

全血 miRNA 试剂盒说明书

产品组成

全血 miRNA 试剂盒	5 次制备	50 次制备
Cat. No.	5205005	5205050
过滤柱	5 套	50 套
核酸纯化柱	5 套	50 套
Buffer L9	6 ml	55 ml
Buffer WA (浓缩液)	1.9 ml	12 ml
Buffer WBR (浓缩液)	1.5 ml	12 ml
RNase-free Water	1.5 ml	2 ml×2
说明书	1 份	1 份

产品储存

Buffer L9 请置于 2~8℃ 贮存。

其他物品和试剂如果储存于室温 (15~25℃)，可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品储存于 2~8℃，可延长产品的有效期至两年以上。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

产品介绍

本产品适合从 500 μl 新鲜的全血或者骨髓中分离纯化 miRNA。本试剂盒采用强烈的裂解液溶解并沉淀去除血红蛋白和基因组 DNA，用不同孔径的纯化柱吸附血液中的 RNA 或 miRNA，残留的蛋白与 PCR 抑制物则被过滤除去，RNA 或 miRNA 经 Buffer WA 和 Buffer WBR 洗涤后，用 RNase-free Water 洗脱，即可用于各种分子生物学实验。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇
2. RNase-free 的 1.5 ml 离心管或 2 ml 离心管
3. 移液器吸头（为避免 RNA 酶的污染，请选用含有滤芯的 RNase-free 移液器吸头）
4. 乳胶手套、一次性口罩等防护用品和纸巾
5. 台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
6. 旋涡振荡器
7. 不使用 RNA 酶的实验室

使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25℃。
2. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WA 和 Buffer WBR 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾作好“乙醇已加”的标记。
3. 由于唾液、皮肤上均含有 RNA 酶，请在 RNA 提取的全过程中都戴口罩和乳胶手套。
4. 尽量使用离体 3 小时内的新鲜全血或者骨髓进行 RNA 提取，否则将因为 RNA 的降解而影响最终 miRNA 的回收效率。如果不能及时将新鲜的全血进行 RNA 提取，可将全血用 Buffer L9 溶解后于 -20℃ 或者更低（-70℃）冻存。（详见步骤 1）

注意事项:

由于 miRNA 长度短，总量低，如果按 miRNA 单独纯化方案操作，miRNA 的回收效率较低。如果已知血液中的总 RNA 不影响后续 miRNA 检测的前提下，我们推荐采用 miRNA 和血液总 RNA 共提取的方案，miRNA 和血液总 RNA 如果共同吸附到核酸纯化柱上，再共同洗脱，miRNA 的回收效率会有非常大的提高。

miRNA 和血液总 RNA 共提取方案:

1. 在 2 ml 离心管（有盖离心管，用户自备）中加入 1 ml Buffer L9，再加入 500 μ l 全血或骨髓(EDTA 抗凝)，旋涡振荡 30 秒混合均匀。

* 如果不能及时将新鲜获得的全血或者骨髓进行 RNA 提取，可在本步骤将溶解后的全血于 -20 $^{\circ}$ C 冻存。溶解后的全血在 -20 $^{\circ}$ C 至少冻存两个星期以内而不影响 RNA 的提取效率。

* Buffer L9 具有腐蚀性，请戴防护用品进行操作。

2. 13000 rpm 离心 10 分钟。在一个洁净的 2 ml 离心管（有盖离心管，用户自备）中加入 1100 μ l 无水乙醇备用。

3. 吸取 700 μ l 离心上清转移到装有无水乙醇的 2 ml 离心管中，盖上管盖，旋涡振荡数秒混合均匀。

* 宁可吸取少于 700 μ l 的离心上清也不要吸取下相及相间沉淀，沉淀物会严重影响最终 RNA 的纯度。

* 上清中所含的血色素可在洗涤步骤被除去，不影响最终 RNA 的纯化效果。

4. 转移 600 μ l 步骤 3 中的混合液到核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

5. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，重复步骤 4 直至所有的混合液都滤过核酸纯化柱。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

6. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 500 μ l Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

7. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 700 μ l Buffer WBR，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

8. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

9. 弃 2 ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个 RNase-free 的 1.5 ml 离心管中，在纯化柱中加入 50 μ l RNase-free Water，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

10. 弃纯化柱，洗脱的 RNA(包含 miRNA)可立即用于各种分子生物学实验；或者将 miRNA 储存于 -70 $^{\circ}$ C 备用。

miRNA 单独纯化方案：

1. 在 2 ml 离心管（有盖离心管，用户自备）中加入 1 ml Buffer L9，再加入 500 μ l 全血或骨髓(EDTA 抗凝)，旋涡振荡 30 秒混合均匀。

* 如果不能及时将新鲜获得的全血或者骨髓进行RNA提取，可在本步骤将溶解后的全血于 - 20 $^{\circ}$ C 冻存。溶解后的全血在 - 20 $^{\circ}$ C 至少冻存两个星期以内而不影响RNA的提取效率。

* Buffer L9具有腐蚀性，请戴防护用品进行操作。

2. 13000 rpm 离心 10 分钟。在一个洁净的 1.5 ml 离心管（有盖离心管，用户自备）中加入 400 μ l 无水乙醇备用。

3. 吸取 700 μ l 离心上清转移到装有无水乙醇的 1.5 ml 离心管中，勿弃吸头，直接用吸头吸注两次混匀，吸取混合液进入步骤 4 的操作。

* 宁可吸取少于 700 μ l 的离心上清也不要吸取下相及相间沉淀，沉淀物会严重影响最终 RNA 的纯度。

* 上清中所含的血色素可在洗涤步骤被除去，不影响最终 RNA 的纯化效果。

4. 转移 600 μ l 步骤 3 中的混合液到过滤柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

5. 将 2 ml 离心管中的滤液转移到一个洁净的 2 ml 离心管中（有盖离心管，用户自备），将过滤柱置回到 2 ml 离心管中，将步骤 3 中剩余的混合液都加入过滤柱，12000 rpm 离心 30 秒。

* 步骤 4 和步骤 5 是为了过滤除去上清液中的大片段 RNA。

6. 弃过滤柱，合并两次滤液到一个 2 ml 离心管中（约 1100 μ l），加入 700 μ l 无水乙醇，盖上管盖，旋涡振荡数秒混合均匀。

7. 转移 600 μ l 步骤 6 中的混合液到核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

8. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，重复步骤 7 直至所有的混合液都滤过核酸纯化柱。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

9. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 500 μ l Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

10. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 700 μ l Buffer WBR，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

11. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

12. 弃 2 ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个 RNase-free 的 1.5 ml 离心管中，在纯化柱中加入 50 μ l RNase-free Water，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

13. 弃纯化柱，洗脱的 miRNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 miRNA 储存于 - 70 $^{\circ}$ C 备用。