



核酸提取或纯化试剂 说明书

【产品名称】

核酸提取或纯化试剂

【包装规格】

50次/盒

【预期用途】

用于核酸提取、富集、纯化步骤。其处理后的产物用于临床体外检测使用。

【检验原理】

本试剂盒用于从各种组织、细胞、血清、血浆等样本中分离纯化miRNA，还可以提取siRNA，snRNA等其他小于200 nt的小分子RNA，同时也可用于总RNA的提取。该试剂盒将酚/胍裂解技术和硅基质膜纯化技术相结合，独特的裂解液在有效抑制RNases的同时，可以通过有机抽提的方法除去细胞或组织样品中的大部分DNA和蛋白。对于一些敏感的下流实验中，如需富集miRNA可适用该试剂盒单独对miRNA进行富集。该试剂盒适用样本范围广，制备的RNA纯度高，可直接用于敏感的下流应用，如Northern Blot分析，Real-Time PCR，Microarray Analysis等。

【主要组成成分】

试剂名称	50次/盒	
	规格	数量
裂解缓冲液	60 mL/瓶	1瓶
漂洗缓冲液1	15 mL/瓶	1瓶
漂洗缓冲液2	11 mL/瓶	1瓶
无RNA酶的水	10 mL/瓶	1瓶
吸附柱RM	50个/包	1包
吸附柱RS	50个/包	1包
收集管	50个/包	1包

【保存条件及有效期】

保存条件：裂解缓冲液2-8℃避光保存，其它组分0-35℃保存。

有效期：12个月。

运输条件：2-37℃，运输时间建议不超过7天。

【样本要求】

1. 适用样本类型：组织、细胞、血浆或血清。
2. 样本处理与保存：常温处理保存。
3. 样本运输：常温运输。

【检验方法】

自备试剂：

氯仿（新开封或提取RNA专用）、70%乙醇（无RNA酶水配制）、无水乙醇。

【实验前准备及重要注意事项】

1. 预防RNase污染，应注意以下几方面：
 - 1) 使用无RNase的塑料制品和枪头，避免交叉污染。
 - 2) 玻璃器皿应在使用前于180℃高温下干烤4小时，塑料器皿可在0.5M NaOH中浸泡10分钟，用水彻底冲洗后高压灭菌。
 - 3) 配制溶液应使用无RNase的水。
 - 4) 操作人员戴一次性口罩和手套，实验过程中要勤换手套。
2. 本品中含有苯酚，具有毒性和腐蚀性。如果吸入体内、接触皮肤、吞食等会导致中毒、灼伤以及其他身体伤害。使用本制品时应穿戴防护物品，如防护服装、手套、眼罩、面罩等。如不小心接触到眼睛，应立即用大量的水冲洗并前往医院治疗。
3. 提取的样品避免反复冻融，否则影响miRNA提取的量和质量。
4. 第一次使用前应按照试剂瓶标签说明在漂洗缓冲液1和漂洗缓冲液2中加入无水乙醇。
5. 所有离心步骤若无特殊说明均在室温下进行，且所有操作步骤动作要迅速。

【操作步骤】

Protocol A: miRNA富集（可直接用于敏感的下游实验）

1. 样品处理

1a. 组织：将组织在液氮中磨碎。每30-50 mg组织加1 mL裂解缓冲液，震荡混匀。样品体积不超过裂解缓冲液体积的十分之一。

1b. 单层培养细胞：吸去培养液，加入裂解缓冲液，每10 cm²加入1 mL裂解缓冲液（裂解液用量视培养瓶面积而定）。

1c. 细胞悬液：离心得到细胞沉淀，弃上清。每5×10⁶-1×10⁷细胞加入1 mL裂解缓冲液（细胞不需洗涤）。

- 1d. 血浆或血清：取200 μL 血浆或血清样本，加入5倍体积裂解缓冲液，震荡混匀30秒。
2. 样品中加入裂解缓冲液后反复吹打几次，使其充分裂解。室温放置5分钟，使蛋白核酸复合物完全分离。
 3. 可选步骤：4 $^{\circ}\text{C}$ 12,000 rpm (~13,400 $\times g$) 离心5分钟，取上清，转入一个新的离心管（自备）中（如样品中含较多蛋白、脂肪、多糖等，可选做此步骤）。
 4. 向上清中加入氯仿，每使用1 mL裂解缓冲液加入200 μL 氯仿，盖好管盖，剧烈振荡15秒，室温放置5分钟。
 5. 4 $^{\circ}\text{C}$ 12,000 rpm离心15分钟，样品分为三层：红色有机相，中间层，无色水相，将上层无色水相移到一个新的离心管（自备）中。
 6. 向步骤5得到的溶液中加入1/3倍体积的无水乙醇，混匀，将得到的溶液和沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱RM中。若一次不能将全部溶液加入吸附柱RM，请分多次转入。12,000 rpm离心30秒，离心后弃掉吸附柱RM，保留流出液。
 7. 向步骤6得到的溶液中加入2/3倍体积的无水乙醇，混匀。
 8. 将上步所得溶液和沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱RS。若一次不能将全部溶液加入吸附柱RS，请分多次转入。12,000 rpm离心30秒，倒掉收集管中废液，将吸附柱RS重新放回收集管中。
 9. 向吸附柱RS中加入700 μL 漂洗缓冲液1（使用前检查是否加入无水乙醇），12,000 rpm离心30秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱RS重新放回收集管中。
 10. 向吸附柱RS中加入500 μL 漂洗缓冲液2（使用前检查是否加入无水乙醇），12,000 rpm离心30秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱RS重新放回收集管中。
 11. 重复步骤10。
 12. 12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液。将吸附柱RS置于室温数分钟，以彻底晾干。
注意：此步骤的目的是将吸附柱RS中残留的乙醇去除，乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR等）。
- 将吸附柱RS置于一个新的无RNase离心管中，向吸附柱RS中间部位加入30-50 μL 无RNA酶的水。
13. 室温放置1分钟，12,000 rpm离心1分钟，收集RNA溶液，得到的RNA溶液保存在-70 $^{\circ}\text{C}$ ，防止降解。
注意：1) 无RNA酶的水体积不应小于30 μL ，体积过小影响回收率。
2) 如果要提高RNA的产量，可用30-50 μL 新的无RNA酶的水重复步骤13。
3) 如果要提高RNA浓度，可将得到的溶液重新加入到吸附柱RS中，重复步骤13。

Protocol B: 总RNA的提取（提取的总RNA包括miRNA等其他<200 nt的小分子RNA）

1-5 步骤同 protocol A。

6. 向步骤5得到的溶液中加入1.25倍体积的无水乙醇，混匀。
7. 将上步所得到的溶液和沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱RM中。若一次不能将全部溶液加入吸附柱RM中，请分多次转入。12,000 rpm离心30秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱RM重新放回收集管中。
8. 向吸附柱RM中加入700 μL 漂洗缓冲液1（使用前检查是否加入无水乙醇），12,000 rpm离心30秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱RM重新放回收集管中。

9. 向吸附柱RM中加入500 μL 漂洗缓冲液2（使用前检查是否加入无水乙醇），12,000 rpm离心30秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱RM重新放回收集管中。
10. 重复步骤9。
11. 12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液。将吸附柱RM置于室温数分钟，以彻底晾干。
注意：此步骤的目的是将吸附柱RM中残留的乙醇去除，乙醇的残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR等）。
12. 将吸附柱RM转入新的无RNase离心管中，向吸附柱RM中间部位加入30-50 μL 无RNA酶的水，室温放置1分钟，室温12,000 rpm离心1分钟，收集RNA溶液，得到的RNA溶液保存在 -70°C ，防止降解。
注意：1) 无RNA酶的水体积不应小于30 μL ，体积过小影响回收率。
2) 如果要提高RNA的产量，可用30-50 μL 新的无RNA酶的水重复步骤12。
3) 如果要提高RNA浓度，可将得到的溶液重新加入到吸附柱RM中，重复步骤12。