

Trelief[®] Blood Total RNA (miRNA) Extraction Kit

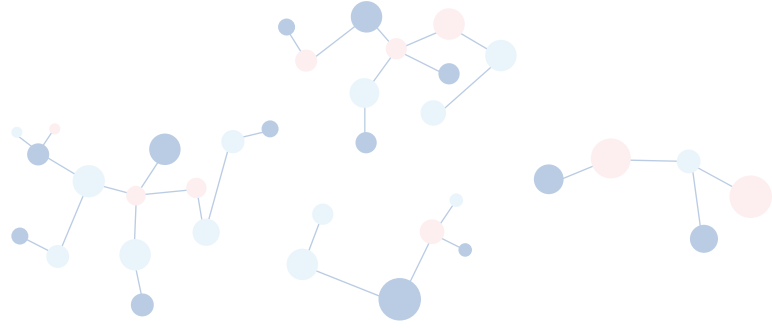
血液总RNA (miRNA) 提取试剂盒



TSR4201-50

使用说明书

1.1.2.20230513



目录

Contents

产品简介	01
产品组成	01
产品特点	01
注意事项及准备	01
操作步骤	02
常见问题及解决方案	03
保存条件	03
技术支持	03

■ 产品简介

本产品适用于从≤250 μL新鲜或冻藏的抗凝血液、血清、血浆等样品中提取高纯度总RNA(包括miRNA)。本产品结合了一步法RNA抽提试剂与硅胶膜纯化技术,简化了总RNA抽提步骤,显著提高RNA的纯度,40 min内就可完成数个样品的提取工作。本产品使用低毒试剂替代高毒性的氯仿,使用过程安全性更高。纯化的RNA可直接用于RT-PCR、Northern Blot、二代测序、miRNA文库构建等实验。

■ 产品组成

组分	TSR4201-50 (50次)	保存条件及稳定性
Buffer BLS	50 mL	2~8℃避光保存18个月
Buffer BRW1	20 mL	15~25℃保存18个月
Buffer BRW2	20 mL	15~25℃保存18个月
Buffer BCP	7 mL	2~8℃保存18个月
RNase-Free ddH ₂ O	10 mL	15~25℃保存18个月
RNA Spin Columns (吸附柱)	50个	15~25℃保存18个月
Collection Tubes (2 mL收集管)	50个	15~25℃保存18个月

■ 产品特点

- 快速:40 min内完成数个样品的提取。
- 简便:血液、血浆等样品直接裂解,无需分离白细胞。
- 高纯度:提取所得总RNA纯度高,可直接用于RT-PCR等下游应用。

■ 注意事项及准备

- 1.自备材料:无水乙醇、无RNase的1.5 mL离心管和枪头、小型台式离心机、移液枪。
- 2.第一次使用前,按下表在Buffer BRW1和Buffer BRW2中加入指定体积的无水乙醇,混匀后方可使用,并做好标记。

组分	Buffer BRW1	Buffer BRW2
无水乙醇的加入量	40 mL	80 mL

- 3.Buffer BLS含有苯酚等物质,操作过程中应穿戴相应防护用品,避免沾染皮肤、眼睛及衣物,防止口鼻吸入。如不慎沾染皮肤或眼睛,及时用大量清水或生理盐水冲洗,必要时寻求医生帮助。
- 4.RNA提取的关键在于防止RNase污染。RNase在环境中普遍存在且极为稳定,痕量RNase即可迅速降解RNA。因此,需要从如下几方面做好防护措施:

- (1) 戴一次性干净手套;在单独洁净的区域操作;戴口罩并在操作过程中避免讲话。通过以上办法可有效防止实验者汗液、唾液中的RNase污染。
- (2) 使用RNase-Free的实验器具,包括枪头和离心管。RNA实验所用器具应专门使用,不可用于其它实验。
- (3) 因RNase-Free ddH₂O中不含任何抑菌因子,室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。我们推荐分装RNase-Free ddH₂O并保存于-20℃,以减少污染。若RNase-Free ddH₂O污染微生物,请重新配制。
- (4) RNA实验所用试剂都应专用,避免混用后造成交叉污染。

■ 操作步骤(实验前请先阅读注意事项)

- 1.在1.5 mL离心管中,加入750 μL Buffer BLS。
- 2.按下表加入适量样品至Buffer BLS中,用移液枪吸打混匀3~5次,然后涡旋混匀15 s以上,将沉淀完全打散,室温放置5~10 min。

样品类型	样品加入量	RNase-Free ddH ₂ O
人类血液样品	250 μL	—
淋巴细胞重悬液 (<5×10 ⁶ 个)	250 μL	—
血液黄层	250 μL	—
哺乳动物血液	250 μL	—
禽类血液	50 μL	200 μL
其它低等动物血液	100 μL	150 μL
其它液体样品	250 μL	—
唾液/分泌液	250 μL	—
血清、血浆	250 μL	—

注:若血液体积超过250 μL,则需相应地增加Buffer BLS。Buffer BLS与样品体积比例为3:1。由于血液中含有大量的蛋白质,当血液加至裂解液后,混合会产生大量的沉淀,需充分涡旋打散沉淀,才能防止核酸被包裹在沉淀中而损失产量,还可以用移液枪反复吸打5~10次进一步打散沉淀。该混合液可在2~8℃放置1周,-20℃至-80℃保存6个月。

- 3.加入100 μL Buffer BCP至裂解液中,用手剧烈振荡15 s。

注:若样品含有大量的基因组DNA(如禽类和鱼类等血液),首先加入5 μL冰醋酸至裂解液,然后再加入Buffer BCP。

- 4.冰上放置10 min。4℃, 12,000×g离心15 min。

注:离心后会形成三相体系。上层为水相层含有RNA, DNA和蛋白位于中间层和有机层(下层)。

- 5.小心转移上清至新的离心管中,加入1.5倍体积的无水乙醇,涡旋混匀15 s。
- 6.将吸附柱装在2 mL收集管中。转移一半体积的混合液至吸附柱中, 12,000×g离心1 min。
- 7.弃滤液,将吸附柱装回收集管中。转移剩余混合液至吸附柱中, 12,000×g离心1 min。
- 8.弃滤液,将吸附柱装回收集管中。加入350 μL Buffer BRW1(请先检查是否加入乙醇)至柱子中, 12,000×g离心1 min。

注:处理淋巴细胞悬液或血液时,可以省略这一步。处理血浆、血清样品,建议进行这一步操作。

- 9.(可选:彻底去除DNA) 若后续实验对RNA纯度要求比较严格,可选择使用DNase I(需另外订购)对膜上残留DNA进行消化。
- 10.弃滤液,将吸附柱装回收集管中。加入500 μ L Buffer BRW2(请先检查是否加入乙醇)至吸附柱中。12,000 $\times$ g离心1 min。
- 11.重复步骤10一次。
- 12.弃滤液,将吸附柱装回收集管中。13,000 $\times$ g空柱离心3 min。倒掉废液,将吸附柱开盖置于室温数分钟,以充分晾干硅胶膜上残留的乙醇。
- 13.将吸附柱转移至1.5 mL离心管中。加入15~30 μ L RNase-Free ddH₂O至吸附柱的膜中央,室温静置2 min,13,000 $\times$ g离心1 min。丢弃柱子,将洗脱得到的RNA保存于-80 $^{\circ}$ C。

■ 常见问题及解决方案

常见问题	可能原因	解决方法
RNA产量低 或降解	裂解问题	样品在解冻前,需要在Buffer BLS中快速打散。样品只有充分裂解后,内源的核酸酶才能被灭活,RNA才不会降解。
	电泳原因	常见的RNA降解现象都是电泳过程中引起的。更换新的Loading Buffer和电泳缓冲液。
	RNase-Free ddH ₂ O 被污染	RNase-Free ddH ₂ O不含抑菌剂,室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。更换新的RNase-Free ddH ₂ O或DEPC处理水。
	样品贮藏问题	反复解冻会引起RNA降解,确保样品解冻次数不要超过2次。
	洗脱不充分	RNase-Free ddH ₂ O需直接加到膜上,并静置几分钟后再离心,可进行二次洗脱以提高产量。
	样品用量太多	减少样品用量,超量的样品有时会引起产量下降。
DNA污染	上清液转移得太多	建议只转移上清400~450 μ L,中间层富含DNA。
	样品中含有丰富的基因组DNA	样品在Buffer BLS裂解匀浆后,按1 mL裂解产物加入5 μ L冰醋酸,然后再加入Buffer BCP抽提。
	加入Buffer BCP时未剧烈振荡	在裂解液中加入Buffer BCP后需用手剧烈振荡15 s,勿采用涡旋代替。
纯度低(OD260/ OD280<1.65)	裂解不充分	样品中加入Buffer BLS后,需按步骤彻底打散样品,室温放置5~10 min。
	加入Buffer BCP时未剧烈振荡	在裂解液中加入Buffer BCP后需用手剧烈振荡15 s,勿采用涡旋代替。

■ 保存条件

保质期18个月,试剂盒各组分保存条件见产品组成。

■ 技术支持

本公司产品使用过程中如有任何疑问与建议,欢迎随时与我们联系:product@tsingke.com.cn。

