

Imagene[®]

BLOODmisi Liquid microRNA Kit

BLOODmisi 全血 (液体样本) microRNA 快速提取试剂盒



CODONX
RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

BLOODmisi 全血 (液体样本) microRNA

快速提取试剂盒

目录号 RE145

使用说明书

网站: www.codonx.com

咨询电话: 010-56315162

技术支持 QQ: 3090544158

- 1/适用范围
- 2/试剂盒组成、储存、稳定性
- 3/储存事项
- 4/产品介绍
- 5/产品特点
- 6/注意事项
- 7/操作步骤
- 8/附: microRNA 富集方法

1/适用范围:

适用于快速提取各种全血/血清/血浆/液体样本miRNA和总RNA。

2/试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次 (RE145-01)
Lysis buffer	4°C 避光	50 ml
70%乙醇	室温	9ml RNase-free H ₂ O 第一次使用前按说明加指定量乙醇
漂洗液 A	室温	12 ml 第一次使用前加入 28ml 无水乙醇
漂洗液 B	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 AC 和收集管 CT	室温	50 套
microRNA 吸附柱 MA 和收集管 CT	室温	50 套

本试剂盒按照指示储存 6 个月不影响使用效果。

3/储存事项

1. 漂洗液 A 和漂洗液 B 加入无水乙醇后，可以在常温保存。
2. 漂洗液 B 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。
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。

4/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/胍抽提和乙醇沉淀并不能有效沉淀回收微小分子 RNA，对于血液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。

5/产品特点：

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用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。
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，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 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。

6/注意事项：

1. **第一次使用前请先在 70%乙醇、漂洗液 A 瓶和漂洗液 B 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. **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 和漂洗液 A 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. 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℃ 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5kb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: OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的RNA,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 读数(10mM Tris, pH7.5)在1.8-2.1之间。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 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OD₂₆₀/OD₂₈₀ 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OD₂₆₀, OD₂₈₀测定,按照以下公式进行RNA浓度的计算:终浓度(ng/μl) = (OD₂₆₀) × (稀释倍数n) × 40。

7/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70%乙醇、漂洗液A瓶和漂洗液B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5~10×10⁶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0.2ml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,多可以分两次加入)加入一个吸附柱 AC 中,(吸附柱 AC 放入收集管 CT 中) 12,000 rpm 离心 30-60 秒，弃掉废液。
- 加 700 μ l 漂洗液 A (**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 漂洗液 B (**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 漂洗液 B，重复一遍。
- 将吸附柱 AC 放回空收集管 CT 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 AC，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。
- 如果预期 RNA 产量>30 μ g,加 30-50 μ l RNase free water 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 1 5-30%，但是浓度要低,用户根据需要选择。

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

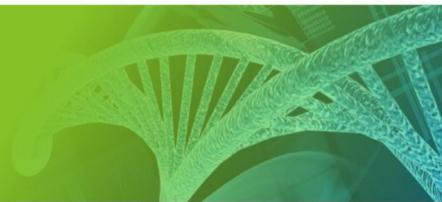
- 按照前面标准操作步骤 1-5 操作，直到得到上清。
- 较精确估计上清体积，加入等体积 70% 乙醇 (**请先检查是否已加入无水乙醇!**) (必须是室温的)，涡旋或者吹打充分混匀，不要离心。
- 将混合物加入一个吸附柱 AC 中，(吸附柱 AC 放入收集管 CT 中) 12,000 rpm 离心 30-60 秒，**收集滤过物**。将滤过物从收集管 CT 转移到一个新的离心管后，把

吸附柱子放回空的收集管 CT 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 7-10 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 μ l，多可以分两次加入)加入 **microRNA 吸附柱 MA** 中，(吸附柱放入收集管 CT 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，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。



CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd

Yizhuang Biomedical Park
Building 6, No.88 6th Kechuang St. Economic-Technological Development Area, Beijing, China
Tel: 010-56315162 www.codonx.com