血清/血浆 microRNA 快速提取试剂盒

KR207 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_2O	室温	5ml
Nase-free 吸附柱 RA 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. 所有的溶液应该是澄清的，如果环境温度低时溶液可能形成沉淀，此时不应该直接使用，可在 37℃水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
2. 不合适的储存于低温（4℃或者 - 20℃）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℃ - 25℃）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。

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。

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。

操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

⇨ **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250μl样品(血清，血浆)加入750μl 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200μl样品+50μl RNase-free H2O+750 μl Lysis buffer。

2. 将样品剧烈震荡混匀，在15 -30°C条件下孵育5分钟。

3. 每750μl Lysis buffer加200μl 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30-40μl

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。

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15μl，但是使用小体积洗脱会降低一些产量。