杭州新景生物试剂开发有限公司
地址：浙江省杭州市西湖科技经济园西园一路 8 号 4 幢 5 层
邮编：310030 电话：0571-87381295 传真：0571-87381297

全血 miRNA 纯化试剂盒说明书

产品组成

全血 miRNA 纯化试剂盒 Cat. No.	5 次制备 5205005	50 次制备 5205050
过滤柱	5 套	50 套
核酸纯化柱	5 套	50 套
Buffer L9	6 ml	55 ml
Buffer WA（浓缩液）	1 ml	10 ml
Buffer WBR（浓缩液）	1 ml	8.5 ml
RNase-free Water	1.5 ml	2 ml×2
说明书	1 份	1 份

产品储存

1. Buffer L9 可常温（0~30℃）运输，收到产品后请置于 2~8℃贮存。
2. 其他试剂和物品如果储存于常温（0~30℃），可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品储存于 2~8℃，可延长产品的有效期至两年以上。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn，电话：400-0099-857。

产品介绍

本产品适合从 500 µl 新鲜的全血或者骨髓中分离纯化 miRNA。本试剂盒采用强烈的裂解液溶解并沉淀去除血红蛋白和基因组 DNA，用不同孔径的纯化柱吸附血液中的 RNA 或 miRNA，残留的蛋白与 PCR 抑制物则被过滤除去，RNA 或 miRNA 经 Buffer WA 和 Buffer WBR 洗涤后，用 RNase-free Water 洗脱，即可用于各种分子生物学实验。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇
2. RNase-free 的 1.5 ml 离心管或 2 ml 离心管
3. 移液器及吸头（为避免 RNA 酶的污染，请选用含有滤芯的 RNase-free 移液器吸头）
4. 乳胶手套、一次性口罩等防护用品和纸巾
5. 台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
6. 旋涡振荡器
7. 不使用 RNA 酶的实验室

使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25℃。
2. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WA 和 Buffer WBR 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾做好“乙醇已加”的标记。
3. 由于唾液、皮肤上均含有 RNA 酶，请在 RNA 提取的全过程中都戴口罩和乳胶手套。
4. 尽量使用离体 3 小时内的新鲜全血或者骨髓进行 RNA 提取，否则将因为 RNA 的降解而影响最终 miRNA 的回收效率。如果不能及时将新鲜的全血进行 RNA 提取，可将全血于 - 70℃以下冻存或者用 Buffer L9 溶解后于 - 20℃冻存。（详见操作步骤 1）

注意事项

由于 miRNA 长度短、总量低，如果按 miRNA 单独提取方案操作，miRNA 的回收效率较低。如果已知血液中的总 RNA 不影响后续 miRNA 检测的前提下，我们推荐采用 miRNA 和血液总 RNA 共提取方案，miRNA 和血液总 RNA 如果共同吸附到核酸纯化柱上，再共同洗脱，miRNA 的回收效率会有非常大的提高。

操作步骤

miRNA 和血液总 RNA 共提取方案：

1. **在 2 ml 离心管（有盖离心管，用户自备）中加入 1 ml Buffer L9，再加入 500 µl 全血或骨髓(EDTA 抗凝)，盖上管盖，剧烈摇晃 3~5 次，再旋涡振荡 30 秒混合均匀。**

* 如果不能及时将新鲜获得的全血或者骨髓进行 RNA 提取，可将全血或者骨髓于 - 80℃冻存。冻存一年内的样本不影响 RNA 的提取，注意提取 RNA 之前不要反复冻融样本。

* 若没有 - 80℃冰箱，可在本步骤后将溶解的全血于 - 20℃冻存，两个星期内不影响 RNA 的提取效率。

* Buffer L9 具有腐蚀性，请戴防护用品进行操作。

2. **13000 rpm 离心 10 分钟。在一个洁净的 2 ml 离心管（有盖离心管，用户自备）中加入 1100 µl 无水乙醇备用。**
3. **吸取 700 µl 离心上清转移到装有无水乙醇的 2 ml 离心管中，盖上管盖，旋涡振荡数秒混合均匀。**

* 宁可吸取少于 700 µl 的离心上清也不要吸取下相及相间沉淀，沉淀物会严重影响最终 RNA 的纯度。

* 上清中所含的血色素可在洗涤步骤被除去，不影响最终 RNA 的纯化效果。

4. **转移 600 µl 步骤 3 中的混合液到核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**
5. **弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，重复步骤 4 直至所有的混合液都滤过核酸纯化柱。**

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

6. **弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 500 µl Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**

* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

7. **弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 700 µl Buffer WBR，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

8. **弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，14000 rpm 离心 1 分钟。**

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

9. **弃 2 ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个 RNase-free 的 1.5 ml 离心管中，在纯化柱中加入 50 µl RNase-free Water，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。**

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

10. **弃纯化柱，洗脱的 RNA(包含 miRNA)可立即用于各种分子生物学实验；或者将 RNA 储存于 - 70℃以下备用。**

miRNA 单独提取方案：

1. **在 2 ml 离心管（有盖离心管，用户自备）中加入 1 ml Buffer L9，再加入 500 µl 全血或骨髓(EDTA 抗凝)，盖上管盖，剧烈摇晃 3~5 次，再旋涡振荡 30 秒混合均匀。**

* 如果不能及时将新鲜获得的全血或者骨髓进行 RNA 提取，可将全血或者骨髓于 - 80℃冻存。冻存一年内的样本不影响 RNA 的提取，注意提取 RNA 之前不要反复冻融样本。

* 若没有 - 80℃冰箱，可在本步骤后将溶解的全血于 - 20℃冻存，两个星期内不影响 RNA 的提取效率。

* Buffer L9 具有腐蚀性，请戴防护用品进行操作。

2. **13000 rpm 离心 10 分钟。在一个洁净的 1.5 ml 离心管（有盖离心管，用户自备）中加入 400 µl 无水乙醇备用。**
3. **吸取 700 µl 离心上清转移到装有无水乙醇的 1.5 ml 离心管中，勿弃吸头，直接用吸头吸注两次混匀，吸取混合液进入步骤 4 的操作。**

* 宁可吸取少于 700 µl 的离心上清也不要吸取下相及相间沉淀，沉淀物会严重影响最终 RNA 的纯度。

* 上清中所含的血色素可在洗涤步骤被除去，不影响最终 RNA 的纯化效果。

4. **转移 600 µl 步骤 3 中的混合液到过滤柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**
5. **将 2 ml 离心管中的滤液转移到一个洁净的 2 ml 离心管中（有盖离心管，用户自备），将过滤柱置回到 2 ml 离心管中，将步骤 3 中剩余的混合液都加入过滤柱，12000 rpm 离心 30 秒。**

* 步骤 4 和步骤 5 是为了过滤除去上清液中的大片段 RNA。

6. **弃过滤柱，合并两次滤液到一个 2 ml 离心管中（约 1100 µl），加入 700 µl 无水乙醇，盖上管盖，旋涡振荡数秒混合均匀。**
7. **转移 600 µl 步骤 6 中的混合液到核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**
8. **弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，重复步骤 7 直至所有的混合液都滤过核酸纯化柱。**

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

9. **弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 500 µl Buffer WA，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**

* 确认在 Buffer WA 中已经加入无水乙醇。

10. **弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 700 µl Buffer WBR，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。**

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

11. **弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，14000 rpm 离心 1 分钟。**

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

12. **弃 2 ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个 RNase-free 的 1.5 ml 离心管中，在纯化柱中加入 50 µl RNase-free Water，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。**

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

13. **弃纯化柱，洗脱的 miRNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 miRNA 储存于 – 70℃以下备用。**