

Version: AC 6.0 (2024.02.22修订)

SPARKeasy Whole Blood microRNA Kit

全血microRNA快速提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: AC1503

01/产品组分

序号	组分	50 次 AC1503
1	Lysis buffer	50 mL
2	70%乙醇	9 mL RNase Free H ₂ O 第一次使用前加入 21 mL 无水乙醇
3	Wash Solution 1	12 mL 第一次使用前加入 28 mL 无水乙醇
4	Wash Solution 2/3	10 mL 第一次使用前加入 42 mL 无水乙醇
5	RNase Free H ₂ O	10 mL
6	吸附柱 RA 和收集管	50 套
7	microRNA 吸附柱 MA 和收集管	50 套
8	RNase-Free 收集管 (1.5 mL)	50 个

02/保存条件

Lysis buffer于4°C避光保存, 其他组分室温 (15-25°C) 保存。

03/产品概述

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 提取方法如硅胶膜法不能有效吸附回收, 酚/胍抽提和乙醇沉淀并不能有效沉淀回收微小分子 RNA, 对于血液样本更是难以提取。

本试剂盒采用独特的裂解液能迅速直接裂解全血 (液体样本) 和灭活细胞 RNA 酶, 强烈去除蛋白和 DNA, 而 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、离心步骤, 将细胞代谢物、蛋白等杂质去除, 最后低盐的洗脱液将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。该产品可在一小时之内完成样品 RNA 的提取, 提取的总 RNA 完整性好, 无蛋白和基因组 DNA 污染。

04/自备材料

无水乙醇、氯仿

05/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ Wash Solution 1 和 Wash Solution 2/3 加入无水乙醇后，可以在常温保存。
- ◇ Wash Solution 2/3 加入无水乙醇使用几天后可能出现沉淀晶体，不影响使用，直接吸上清使用即可。
- ◇ 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。
- ◇ 第一次使用前请先在 70%乙醇、Wash Solution 1 瓶和 Wash Solution 2/3 瓶中加入指定量无水乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！
- ◇ 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，要用大量清水或生理盐水冲洗。
- ◇ 可根据需要选择使用方案，例如 Northern Blot 或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，可能减少某些下游实验的扩增背景，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。
- ◇ 所有离心操作步骤，均可在室温（15-25°C）下进行。

06/使用方案（提取包含 microRNA 的总 RNA）

1. 每 0.25 mL 液体样品（血清、血浆、脑脊液等）加入 0.75 mL Lysis buffer，用加样枪吹打液体样品帮助裂解样品中的细胞。每 $5-10 \times 10^6$ 个细胞至少加入 0.75 mL Lysis buffer。对于含有高污染物的样品，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是 3:1。
2. 将样品剧烈震荡混匀，在 15-30°C 条件下孵育 5 min 以使核蛋白体完全分解。
3. 每 0.75 mL Lysis buffer 加 0.2 mL 氯仿，剧烈振荡 15 s，室温放置 2 min。
4. 于 4°C 12,000 rpm (13,400×g) 离心 10 min，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，立刻接下步。
6. 将混合物（每次小于 700 μ L，多可以分两次加入）加入到一个吸附柱 RA 中（置于收集管中），12,000 rpm (13,400×g) 离心

30-60 s, 弃废液。

7. 加入 700 μL Wash Solution 1 (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm (13,400 \times g) 离心 30 s, 弃废液。
8. 加入 500 μL Wash Solution 2/3 (请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000 rpm (13,400 \times g) 离心 30 s, 弃废液。重复此步骤。
9. 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 12,500 rpm (14,500 \times g) 离心 2 min, 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 30-50 μL RNase Free H_2O (事先在 100 $^\circ\text{C}$ 水浴中预热效果更好), 室温放置 1 min, 12,000 rpm (13,400 \times g) 离心 1 min。
11. 如果预期 RNA 产量>30 μg , 加 30-50 μL RNase Free H_2O 重复步骤 10, 合并两次洗脱液, 或使用第一次的洗脱液加回到吸附柱重复步骤一遍。

▲使用第一次洗脱液再次洗脱的 RNA 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。

◇ RNA 提取方法



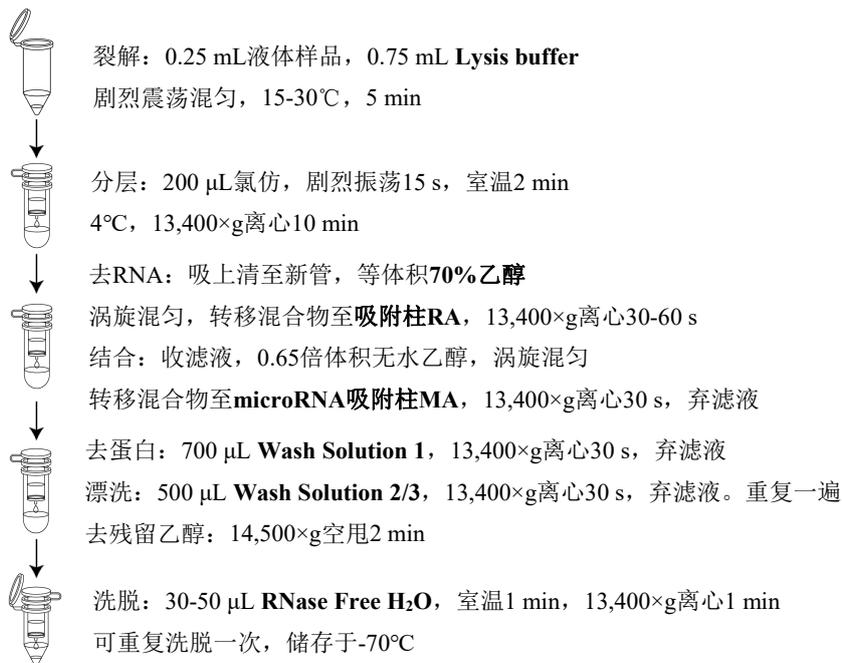
附录:

microRNA 相对富集方法 (仅提取 microRNA, 不包含 >200 nt 其它总 RNA 成分)

1. 按照前面标准操作步骤 1-4 操作, 获得上清。
2. 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。

3. 将混合物（每次小于 700 μL ，可分两次转移）加入到一个吸附柱 RA 中（置于收集管），12,000 rpm（13,400 \times g）离心 30-60 s，收集滤过物。
▲此时，滤过物含有 microRNA，吸附柱上是总 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，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 μL ，可分两次转移）加入 microRNA 吸附柱 MA 中，12,000 rpm（13,400 \times g）离心 30 s，弃掉废液。
6. 按照前面标准操作步骤 7-11 操作，得到富集的 microRNA。

◇ microRNA 提取方法



07/相关产品

- AC0901 SPARKeasy 全血总 RNA 快速提取试剂盒
- AC0902 SPARKeasy 冻存全血总RNA提取试剂盒
- AC0903 SPARKeasy 超纯全血总RNA快速提取试剂盒
- AG0501 SPARKScript miRNA 1st strand cDNA synthesis kit(Tailing Reaction)
- AG0502 SPARKScript II miRNA 1st strand cDNA synthesis kit(By stem-loop)
- AH0104 2×SYBR Green qPCR Mix (With ROX)

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

