

# 血清/血浆游离RNA提取试剂盒（磁珠法）

使用说明书（Ver.1.2.4）

## 产品特点

- 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。

产品货号：

TB159-50（50次反应）



扫描二维码了解更多产品信息

# 目录Contents

产品组份.....	1
产品特性.....	1
操作步骤.....	2
附录1：处理保存在 EZshield®保护剂中的样品.....	3
附录2：游离核酸血液保存管 .....	3

## 产品组份

试剂盒组成	保存	50次
蛋白酶K套装	-20°C	1套
游离RNA消化液	室温	50 ml
游离RNA磁珠洗涤液1	室温	50 ml
游离RNA磁珠洗涤液2（未添加乙醇）	室温	12 ml
无DNase/RNase水	室温	4 ml
磁珠	4°C	5 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。

## 产品特性

- 样品种类：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。

## 试剂准备

- 蛋白酶K溶解后，长期保存在-20°C冰箱中。
- RNA洗涤液2 使用前，检查是否已经添加48ml无水乙醇 到12ml RNA洗涤液2中，并在瓶身上做好标记。
- 3. 自备预冷过的异丙醇

## 操作步骤:

所有的离心步骤均在 $\geq$ 12000 x g的离心力下离心30秒除非特殊说明。一般常温（20-30°C）进行以下操作步骤。

1. 在 $\geq$ 12000 x g的离心力下离心样品15分钟来去除细胞杂质和沉淀。

- 按照每200 $\mu$ l样品（血浆，血清或其他生物液体样品）添加 200 $\mu$ l游离RNA消化液，放入一个15ml的离心管，混匀。如果样品体积 $\geq$ 1.5ml，则需要使用50ml的离心管。
- 按照每200 $\mu$ l样品添加10 $\mu$ l的蛋白酶K溶液，涡旋混匀10秒，37 $^{\circ}$ C下孵育2小时。
- 添加1倍体积的异丙醇到步骤3中消化后的混合物中，涡旋混匀10秒。（例如600 $\mu$ l的异丙醇到420 $\mu$ l的混合物中。）

快速操作表格				
样品体积	200 $\mu$ l	500 $\mu$ l	1 ml	3 ml (最大)
游离RNA消化液	200 $\mu$ l	500 $\mu$ l	1 ml	3 ml
蛋白酶K	10 $\mu$ l	25 $\mu$ l	50 $\mu$ l	150 $\mu$ l
涡旋混匀并且在37 $^{\circ}$ C下孵育2小时				
异丙醇	0.4ml	1.0 ml	2 ml	6 ml
磁珠	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	40 $\mu$ l	60 $\mu$ 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				

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

- 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。
- 添加900 $\mu$ 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。将离心管从磁力架上移走。
- 添加500 $\mu$ l的游离RNA磁珠洗涤液2到离心管中，混匀，将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。将离心管从磁力架上移走。
- 重复步骤8。
- 添加500 $\mu$ l 95%-100%的乙醇到离心管中，混匀，将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。将离心管从磁力架上移走。
- 重复步骤10
- 将离心管在室温下放置5~10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）
- 添加30-100 $\mu$ 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离心管移到一个磁力架上，放置2-3分钟直到磁珠完全沉淀下来。
- 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EZshield®保护剂中的样品

对于保存在EZshield®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EZshield®溶液的样品添加25μl的蛋白酶K溶液，涡旋混匀10秒，37°C下孵育2小时。  
（例如：500μl的无细胞体液，500μl的EZshield®保护剂，25μl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消化液到1ml的上述消化样品中）
3. 添加1倍体积的异丙醇到步骤2中的混合物中，涡旋混匀10秒。（例如3ml的100%异丙醇到2ml的混合物中）
4. 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 $\geq 12000 \times g$ 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200μl样品（血浆，血清或其他生物液体样品）添加 200μl游离RNA消化液，放入一个15ml的离心管，混匀。如果样品体积 $\geq 1.5$ 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。

## 组件查询

组件名称	货号	规格	储存条件
蛋白酶K	TD3001-2-B	20mg	-20°C (混匀之后)
蛋白酶K保存液	TD3001-2-D	1.2ml	-20°C
游离RNA消化液	TR1059-3-10	10ml	室温
	TR1059-3-50	50ml	
游离RNA磁珠洗涤液1	TB1059-4-10	10ml	室温
	TB1059-4-50	50ml	
游离RNA磁珠洗涤液2 (未添加乙醇)	TB1059-5-3	3ml	室温
	TB1059-5-12	12ml	
无DNase/RNase水	TW1001-1	1ml	室温
	TW1001-4	4ml	
磁珠	TD4100-5-5	5ml	4°C