

产品使用说明书

血清/血浆 miRNA 分离试剂盒

Serum/Plasma miRNA Isolation Kit

Cat# SPmiR50A-1
SPmiR30A-1

辽宁润基生物科技有限公司

Liaoning Rengen Biosciences Co.,Ltd

Version 1.0

01/6/2018

目 录

保存和应用	2
产品介绍	3
试剂盒组成和说明	3
注意事项.....	4
操作方法	5
相关产品信息	7
常见问题.....	7
技术支持	8

保存与应用

【保存条件】

本试剂盒低温下运输，室温或 2-8℃下保存至少一年（按照试剂盒不同成分分别保存），使用前请仔细阅读说明书。

【应用范围】

本产品只用于科学研究，不能用于临床诊断。

产品介绍

近年来，液体活检作为一种新的非侵入式主要检测血液中循环肿瘤细胞（Circulating Tumor Cell, CTC）和循环肿瘤 DNA(Circulating Tumor DNA, ctDNA)，获取患者肿瘤病变信息，用以帮助诊断治疗。血清或血浆中游离核酸（Free-circulating nucleic acids）通常是小片段（DNA<1000 bp 或 RNA<1000 nt），另外，游离 miRNAs 可潜在作为疾病（如肿瘤）标志物，用于临床诊断及用药指导和病情评估。血清或血浆中游离核酸浓度通常较低，并且不同个体，不同状态下含量不同。

血清/血浆 miRNA 分离试剂盒是在“血清/血浆 RNA 分离试剂盒（Cat# SPRNA50A-1/SPRNA30A-1）”基础上专门针对血清/血浆 miRNA 提取而开发的产品，提取的 miRNA 中含有 siRNA (small interfering RNA), snRNA (small nuclear RNA) 等 small RNA。

本试剂盒采用优化的酚/胍盐裂解液提取血清/血浆中总 RNA，通过特异性结合核酸的离心吸附柱和独特的缓冲液系统的配合，能够方便、快捷地纯化、洗脱小 RNA (<200 nt)，得到的 RNA 纯度更好，质量更高。提取的 RNA 没有 DNA 和蛋白污染，可用于 Northern Blot, realtime RT-PCR, Microarray 基因表达谱, NGS 测序等。

试剂盒组成和说明

产品组成 Cat# SPmiR50A-1	含量	保存条件
裂解液 A (Lysis Buffer A)	15ml	2-8°C
裂解液 B (Lysis Buffer B)	6ml	RT
洗涤液 A (Wash Solution A)*	15ml×2	RT
洗脱液 A (Elution Solution A)	5ml	RT
吸附柱 I (含 2.0ml 收集管) Spin Columns I in 2.0ml Collection Tubes	50 套	RT
吸附柱 II (含 2.0ml 收集管) Spin Columns II in 2.0ml Collection Tubes	50 套	RT
1.5ml 离心管 (Centrifuge Tubes 1.5ml)	50 个	RT

产品组成 Cat# SPmiR30A-1	含量	保存条件
裂解液 A (Lysis Buffer A)	10ml	2-8℃
裂解液 B (Lysis Buffer B)	5ml	RT
洗涤液 A (Wash Solution A)*	15ml	RT
洗脱液 A (Elution Solution A)	5ml	RT
吸附柱 I(含 2.0ml 收集管) Spin Columns I in 2.0ml Collection Tubes	30 套	RT
吸附柱 II(含 2.0ml 收集管) Spin Columns II in 2.0ml Collection Tubes	30 套	RT
1.5ml 离心管 (Centrifuge Tubes 1.5ml)	30 个	RT

*使用前先在每瓶洗涤液 A (Wash Solution A)中加入 35ml 无水乙醇，混匀，并在瓶标签上标记“√”，每次使用后立即盖紧瓶盖。

【注意事项】

1. 除了裂解液 A (Lysis Buffer A)保存在 2-8℃外，其余试剂盒和耗材保存在室温下(15-25℃)，自购买之日起有效期至少 1 年。裂解液 D 在使用前检查是否有盐沉淀，建议在使用前 37℃水浴 10 分钟，混合均匀，无沉淀，溶液清澈。

2. 样品使用量的确定：

微量样品 RNA 提取试剂盒技术指标	
吸附柱最大容量	700μl
最小洗脱体积	20μl
样本体积	最大量 200μl

3. 所有的样品使用前请平衡到室温(15-25℃)。

4. 第一次使用试剂盒时，请按照试剂瓶上的提示在洗涤液 A 中添加无水乙醇。

5. 需自备试剂：无水乙醇（96-100%）。

6. 预防 RNase 污染，应注意以下几方面：

- 经常更换新手套，防止皮肤表面的 RNase 污染。
- 使用无 RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染。
- RNA 释放后在裂解液中不会被 RNase 降解，但提取后继续处理过程中应使用不含 RNase 的塑料盒或玻璃器皿，玻璃器皿可在 150℃烘烤 4h，塑料器皿可在 0.5M NaOH 中浸泡 10min，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除 RNase。
- 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)，放置过夜，高压灭菌）。

操作方法

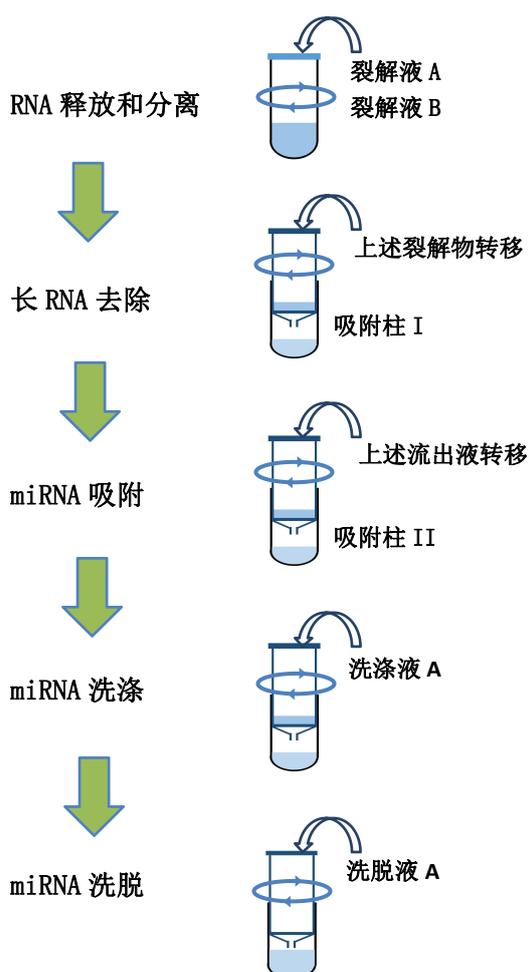


图 1 简单操作流程图

注意：使用前先在每瓶洗涤液 A (Wash Solution A) 中加入 35ml 无水乙醇，混匀，并在瓶标签上标记“√”，每次使用后立即盖紧瓶盖。

1. RNA 释放和分离

取血清或血浆样品， $12,000\times g$ 离心 20min，去除细胞碎片。

- 取 200 μ l 上清加到 2.0ml 离心管中。加入等体积（200 μ l）的裂解液 A，涡旋振荡 30sec，室温放置 5min，使得核酸蛋白复合物完全分离。
- 室温 $14,000\times g$ 离心 10min，取上清，转入一个新的无 RNase 的离心管中。
- 加入 100 μ l 裂解液 B，盖好管盖，剧烈振荡 15sec，室温放置 5min。室温

14,000×g 离心 15min，样品会分成三层：黄色的有机相，中间层和无色的水相，RNA 主要在水相中（上层），把水相转移到新管中，进行下一步操作。

- 量取转移液的体积，缓慢加入转移液体积 1/3 体积的无水乙醇（如 300μl 的转移液加 100μl 无水乙醇），混匀（此时可能会出现沉淀）。

2. 长 RNA 的去除

将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱 I 中（吸附柱已放入收集管中），室温放置 2min，室温 14,000×g 离心 30sec，离心后弃掉吸附柱，保留流出液。

3. miRNA 吸附

量取流出液的体积，缓慢加入流出液体积 2/3 体积的无水乙醇（如 300μl 的转移液加 200μl 无水乙醇），混匀（此时可能会出现沉淀）。将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱 II 中（吸附柱已放入收集管中），室温放置 2min，室温 14,000×g 离心 30sec，离心后弃掉流出液，保留吸附柱。

4. miRNA 洗涤

向吸附柱加入 500μl 洗涤液 A，14,000×g 离心 30sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放入收集管中。重复洗涤 1 次，14,000×g 离心 2min，倒掉废液，将吸附柱置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意：这一步的目的是将吸附柱中的残余的洗涤液去除，洗涤液中的乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR 等）实验。

5. miRNA 洗脱

将吸附柱转入 1.5 ml 离心管中（试剂盒提供），向吸附柱中间位置悬空滴加 50-200μl 洗脱液 A，室温放置 2-5min，14,000×g 离心 2min，将溶液收集到离心管中。

注意：洗脱液体积不应小于 50μl，体积过小影响回收效率，为增加 RNA 的得率，可将离心得到的溶液再加入吸附柱中，室温放置 2min，14,000×g 离心 2min。洗脱液的 pH 对于洗脱效率有很大影响，若用水做洗脱液应保证 pH 值在 7.0-8.5 范围内，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率，且 RNA 产物最好立即使用，或保存在-80℃，以防止 RNA 降解。

相关产品信息

相关产品	目录号
血清/血浆 DNA 分离试剂盒	SPDNA50A-1/SPDNA30A-1
血清/血浆 RNA 分离试剂盒	SPRNA50A-1/SPRNA30A-1

常见问题

Q1: 提取血清或血浆 RNA 时，需要在什么温度下离心？

A1: 所有离心步骤须在室温下操作，在 4℃ 时离心会降低 DNA 的产量。

Q2: 提取的 RNA 下游应用时，如 RT-PCR 不是很好？

A2: 洗脱的 RNA 中含有乙醇和/或有较多盐离子污染，会抑制 PCR 反应。所以，在最后洗涤时，将吸附柱置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的洗涤液。

技术支持

关于查看详细产品信息和下载相关资料请登陆：<http://www.rengenbio.com>

同时可通过电话或 Email 接触技术支持。

公司：辽宁润基生物科技有限公司

地址：辽宁省沈阳市经济技术开发区十三号路 77 号联东 U 谷 20 号楼

邮编：110027

电话：024-31086590

传真：024-31086589

邮箱：公司信息 info@rengenbio.com

技术支持 support@rengenbio.com

产品订购 order@rengenbio.com

