



GENESEED® Serum/Plasma miRNA Extraction Kit

产品介绍

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。

产品组成

Contents	Storage	T0301
		50T
Lysis Buffer	2 ~ 8°C	100 mL
Wash Solution 1 (BR1)	室温	12 mL add 28mL of anhydrous ethanol before first use
Wash Solution 2 (BR2)	室温	10 mL add 42mL of anhydrous ethanol before first use
RNase-free H ₂ O	室温	10 mL
RNA MinElute spin column Collection Tubes(2 mL)	室温	50

储藏与保质期

本试剂盒按试剂标签提示分开储，在干燥条件下可保存 12 个月。

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。

自备材料

RNase-free filter pipette tips , RNase-free H₂O, 1.5/2.0 mL EP, 无水乙醇, 氯仿, 台式高速离心机, 圆底水平转子离心机。



注意事项

1. 本商品仅限于实验室科研用途，非临床用途，不能作为食品、化妆品或者家庭用品等用途。
2. 首次使用前在 WashSolution1(BR1) 和 WashSolution2(BR2) 中加入指定量的无水乙醇，混合均匀，并在瓶子上用记号笔标记。
3. 每种溶液使用完毕后，瓶盖应紧闭，以免试剂挥发变性，影响实验结果。
4. 请戴上乳胶手套，避免皮肤、眼睛和布料接触，如有任何接触，请用大量清水或生理盐水冲洗，并立即前往医院。
5. 所有实验步骤可以在室温下进行，但动作要快，操作要小心。

操作方法（实验前请先阅读注意事项）：

操作步骤（250 μ L 样品）：

1. 预先准备血清或血浆样品，每 200 μ L/400 μ L/500 μ L 样品（血清，血浆）加入 1mL/2mL/2.5mL Lysis Buffer，用涡旋振荡剧烈震荡混匀，或者用移液器上下吹打液体样品数次帮助混匀裂解。对于含有高污染物样品，可以适当减少处理量，不足的体积用 RNase-free H₂O 补足。如果需要更高产量 miRNA，可加大血清血浆样本处理量 250 ~ 1000 μ L。Lysis Buffer 和液体样品的终体积比总是 5: 1，Lysis Buffer 不够用可单独采购。
2. 在室温（15 ~ 25 $^{\circ}$ C）条件下，将含有裂解液样品孵育 5 分钟。
3. 加样品等体积 200 μ L/400 μ L/500 μ L 氯仿，涡旋剧烈振荡 15 秒并室温（15 ~ 25 $^{\circ}$ C）下放置 2 ~ 3 分钟，彻底混匀对于后续相分离很重要。
4. 使用台式高速冷冻离心机，4 $^{\circ}$ C，12000 rpm 离心 10 ~ 15 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（自备）中，加入 1.5 倍体积的无水乙醇（必须是室温的），立即吹打混匀。添加乙醇后可能会形成沉淀，但这不会影响实验，不要离心。
6. 将混合物分次（每次小于 700 μ L）加入 RNA 微量吸附柱 RNA MinElute spin column (white) 中，吸附柱放入收集管中，12,000 rpm 离心 30 ~ 60 秒，倒弃收集管中滤过液。
7. 加 700 μ L Wash Solution 1（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000rpm 离心 30 秒，倒弃收集管中滤过液。
8. 加入 500 μ L Wash Solution 2（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000 rpm 离心 30 秒，倒弃收集管中滤过液。
9. 重复一遍，加入 500 μ L Wash Solution 2（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000 rpm 离心 30 秒，倒弃收集管中滤过液。
10. 将 RNA 吸附柱放回空收集管中，13,000 rpm 离心 2 ~ 5min，尽量除去漂洗液，以免漂洗



液中残留乙醇抑制下游反应。

11.取出 RNA 吸附柱放入一个 RNase free 新的离心管（自备）中，根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位滴加 20 ~ 30 μ L RNase free H₂O（70 ~ 90 $^{\circ}$ C 水浴加热可提高产量），室温放置 1 分钟，13,000 rpm 离心 1min。

备注：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），或者如果预期 RNA 产量 > 10 μ g，再加 10 ~ 30 μ L RNase free water 重复步骤 11，合并两次洗液。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。

常见问题与解决方案

血清血浆样品分离和储存

1. 血清样品：

用促凝管（黄盖）收集全血，为了完全凝固将试管置于室温下 10 ~ 20 分钟。

Note：装有血清凝胶的促凝管可在 10 分钟后进行处理，而不装血清凝胶的试管应在室温下储存至少 30 分钟，以便全血自然凝聚。

2. 血浆样品：

用 EDTA 抗凝采血管（紫盖）采集全血，在室温或 4 $^{\circ}$ C 下储存，并在 20 小时内处理。

Note：不要使用含肝素的采血管，因为这种抗凝剂会干扰下游分析，如 RT-PCR。

3. 使用低速离心机，在 1900 xg（3000 rpm），4 $^{\circ}$ C 的条件下离心 10 ~ 15 分钟。

4. 小心地将上层浅黄色上清转移到一个新的离心管中，不要干扰中间的黄色层（包含白细胞和血小板）。正常情况下从 10mL 全血中可获得 3 ~ 5mL 血清或 4 ~ 5mL 血浆。

Note：中间棕黄色层携带的白细胞和血小板是 miRNA/RNA 污染的最可能来源。

5. 如果在采样当天用于核酸纯化，则在 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 储存，尽快进行下一步处理。为了更长的储存时间，将样品在 -80 $^{\circ}$ C 下冷冻保存，为了更稳定保存血清血浆样品中 RNA 不被降解，建议 Lysis Buffer 和液体样品的体积 5: 1 混匀后，再置于 -80 $^{\circ}$ C 下冷冻保存。

6. 在使用冷冻血清血浆进行核酸纯化之前，应在室温下解冻。