AipPure 血清/血浆 miRNA 提取试剂盒(离心柱型)

AipPure Serum/Plasma miRNA Extraction Kit(Centrifugal Column)

使 用 说 明 书

◆版本号：231103

◆目录号：MR202

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次(MR202-01)
Lysis Buffer	4°C避光	50mL
Wash Solution 1	室温	12mL 第一次使用前加入 28mL 无水乙醇
Wash Solution 2/3	室温	10mL 第一次使用前加入 42mL 无水乙醇
RNase-free Water	室温	10mL
吸附柱 RA 和收集管 (RNase-free)	室温	50 套

◆**适用范围：**适用于从动物及人体血浆和血清中纯化包括 miRNA 的无细胞总 RNA。

◆**产品储存：**本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。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。

◆**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 和 Northern-blot 等实验。

◆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。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，吸上清使用即可。
2. 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。
3. 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密封保存。
4. 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 13,000rpm 的传统台式离心机。
5. 需要自备乙醇、氯仿、一次性注射器和研钵等。
6. Lysis Buffer 和 Wash Solution 1 含有刺激性化合物，操作时需穿防护服并佩戴一次性手套，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。
7. 预防 RNase 污染及实验前的准备：经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致 RNase 污染。使用 RNase-free 的塑料制品和枪头避免交叉污染。RNA 提取过程中应使用 RNase-free 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在 150℃烘烤 4 小时，塑料器皿可在 0.5M NaOH 中浸泡 10 分钟，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除 RNase。配制溶液应使用 RNase-free 的水或 DEPC 水(DEPC 水的制备：将水加入到干净的玻璃瓶中，加入 DEPC 至终浓度 0.1%(v/v)，37℃放置过夜，高压灭菌)。
8. RNA 纯度及浓度检测：一般情况下通过测量 OD_{260} 值可以知道 RNA 产量，测量 OD_{260}/OD_{280} 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(取包含 microRNA 的总 RNA)：

提示：第一次使用前请先在 Wash Solution 1 和 Wash Solution 2/3 瓶中按照标签提示加入指定量乙醇！并打钩做好标记避免重复加入！

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充分裂解。

注：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 Water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 Water+750μL 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. 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/microRNA存在于水相中)。水相层的容量大约为所加Lysis Buffer体积的70%左右。
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!)，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)12,000rpm离心30-60秒，弃掉废液。
7. 加入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!)，12,000rpm 离心30秒，弃掉废液。加入500μL Wash Solution 2/3，重复操作一遍。
9. 将吸附柱RA放回空收集管中，13,000rpm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，放入新的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，12,000rpm 离心1分钟，收集RNA溶液，-70℃保存RNA，防止降解。

    注：如果预期RNA产量>30μg，加30-50μL RNase-free Water重复步骤10操作，合并两次洗脱液；如果需要RNA浓度高，可使用第一次的洗脱液重新加回到吸附柱重复步骤操作10。洗脱两遍的RNA洗脱液浓度高，分两次洗脱合并洗脱液的RNA产量高，比前者高15–30%，但是浓度要低，用户根据实验需要自行选择。

==========

扫码关注我们