

操作手册

血清/血浆游离 RNA 提取试剂盒（磁珠法）

Catalog No. TB159-50 (1mlx50 次反应)

Highlights

- 可从最大 3ml 以内的血清/血浆或其它液体样品中提取到高纯度的游离 RNA。
- 获得的 RNA 产量高、纯度好，可以直接用于高通量测序等分子生物学实验。

产品组成:

试剂盒组成	保存	50 次
蛋白酶 K	-20°C (混匀之后)	3x20 mg
蛋白酶 K 保存液	室温	3x 1.2 ml
游离 RNA 消化液	室温	50 ml
游离 RNA 结合液	室温	100 ml
游离 RNA 磁珠洗涤液 1	室温	50 ml
游离 RNA 磁珠洗涤液 2	室温	120 ml
DNase/RNase-free 水	室温	4 ml
磁珠	室温	3 ml

Note –售出后一年内产品质量是可以保证。试剂已经过大量的常规检测来保证其可操作性。此产品仅供研究并且需要由专业人员来使用。试剂盒中的部分试剂是有刺激性的。请带好手套和防护眼镜。

特性:

- **样品种类:** 最多 1ml 的血清, 血浆, 羊水, 脑脊液 (CSF), 尿液等液体样本。
- **纯度:** 获得的游离 RNA 可以直接用于 qPCR, 高通量测序等各种分子生物学实验。
- **片段大小:** RNA \geq 17nt。
- **产量:** 本试剂盒针对无细胞的游离核酸提取经过优化, 总量根据不同的样品个体差异可能会比较大。一般从 1ml 的血清或血浆中提取到游离 RNA 的量在 1-100 ng。
- **需要的仪器设备:** 水浴锅或者金属浴。微型离心机, 负压多联器或立式离心机。
- **操作时间:** 一般 30-45 分钟可以处理 10 个样品。样品消化步骤需要 2 个小时。

试剂制备:

1. 使用前需要添加1040 μ l蛋白酶K保存液到蛋白酶K (20mg)里。蛋白酶K的终浓度约为20mg/ml。
混匀之后放在-20 $^{\circ}$ C保存

操作步骤:

所有的离心步骤均在 $\geq 12,000 \times g$ 的离心力下离心 30 秒除非特殊说明.

一般常温 (20-30 $^{\circ}$ C) 进行以下操作步骤。

1. 在 $\geq 12,000 \times g$ 的离心力下离心样品15分钟来去除细胞杂质和沉淀。
2. 按照每200 μ l样品 (血浆, 血清或其他生物液体样品) 添加 200 μ l游离RNA消化液, 放入一个15ml的离心管, 混匀。如果样品体积 ≥ 1.5 ml, 则需要使用50ml的离心管。
3. 按照每200 μ l样品添加10 μ l的蛋白酶K溶液, 涡旋混匀10秒, 37 $^{\circ}$ C下孵育2小时。
4. 添加1体积的游离RNA结合液到消化的样品中并且涡旋混匀10秒。(例如400 μ l结合液到410 μ l的消化样品中。)
5. 添加1.5倍体积的100%的异丙醇到步骤4中的混合物中, 涡旋混匀10秒。
(例如1.2ml的异丙醇到810 μ l的混合物中。)

快速操作表格

样品体积	200 μ l	500 μ l	1 ml	3 ml (最大)
游离 RNA 消化液	200 μ l	500 μ l	1 ml	3 ml
蛋白酶 K	10 μ l	25 μ l	50 μ l	150 μ l
涡旋混匀并且在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 小时				
游离 RNA 结合液	400 μ l	1 ml	2 ml	6 ml
100%异丙醇	1.2ml	3 ml	6 ml	18 ml
磁珠	20 μ l	20 μ l	40 μ l	60 μ l
上下颠倒混匀室温下放置 20 分钟, 每 5 分钟上下颠倒混匀				
总体积	2 ml	5 ml	10 ml	30 ml

*试剂盒是按照 200 μ l 样品体积设计的, 如试剂盒组件不够需要额外订购。

6. 将含有上述混合物的离心管转移到一个磁力架上, 静置 2-5 分钟, 直到磁珠完全沉淀下来, 吸弃上清液。将离心管从磁力架上移走。

7. 添加 910 μ l 的游离 RNA 磁珠洗涤液 1 到离心管中，短暂涡旋，混匀 1 分钟，使磁珠充分悬浮在游离 RNA 洗涤液 1 中。将悬液全部转移到一个干净的 1.5ml 离心管内。
8. 将 1.5ml 离心管转移到一个磁力架上，静置 2-5 分钟，直到磁珠沉淀下来，吸弃上清液。将 1.5ml 离心管从磁力架上移走。
9. 添加 500 μ l 的游离 RNA 磁珠洗涤液 2 到 1.5ml 离心管中，混匀，将 1.5ml 离心管转移到一个磁力架上，直到磁珠沉淀下来，吸弃上清液。将 1.5ml 离心管从磁力架上移走。
10. 添加 500 μ l 的游离 RNA 磁珠洗涤液 2 到 1.5ml 离心管中，混匀，将 1.5ml 离心管转移到一个磁力架上，直到磁珠沉淀下来，吸弃上清液。将 1.5ml 离心管从磁力架上移走。
11. 添加 500 μ l 95%-100%的乙醇到 1.5ml 离心管中，混匀，将 1.5ml 离心管转移到一个磁力架上，直到磁珠沉淀下来，吸弃上清液。将 1.5ml 离心管从磁力架上移走。
12. 添加 500 μ l 的 95%-100%的乙醇到 1.5ml 离心管中，混匀，将 1.5ml 离心管转移到一个磁力架上，直到磁珠沉淀下来，吸弃上清液。将 1.5ml 离心管从磁力架上移走。
13. 添加 500 μ l 的 95%-100%的乙醇到 1.5ml 离心管中，混匀，将 1.5ml 离心管转移到一个磁力架上，直到磁珠沉淀下来，吸弃上清液。将 1.5ml 离心管从磁力架上移走。
14. 将 1.5ml 离心管在室温下放置 10 分钟自然晾干磁珠。（如乙醇残留会对纯度有较大影响，如过度干燥则会影响洗脱效率）
15. 添加 30-100 μ l 的 DNase/RNase-free 水到 1.5ml 离心管中重悬磁珠，混匀磁珠 1-2 分钟，将 1.5ml 离心管转移到一个磁力架上，放置 2-3 分钟直到磁珠完全沉淀下来。
16. 将上清（游离 RNA）转到一个干净的 1.5ml 离心管内。

注意：一般从血清血浆中提取的 RNA 不推荐使用 Nanodrop 进行检测。可以使用 qPCR, Tapestation 或者 Qubit 等进行 RNA 的定量。

附录1：处理保存在DNA/RNA Shield™保护剂中的样品

对于保存在DNA/RNA Shield™保护剂(货号TR120)中的无细胞生物样品。采用下述改进的步骤进行操作。

1. 每1ml的DNA/RNA Shield溶液的样品添加25 μ l的蛋白酶K溶液，涡旋混匀10秒，37℃下孵育2小时。
（例如：500 μ l的无细胞体液，500 μ l的DNA/RNA Shield保护剂，25 μ l蛋白酶K）
2. 添加1体积的游离RNA消化液到上述消化的样品中并且涡旋混匀10秒。

(例如1ml游离RNA结合液到1ml的消化样品中)

3. 添加1体积的游离RNA结合液到步骤2的混合物中并且涡旋混匀10秒。

(例如2ml游离RNA结合液到2ml的混合物中)

4. 添加1.5倍体积的100%的异丙醇到步骤3中的混合物中，涡旋混匀10秒。

(例如6ml的100%异丙醇到4ml的混合物中)

快速操作表格

样品体积(含保护剂)	200 μ l	500 μ l	1 ml	3 ml (最大)
蛋白酶 K	5 μ l	12.5 μ l	25 μ l	75 μ l
涡旋混匀并且在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 小时				
游离 RNA 消化液	200 μ l	500 μ l	1 ml	3 ml
游离 RNA 结合液	400 μ l	1 ml	2 ml	6 ml
100%异丙醇	1.2ml	3 ml	6 ml	18 ml
磁珠	20 μ l	20 μ l	40 μ l	60 μ l
上下颠倒混匀室温下放置 20 分钟，每 5 分钟上下颠倒混匀				
总体积	2 ml	5 ml	10 ml	30 ml

6. 接下来按照主操作步骤的第 6 步进行游离 RNA 提取。

附录 2: 游离核酸血液保存管

本试剂盒兼容我公司游离核酸血液保存管（货号 TS002）或其他公司同类产品如 streck。

1. 在 $\geq 12,000 \times g$ 的离心力下离心样品15分钟来去除细胞杂质和沉淀。
2. 按照每200 μ l样品（血浆，血清或其他生物液体样品）添加 200 μ l游离RNA消化液，放入一个15ml的离心管，混匀。如果样品体积 ≥ 1.5 ml，则需要使用50ml的离心管。
3. 接下来按照主操作步骤的第 3 步进行游离 RNA 提取。