管中）12,000 rpm 离心 30-60 秒，**收集滤过物**。将滤过物从收集管转移到一个新的离心管后，把吸附柱子放回空的收集管内，再加入剩下的混合物，离心，**收集滤过物**。**合并两次滤过物**，计算体积。

此时，滤过物含有 microRNA，吸附柱子上面是除去了 microRNA 的总 RNA（不包含 microRNA），如果需要，可以按照前面标准操作步骤 7－10 操作漂洗，洗脱回收得到去除了 microRNA 的总 RNA。

4. 较精确估计**滤过物体积**，加入 0.65 倍体积无水乙醇（必须是室温的），涡旋或者

吹打充分混匀，不要离心。

5. 取一套新的 **microRNA 吸附柱 MA**， 将上一步骤混合物(每次小于 700μl,多可以分两次加入)加入 **microRNA 吸附柱 MA** 中，（吸附柱放入收集管中）12,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

6. 按照前面标准操作步骤 7－10 操作漂洗，洗脱得到富集的 microRNA。

注意：不同的实验可以选择不同的方法，例如Northern Blot或者表达芯片谱分析可以选择提取包括microRNA的总RNA。富集方法提取的microRNA因为去除了较大片段的mRNA和rRNA等，可能减少某些下游试验的扩增背景，当背景较高或者非特异扩增较多时，可以尝试使用富集方法提取的microRNA。