

全血 (液体样本) microRNA 提取试剂盒

KR203 50次

试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次
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
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

本试剂盒在室温储存 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 加入乙醇使用几天后可能出现晶体, 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:

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采用进口公司特制吸附膜, 柱与柱之间吸附量差异极小, 可重复性好。
2. 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 Wash Solution 1 瓶和 Wash Solution 2/3 瓶中加入指定量乙醇。**
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。
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. **试剂盒普通步骤提取的 RNA 为包含 microRNA 的总 RNA, 如果仅提取 microRNA, 不包含 >200 nt 其它总 RNA 成份, 请参考附录里面的操作步骤。**

操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)

⇒ 第一次使用前请在 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 $5\sim 10\times 10^6$ 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°C 12,000 rpm 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%。

- 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。
- 将混合物(每次小于 700 μ l,多可以分两次或者多次加入一个吸附柱 RA 中, (吸附柱放入收集管中) 12,000 rpm 离心 30-60 秒, 弃掉废液。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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 30-50 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。
- 将洗脱液加回到吸附柱重复洗脱步骤一遍可以提高产量约 10-15%。
- 得到的 microRNA 可以立即用于下游反应或者尽快置于低温保存。

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

- 按照前面标准操作步骤 1 - 4 操作, 直到得到上清。
- 较精确估计上清体积, 加入 0.5 倍体积无水乙醇(一半体积无水乙醇) (必须是室温的), 涡旋或者吹打充分混匀, 不要离心。
- 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),

4. 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 700 μ l, 多可以分两次或者多次加入 **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, 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可能提取的 microRNA。