



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com

## BLOODmisi 全血(液体样本)微小RNA快速提取试剂盒

(目录号: ZP415)

# ZOMANBIO

为生命科学研究探索提供每一款好的产品

北京庄盟国际生物基因科技有限公司  
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.

Order: 010-6261-7225

Free Phone: 400-611-2007

Technical: 010-6297-9301

Fax: 010-6296-8805

Email: zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com

实验室使用, 仅用于科研  
北京庄盟国际生物基因科技有限公司  
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.

目录编号	包装单位
ZP415-01	20次
ZP415-02	50次

### ■ 适用范围：

适用于快速提取各种全血/血浆/液体样本miRNA和其它各种小RNA

### ■ 试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	20次	50次
Lysis buffer	4°C避光	20 ml	50 ml
Wash Solution 1	室温	9 ml 第一次使用前加入21ml无水乙醇	9 ml
Wash Solution 2/3	室温	10 ml 第一次使用前加入40ml无水乙醇	10 ml
RNase-free H <sub>2</sub> O	室温	10 ml	10 ml
RNase-free 吸附柱RA和收集管	室温	20套	50套

本试剂盒按照指示储存6个月不影响使用效果。

### ■ 储存事项：

1. Wash Solution 1和Wash Solution 2/3加入无水乙醇后，可以在常温保存一个月，如果要更长时间保存，请存放在4°C，**但是使用前，应该先恢复到室温。**
2. 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。
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。

### ■ 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/ $\beta$ -巯基乙醇迅速直接裂解全血（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。

### ■ 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，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。

**■ 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. **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，一次性注射器，研钵。

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. 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℃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：**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（10mMTris, 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。

**■ 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5~10×10<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0.2 ml氯仿, 剧烈振荡15秒并室温下放置2分钟。

4. 于4°C 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 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30-50μl RNase free water (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 water重复步骤11, 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。

**附：微小RNA富集方法**

1. 按照前面标准操作步骤1-4操作, 直到得到上清。

2. 精确估计上清体积, 加入1/3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**。如果混合物大于700μl, 则应该先加700μl离心, 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, **合并两次滤过物**, 计算体积。

**此时, 滤过物含有微小RNA, 柱子上面是除去了微小RNA的总RNA, 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微小RNA的总RNA。**

4. 精确估计**滤过物体积**, 加入2/3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. 取一套新的离心吸附柱子RA, 将上一步骤混合物(每次小于700μl, 多可以分两次加入)加入吸附柱RA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7-10操作漂洗, 洗脱得到富集的微小RNA。