

# M5 全血(液体样本) microRNA 快速提取试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 全血(液体样本) microRNA 快速提取试剂盒	50T	MF151-01

## 【储存条件】

本试剂盒请严格按照说明书指示温度保存，储存 6 个月不影响使用效果。漂洗液 1 和漂洗液 2/3 加入无水乙醇后，可以在常温保存。漂洗液 2/3 可能加入乙醇使用几天后出现沉淀晶体，吸上清使用就可以，不影响使用。

## 【产品简介】

近年来因为对 RNA 干扰和调节性小 RNA 的广泛深入研究，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，而酚/胍抽提和乙醇沉淀并不能有效沉淀回收微小分子 RNA。本试剂盒采用独特的裂解液迅速裂解全血（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。

## 【产品特色】

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用 Whatman 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. 独特的裂解液配方，可以直接裂解全血，不需要先裂解去除红细胞。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 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。

## 【产品组份】

	50T	注意事项
Lysis Buffer	50ml	4 度避光保存
漂洗液 1	12ml	初次使用前请按瓶标说明加入 28ml 的无水乙醇
漂洗液 2/3	10ml	初次使用前请按瓶标说明加入 42ml 的无水乙醇
RNase-Free H <sub>2</sub> O	10ml	室温密闭干燥保存
RNase-Free 吸附套管(RA)	50 套	室温密闭干燥保存
microRNA 吸附套管 (MA)	50 套	室温密闭干燥保存

## 【注意事项】

1. 所有的离心步骤均在室温完成（4℃ 离心也可以），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。
2. 需要自备乙醇（尽量新开封或者 RNA 专用），氯仿，一次性注射器，研钵。
3. Lysis Buffer、漂洗液 1 中含有刺激性化合物，**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。**
4. 样品处理量绝对不要超过基因组清除柱 DA 和和 RNA 吸附柱 RA 处理能力，否则造成 DNA 残留或产量降低。开始摸索实验条件时，如果不清楚样品 DNA/RNA 含量时可使用较少的样品处理量，将来根据样品试验情况增加或者减少处理量。
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 RLT 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°C 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°C 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：** OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的 RNA，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 读数（10mM Tris, pH7.5）在 2.1-2.2 之间（100% 纯的 RNA 比值一般是 2.2，我们的产品标准一般可以达到 2.1-2.2）。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 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 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 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 OD<sub>260</sub>，OD<sub>280</sub> 测定，按照以下公式进行 RNA 浓度的计算：终浓度 (ng/μl) = (OD<sub>260</sub>) × (稀释倍数 n) × 40。

### 【操作步骤（提取包含 microRNA 的总 RNA）】

<第一次使用前请先在漂洗液 1，漂洗液 2/3 中加入指定量的无水乙醇！>

1. 每 0.25ml 液体样品（血清、血浆或者脑脊液等）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<sup>6</sup> 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 和液体样品的最终体积比是 3:1。
2. 将样品剧烈震荡混匀，在 15-30 度条件下孵育 5 分钟使核蛋白体完全分解。
3. 每 0.75ml Lysis Buffer 加入 200μl 氯仿，剧烈振荡 15 秒，室温放置 2-3 分钟。
4. 4 度，12,000rpm 离心 10 分钟。样品会分成 3 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 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 漂洗液 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 漂洗液 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 漂洗液 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 H<sub>2</sub>O（事先在 100°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。
11. 如果预期 RNA 产量 > 30μg，加 30-50μl RNase-Free H<sub>2</sub>O 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>。

**【microRNA 富集方法（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 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。
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 8-11 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 700 $\mu$ l, 如果液体多可以分两次加入)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 8-11 操作漂洗，洗脱得到富集的 microRNA。

**【其他说明】**

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。

**【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。