

描述: 新海基因血清血浆 miRNA 提取试剂盒是目前提取小 RNA (<200nt) 操作步骤最简单、重复性最好、小 RNA 产率最高的方法之一。使用该试剂盒通过一步上柱即可获得高纯度 miRNA, 可在 10min 左右完成小 RNA 的提取; 且使用该试剂盒提取的小 RNA (Small RNA) 中, 长度在 15~200nt 范围的 RNA 在 95% 以上, 基本不含有大 RNA 和 DNA, 可直接用于后续的反转录、Northern 杂交、测序等应用。

组分:

名称	25 次 B1804A	100 次 B1804B
Serum/Plasma miRNA Reagent	20 ml	80ml
miRNA 吸附柱	25 套	100 套
RnaseFree H2O	5ml	5ml

储存: 室温可保存 2 年。

使用防护建议: Serum/Plasma miRNA Reagent 溶液中含有胍盐, 其具有强烈的腐蚀性, 试验时请务必佩戴防护眼镜、手套、口罩等防护措施, 如有皮肤接触请立即用大量清水冲洗, 再另行就医。

自备试剂: 异丙醇、乙醇、75%异丙醇、2ml EP 管

操作方法:

- (1) 向 1.5ml EP 管中加入 800 μ l Serum/Plasma miRNA Reagent。将 300 μ l 血清或血浆样本加入到上述 800 μ l miRNA Reagent A 中, 用腕力混匀 30s, 室温放置 5min。
- (2) 13,000rpm 离心 5min, 将上清约 1ml 吸入到新的 2ml EP 管中。加入 1ml 异丙醇, 上下颠倒混合均匀。
- (3) 将上述溶液分三次加至吸附柱中 (每次约 700 μ l), 13,000rpm 离心 15s, 倒掉过柱液。
- (4) 向吸附柱中加入 700 μ l 75%异丙醇洗涤一次, 13,000rpm 离心 15s, 倒掉过滤液。

(5) 向吸附柱中加入 500 μ l 无水乙醇洗涤一次, 13,000rpm 离心 15s, 倒掉过滤液。

(6) 吸附柱 13,000rpm 空离心 2min, 去掉残留的乙醇。

(7) 将吸附柱放入到新 1.5ml EP 管中, 室温放置 2min, 使残留乙醇挥发。在吸附柱滤芯上加入 30 μ l RnaseFree H2O, 室温静置 2min, 13,000rpm 离心 2min, 洗脱产物即为提取的 miRNA。(通常取 10 μ l 该产物, 即可使用新海基因血清血浆专用 TaqMan miRNA RT kit 进行反转录反应, 货号: D1803)。

常见问题汇总:

(1) 由于血清血浆中的 miRNA 含量极低, 提取的 miRNA 浓度通常在 5 ng/ μ l 以下, 因此难以用常规的 NanoDrop 测量浓度, 建议直接使用 10 μ l 进行下游反转录。由于本试剂盒提取的是小 RNA, 该浓度下的 miRNA Copy 数足以进行下游检测。

(2) 由于血清血浆中 miRNA 的含量低, 为了获得更可靠的实验数据, 建议使用特异性和灵敏度更好的 TaqMan 探针法进行 miRNA 的下游检测。本试剂盒提取的 miRNA 并不限于其它检测方法和用途, 包括 SYBR Green 法检测、二代测序、芯片等检测领域。

(3) 新海基因的 D1803 血清血浆 TaqMan miRNA 反转录试剂盒为血清血浆专用, 不可用于细胞和组织的 miRNA 检测实验。使用 D1803 获得的反转录产物仅可使用本公司的 HG TaqMan miRNA qPCR 试剂盒 (货号: TAPXXXXX)。在使用 D1803 反转录条件下, 应用货号为 TAP01511 检测内源 hsa-miR-16, Ct 值通常在 24 左右。

(4) 外源性内参可单独订购 cel-miR-39 标准品 (货号: B1805), 每个样品每次提取 cel-miR-39 的使用量为 50fmol。