



miRcute血清/血浆miRNA提取 分离试剂盒 (DP503) 操作指南

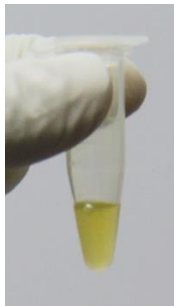
天根生化科技（北京）有限公司

版本号：20170531

WWW.TIANGEN.COM

实验准备

1. 血清/血浆样本
2. 无水乙醇，氯仿
3. 移液器及配套RNase-Free无菌枪头（200 μ l，1 ml）；1.5 ml，2.0 ml 离心管（RNase-free）
4. 涡旋振荡器，台式低温离心机，金属浴/水浴

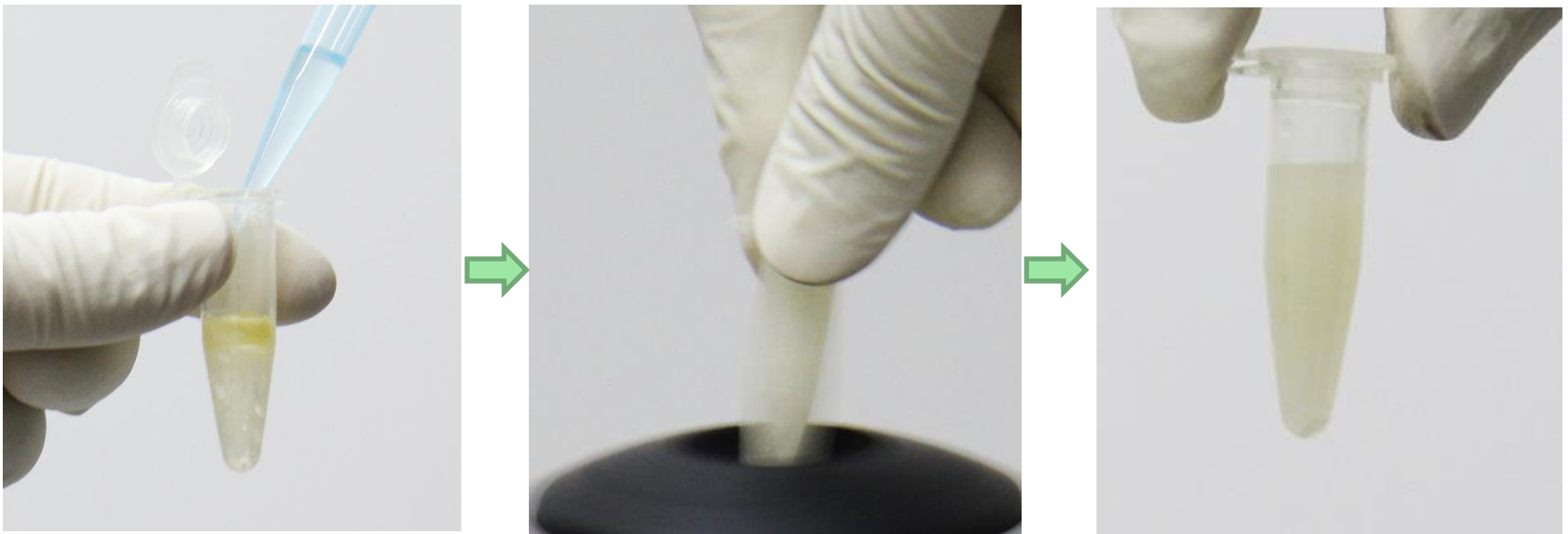


实验准备-试剂盒准备

第一次使用前应在去蛋白液RD、漂洗液RW中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。
在加入无水乙醇后在瓶身做好标记。



Step 1



样品处理：每200 μl 血清或血浆中加入900 μl 裂解液MZA，振荡器振荡混匀30 sec至完全匀浆，颠倒混匀。

如需使用检测外参 (CR100-01), 请于完全匀浆之后、颠倒混匀之前加入(1 μM 浓度，加入1 μl)。

注意：提取样本量建议不要大于200 μl ，否则会导致RNA产率以及纯度偏低。

Step 2



室温放置5 min，使得核酸蛋白复合物完全分离。

Step 3



加入200 μ l 氯仿



盖好管盖，
剧烈振荡15 sec

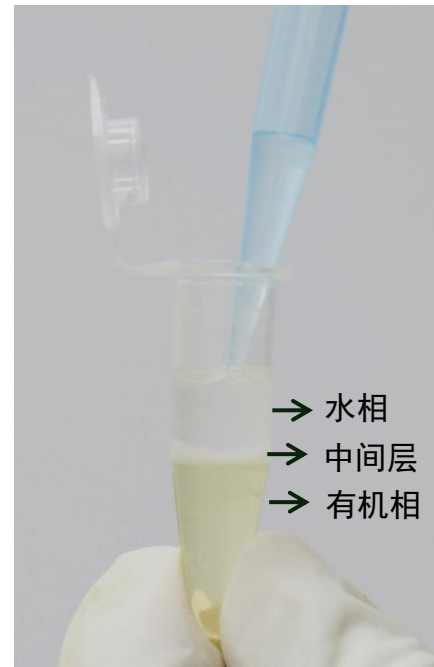


室温放置5 min

Step 4



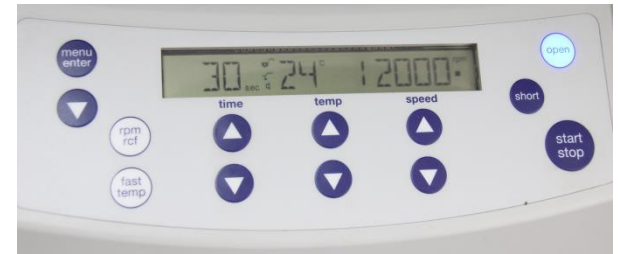
12,000 rpm (~13,400 × g),
4°C, 离心15 min



样品会分成三层：上层无色的水相，白色的中间层和下层黄色的有机相，RNA主要在水相中，把水相转移到新管中。

注意：小心吸取水相，不要吸到中间层

Step 5



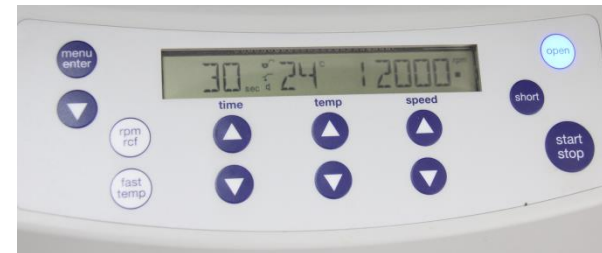
量取转移液的体积，缓慢加入转移液体积2倍的无水乙醇（如：500 μ l的转移液加1 ml无水乙醇），混匀（此时可能会出现沉淀）。

将溶液和沉淀一起转入吸附柱miRelute

室温静置2 min，室温 12,000 rpm (~13,400 \times g)离心30 sec.

离心后弃掉流出液，保留吸附柱miRelute。

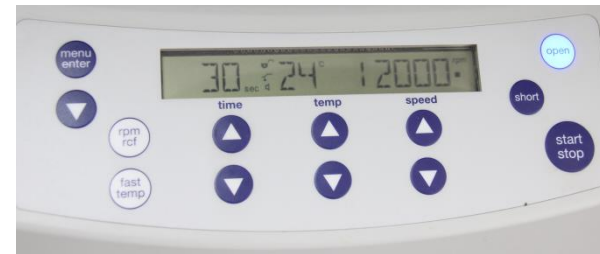
Step 6



向吸附柱miRelute中加入500 μ l去蛋白液MRD (请先检查是否已加入乙醇)

室温静置2 min, 室温 12,000 rpm (~13,400 \times g)离心30 sec, 弃废液。

Step 7 and 8



向吸附柱miRelute中加入500 μ l漂洗液RW (请先检查是否已加入乙醇)

室温静置2 min, 室温 12,000 rpm (~13,400 \times g)离心30 sec, 弃废液。

Step 8: 重复操作步骤 7一次

Step 9



将吸附柱miRelute放入2 ml收集管中，室温 12,000 rpm (~13,400×g)离心2 min，去除残余液体。

此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，离心后打开盖子将吸附柱miRelute在室温，或置于超净工作台上通风片刻，将乙醇挥发。**漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验。**

Step 10



将吸附柱miRelute转入一个新的RNase-Free 1.5 ml离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加15-30 μ l RNase-Free ddH₂O，室温放置2 min，室温 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心2 min。

洗脱缓冲液体积不应少于15 μ l，体积过小影响回收效率。且RNA应保存在-70 $^{\circ}$ C，以防降解。

如果想提高RNA得率，可重复上步操作一次。