

M5 血清血浆 microRNA 提取试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 血清血浆 microRNA 提取试剂盒	50T	MF613-01

【储存条件】

室温

【产品简介】

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/胍抽提和异丙醇或者乙醇沉淀并不能有效沉淀回收微小分子 RNA, 对于血清血浆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血清血浆 RNA 酶, 强烈有机抽提去除蛋白和 DNA, RNA 包括微小分子 RNA 在高浓度乙醇下吸附于离心柱内特殊硅基质膜, 再通过一系列特殊漂洗液快速的漂洗—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. 也不需要异丙醇或者乙醇沉淀等容易丧失微小分子 RNA 的步骤。
3. 特殊的裂解液配方, 可以处理更多的血清/血浆样品。
4. 多次柱漂洗确保高纯度, 可用于 RNAi, RT-PCR, Northern-blot 和各种实验。

【产品组分】

试剂盒组成	保存	50T
Lysis buffer	4°C 避光	50 ml
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 ₂ O	室温	10 ml
RNase-free 吸附柱 RA 和收集管	室温	50 套

1. 所有溶液应该是澄清的, 如果环境温度低时溶液可能形成沉淀, 此时不能直接使用, 可在 37°C 水浴加热几分钟, 即可恢复澄清。
2. 不合适的储存于低温 (4°C 或者 -20°C) 会造成溶液沉淀, 影响使用效果, 因此运输和储存均在室温下 (15°C—25°C) 进行。
3. 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。
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。

【注意事项】

1. 第一次使用前请先在 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. 除说明外，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。
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. RNA 纯度及浓度检测：

一般情况下通过测量 OD260 值可以知道 RNA 产量，测量 OD260/OD280 比值可以是衡量蛋白质污染程度的指标之一，但是由于血清/血浆的 RNA 含量特别低，已经低于分光光度计测量的下限，无法测量准确，因此一般无法通过测量 OD 值或者比值的方法来判断纯度或者浓度，只能通过下游做荧光定量 RT-PCR 来判断产量。同时无细胞的血清/血浆中的 RNA 主要是小于 100 nt 的小 RNA，因此传统的电泳检测 RNA 完整性并不适用于血清/血浆 RNA。

【操作流程】**提示：**

第一次使用前请先在 Wash Solution 1 瓶和 Wash Solution 2/3 瓶中加入指定量乙醇！

1. 每 250 μ l 样品(血清，血浆)加入 750 μ l Lysis buffer，涡旋振荡或者用加样枪吹打液体样品几次混匀帮助裂解。
对于含有高污染物样品如高蛋白高血脂样品，可以适当减少处理量，不足的体积，可以用去 RNase-free H₂O 补足。Lysis buffer 和液体样品的终体积比总是 3：1。例如 200 μ l 样品+50 μ l RNase-free H₂O+750 μ l Lysis buffer。
2. 将样品剧烈震荡混匀，在 15 -30 $^{\circ}$ C 条件下孵育 5 分钟。
3. 每 750 μ l Lysis buffer 加 200 μ l 氯仿，剧烈振荡 15 秒并室温下放置 2 分钟。
4. 于 4 $^{\circ}$ C 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，立刻接下一步。
6. 将混合物(每次小于 700 μ l,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 700 μ l 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 500 μ l 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 500 μ l 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 30-40 μ l RNase free water（事先在 100 $^{\circ}$ C 水浴中预热效果更好），室温放置 1 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟。

洗脱液加回到吸附柱重复洗脱一遍可以提高产量和浓度(如果需要 RNA 浓度高)。如果需要提高浓度，洗脱体积最小可以低至 15 μ l，但是使用小体积洗脱会降低一些产量。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。