

一般实验室使用，仅用于 *体外*

血液（血清、血浆）miRNA快速提取试剂盒（离心柱型）III型

用于快速提取血液、血清、血浆高纯度microRNA

目录号：**RP5908**
RP5909

使用手册

2014年1月，第1版

目 录

一、试剂盒组成、储存、稳定性·····	1
二、原理简介·····	2
三、试剂盒特点·····	2
四、注意事项·····	2
五、操作步骤·····	4
六、疑难解答·····	6



北京百泰克生物技术有限公司

BioTeke Corporation

一、试剂盒组成、储存、稳定性

试剂盒组成	保存	50次 (RP5908)	100次 (RP5909)
裂解液 MRL	4℃避光	55 ml	55 ml×2
漂洗液 RW	4℃ (一个月) -20℃ (长期)	15 ml×2	25 ml×2
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml	20 ml
70%乙醇	室温	9ml RNase-free H ₂ O	18ml RNase-free H ₂ O
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
去蛋白液 RE	室温	30ml	50ml
溶液 RY	室温	25ml	50ml
RNase-free 吸附柱 RA	室温	50 个	100 个
RNase-free 吸附柱 RB	室温	50 个	100 个
收集管 (2ml)	室温	100 个	200 个

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

注意事项

1. 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶和 70%乙醇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. 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。裂解液 MRL 可以常温运输，收到后 4℃避光保存。
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。
- 5.

二、原理简介

改进的异硫氰酸胍/酚一步法裂解细胞和灭活 RNA 酶，然后总 RNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，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、蛋白等杂质去除，最后低盐的 RNase free water 将纯净 RNA（microRNA）从硅基质膜上洗脱。

三、试剂盒特点

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. 结合了异硫氰酸胍/酚一步法试剂稳定性好，纯度高和离心柱方便快捷的优点，不需要异丙醇沉淀和乙醇洗涤过程，RNA 可以直接从离心柱上洗脱避免了过度干燥不易溶解问题。
3. 独有的 MRL 裂解液配方，可以有效的消除基因组污染。
4. 多次漂洗去蛋白过程，提取 RNA 纯度更高。

四、注意事项（实验前必须首先阅读这部分！）

1. 为防止RNA降解，所有离心步骤如未加说明，均在4℃低温进行。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。
2. 裂解液 MRL 中含有刺激性有害化合物，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。

五、操作步骤

* 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量乙醇!

1. 匀浆处理

a. 生物液体

每0.25ml液体样品(血液、血清, 血浆, 脑脊液等等)加入0.75ml 裂解液MRL, 用加样枪吹打液体样品几次以帮助裂解样品中细胞。每 $5\sim 10\times 10^6$ 个细胞至少加入0.75ml裂解液MRL。裂解液MRL和液体样品的终体积比总是3: 1。

b. 组织

用玻璃或强力匀浆器搅匀组织样品, 保存于液氮内样品需要用研钵磨碎, 每50~100mg组织加1ml的裂解液MRL后匀浆。组织样品容积不能超过MRL容积的10%。

c. 单层生长的细胞

直接往直径3.5 cm的培养板中加入1ml的MRL溶解细胞, 并用移液枪轻轻吹打混匀。依据培养板的面积而不是依据细胞的数量来决定所需的MRL量(每 10cm^2 加1ml)。一般情况下, 普通大小的细胞培养瓶, 加入1ml的MRL, 迅速轻摇使MRL充分和瓶底所有细胞接触裂解细胞并灭活RNA酶, 轻轻用移液枪反复吹打混匀。当MRL量不足时可导致抽提的RNA中污染有DNA。

d. 悬浮生长的细胞

通过离心来沉淀细胞。在MRL试剂中用移液枪反复吹打来裂解细胞。每 $5\sim 10\times 10^6$ 的动物细胞, 植物或酵母菌细胞或每 1×10^7 细菌加1ml的MRL。在加入MRL前应避免洗涤细胞, 否则会增加mRNA降解的可能性。破裂某些酵母菌和细菌可能需要使用匀浆器。

2. 将匀浆样品剧烈震荡混匀, 在 15-30 °C 条件下孵育 5 分钟以使核蛋白体完全分解。

3. **可选步骤:** 4 °C 的条件下 12,000rpm 离心 10 分钟, 小心取上清转入一个新的 RNase free 的离心管中。

4. 每 0.75mlMRL 加 0.2ml 氯仿。盖紧样品管盖, 剧烈振荡 15 秒并将其

在室温下孵育 3 分钟。

5. 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MRL体积的60%, 把水相转移到新管中, 进行下一步操作。

6. 加入 0.4 倍体积 70%乙醇(请先检查是否已加入无水乙醇!), 颠倒混匀(此时可能会出现沉淀)。得到的溶液和可能沉淀一起转入吸附柱 RA 中(吸附柱套在收集管内)。

7. 10,000rpm 离心 45 秒, 收集下滤液(下滤液中含有 microRNA), 准确估计下滤液的体积(准确性非常重要), 加入 1/2 的溶液 RY 之后再加入等体积的无水乙醇, 颠倒几次混匀, 将混合液倒入到吸附柱 RB 中(吸附柱 RB 容量约为 700 μ l, 所以要分几次离心加入同一吸附柱), 10,000rpm 离心 30 秒弃掉废液。

注: 如果要分离大 RNA (18s 和 28s), 也可以从吸附柱 RA 中按照以下步骤得到。

8. 加入 500 μ l 去蛋白液 RE, 12,000rpm 离心 45 秒, 弃掉废液。

9. 加入 700 μ l 漂洗液 RW(请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm 离心 60 秒, 弃掉废液。

10. 加入 500 μ l 漂洗液 RW, 12,000 rpm 离心 60 秒, 弃掉废液。

11. 将吸附柱 RB 放回空收集管中, 12,000 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。

12. 取出吸附柱 RB, 放入一个 RNase free 离心管中, 根据预期 miRNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-80 μ l RNase free water (事先在 65-70°C 水浴中加热效果更好), 室温放置 2 分钟, 12,000 rpm 离心

1 分钟。收集得到纯净 microRNA 保存于-20℃ 或者更低。

六、疑难解答 (Trouble shooting)

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
RNA产量低	样品裂解或者匀浆不彻底	液氮研磨的时候尽量研磨完全，加入裂解液 MRL 后剧烈震荡或者用枪头吹打帮助裂解。匀浆步骤可以提高产量。新鲜组织或者植物组织可以不需液氮，在干净研钵内加入适量裂解液 MRL 直接研磨。
	使用的样品或者裂解物在-20℃或者-70℃存放太久	存放时间过长可能降低 RNA 产量，应尽快处理样品或者裂解物。
	组织本身含 RNA 少	不同类型的组织和细胞含有不同量的 RNA,对于含量少的组织应该适当提高起始处理量。
	超过了吸附柱的最大吸附能力	同一个样品使用多个吸附柱，然后合并得到 RNA。
	去蛋白液 RE 和漂洗液 RW 内忘记加乙醇	第一次实验时，漂洗液 RW 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量无水乙醇。
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ 吸光度比值<1.6	分光光度计检测吸光度时，RNA 样品不是溶于 TE，而是溶于水。低离子浓度和低 pH 条件下，OD ₂₈₀ 值会较高，造成比值低。	检测时用 TE 稀释样品

前表

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
	污染了蛋白或者苯酚	做步骤 5 吸取上清水相的时候小心不要吸取到中间相和下层有机相，确保做了步骤 8。
基因组DNA污染	起始样品量超出了裂解液 MRL 的处理范围	选择合适的起始处理量。
	样品中含有有机溶剂（如乙醇，DMSO 等），强缓冲液或碱性溶液。	避免这些可以改变裂解液 MRL 性质或者 PH 值的物质。
	吸取上清时吸入了中间相	做步骤 5 吸取上清水相的时候小心不要吸取到中间相。
RNA降解，完整性不佳	RNA 提取所用各种物品和试剂没有灭活 RNA 酶	按照注意事项准备 RNA 提取的各种用品。
	组织取出后没有马上处理或冷冻，提取前已经降解	组织应该尽量立刻处理，不能及时处理的应该尽快保存于液氮或者-70℃。
	提取的 RNA 样品没有保存在-20℃或-70℃低温	尽可能的将 RNA 保存在-70℃的低温。
	样品提取过程中降解	提取动作应该尽可能的快，离心应该低温进行，取用 RNA 时尽量冰上进行。
下游的 RT-PCR实验不成功	忘记做步骤 10，或者将吸附柱取出时下端碰到了收集管里面的漂洗液，造成洗脱下来的 RNA 含有乙醇，乙醇抑制了逆转录反应	确保做了步骤 10，然后小心取出吸附柱，可以在空气中晾几分钟，让残留乙醇挥发。

接前表

出现的问题	可能的原因	建议解决方法
	污染了蛋白或者苯酚	做步骤 5 吸取上清水相的时候小心不要吸取到中间相和下层有机相，确保做了步骤 8。
基因组DNA 污染	起始样品量超出了裂解液 MRL 的处理范围	选择合适的起始处理量。
	样品中含有有机溶剂（如乙醇，DMSO 等），强缓冲液或碱性溶液。	避免这些可以改变裂解液 MRL 性质或者 PH 值的物质。
	吸取上清时吸入了中间相	做步骤 5 吸取上清水相的时候小心不要吸取到中间相。
RNA降解，完整性不佳	RNA 提取所用各种物品和试剂没有灭活 RNA 酶	按照注意事项准备 RNA 提取的各种用品。
	组织取出后没有马上处理或冷冻，提取前已经降解	组织应该尽量立刻处理，不能及时处理的应该尽快保存于液氮或者-70℃。
	提取的 RNA 样品没有保存在-20℃或-70℃低温	尽可能的将 RNA 保存在-70℃的低温。
	样品提取过程中降解	提取动作应该尽可能的快，离心应该低温进行，取用 RNA 时尽量冰上进行。
下游的 RT-PCR实验不成功	忘记做步骤 10，或者将吸附柱取出时下端碰到了收集管里面的漂洗液，造成洗脱下来的 RNA 含有乙醇，乙醇抑制了逆转录反应	确保做了步骤 10，然后小心取出吸附柱，可以在空气中晾几分钟，让残留乙醇挥发。



BioTeke

北京百泰克生物技术有限公司
BioTeke Corporation

地 址：北京海淀区留学人员创业园

电 话：010-62951781

传 真：010-62951781

网 址：www.bioteke.com

Email: info@bioteke.com