

# SteadyPure 血液血清血浆 Small RNA 提取试剂盒

SteadyPure Blood, Serum and Plasma Small RNA Extraction Kit

Code No. AG21030

**包装量:** 50 rxns  
**保存温度:** Package 2-1 4°C  
 Package 2-2 室温(15 ~ 30°C)

## 产品概述

本产品可从有核或无核全血、血清、血浆及凝血块等血液样本中提取 Total RNA (含 Small RNA)。同时, 针对去除 Total RNA 的 Small RNA 提取纯化需求, 本说明书中提供了相应的提取纯化方法。

本产品采用改良的裂解液 (具有更强的裂解能力), 以及特殊的硅基质膜, 对 Small RNA (< 200 nt) 具有更强的吸附能力, 因此对 Small RNA 的提取效率更高。纯化获得的 RNA 收量高, 纯度好, 可以直接用于 Northern 杂交、体外翻译、RT-qPCR、文库构建等分子生物学实验。

## 安全操作

实验过程中可能会接触到强变性剂, 实验操作开始前请穿戴合适的实验服、护目镜、口罩和手套, 然后再进行实验操作。

**【注意: 实验过程中产生的废液需要收集在废液桶中专门处理。】**

如果缓冲液 Buffer BLS for small RNA 或 Buffer RWA for small RNA 不小心溅出, 请立刻用清水冲洗。

详细信息请参考相关 MSDS 信息。

## 产品组成 \*1

Buffer BLS for small RNA	50 ml
Buffer RWA for small RNA <sup>*2</sup>	14 ml
Buffer RWB <sup>*2</sup>	21 ml
RNase Free Water <sup>*3</sup>	10 ml
Small RNA Mini Columns	50 sets
Collection tubes	50 pcs
RNase Free Tubes <sup>*4</sup>	50 pcs

\*1: 组分中 Buffer BLS for small RNA 包装于 Package 2-1 中, 需放置于 4°C 保存; 其余组分均包装于 Package 2-2 中, 室温 (15 ~ 30°C) 保存。

\*2: Buffer RWA for small RNA 在首次使用前, 请添加 21 ml 的无水乙醇 ( Buffer RWA for small RNA 与无水乙醇体积比为 2 : 3 ), Buffer RWB 在首次使用前, 请添加 49 ml 的无水乙醇 ( Buffer RWB 与无水乙醇体积比为 3 : 7 ), 混合均匀后在瓶子上做好标记, 室温下保存。

\*3: RNase Free Water 开启后建议于 -20°C 保存。

\*4: RNase Free Tubes 仅用于洗脱 RNA, 前期裂解所需离心管需自备。

## 实验前准备

1. 自备: 无水乙醇、氯仿 (或 RNA 提取辅助试剂 Code No. AG21303)、1.5 ml 离心管 (RNase-free)、2.0 ml 离心管 (RNase-free)、枪头 (RNase-free)、移液器。
2. Buffer RWA for small RNA 在首次使用前, 请添加 21 ml 的无水乙醇 ( Buffer RWA for small RNA 与无水乙醇体积比为 2 : 3 ), Buffer RWB 在首次使用前, 请添加 49 ml 的无水乙醇 ( Buffer RWB 与无水乙醇体积比为 3 : 7 ), 混合均匀后在瓶子上做好标记, 室温下保存。
3. 提前预冷离心机至 4 °C。

## 保存及运输

**保存温度:** Package 2-1 4°C 保存  
 Package 2-2 室温 (15 ~ 30°C) 保存

**运输温度:** 室温 (15 ~ 30°C) 运输

► **注意事项**

1. 本产品可从血液样本中提取 Total RNA (含 Small RNA) 【具体操作见<操作流程-Total RNA (含 Small RNA) 纯化步骤>】，也可从血液样本中提取去除 Total RNA 的 Small RNA (具体操作见<操作流程-Small RNA 纯化步骤>)。
2. 操作过程中，Small RNA Mini Columns 的吸附柱放入 Collection tubes 或 1.5 ml 离心管中 (或从中取出) 的过程需竖直操作，避免吸附柱柱头触碰管壁，造成污染。
3. 操作过程中，需室温离心的步骤，请确保离心机温度保持在 20 ~ 25 °C，避免溶液中晶体析出。
4. 操作过程中，应预防 RNase 污染，需注意以下几方面：
  - ① 使用 RNA 操作专用实验台，经常更换新手套，穿戴 RNA 专用实验服，实验过程中尽量不要说话及来回走动，操作过程中避免物品从离心管上方过。
  - ② 严防操作环境、使用的容器、耗材和试剂的 RNase 污染。

► **推荐样本起始量及裂解液用量**

样本是否充分裂解是获得理想收量和纯度的关键。裂解液一定的情况下，样本量过多会导致裂解不充分、堵塞纯化柱等问题，最终导致 RNA 的收量及纯度降低。本产品中样本的起始量及裂解液 Buffer BLS for small RNA 用量可参考下表。

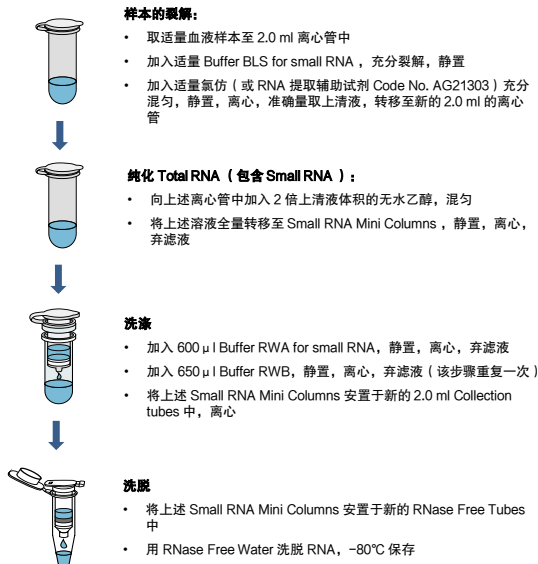
样本名称	样本起始量 <sup>*1、2</sup>	Total RNA (含 Small RNA) 纯化方法中 Buffer BLS for small RNA 用量 <sup>*1、2</sup>	Small RNA 纯化方法中 Buffer BLS for small RNA 用量 <sup>*1、2</sup>
有核或无核全血/血清/血浆	≤ 200 μl	900 μl	200 μl

\*1: 若样本起始量小于表格中最大推荐量，为确保样本裂解充分，建议不改变 Buffer BLS for small RNA 的用量，按照表格中推荐用量添加。

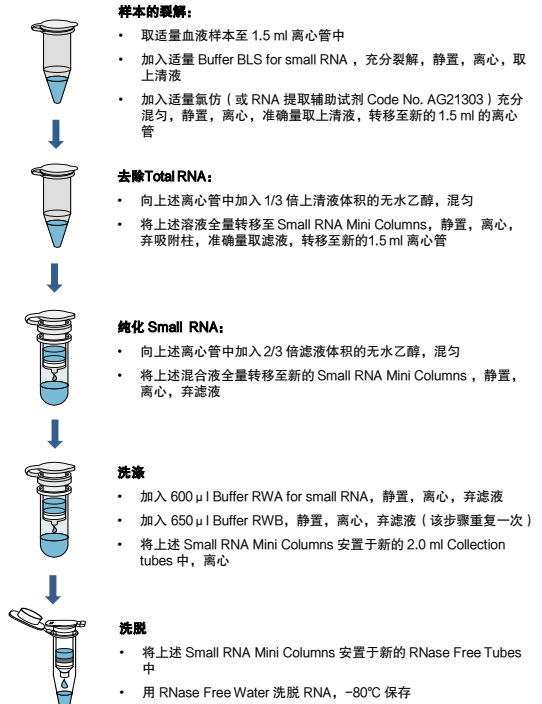
\*2: 若样本起始量大于表格中最大推荐量，建议按照比例增加 Buffer BLS for small RNA 用量【例如：有核或无核全血/血清/血浆样本起始量为 400 μl，则 Total RNA (含 Small RNA) 纯化方法中 Buffer BLS for small RNA 用量为 1800 μl，Small RNA 纯化方法中 Buffer BLS for small RNA 用量为 400 μl】。

► **操作流程简图**

**Total RNA (含 Small RNA) 纯化步骤**



**Small RNA 纯化步骤**



## ▶ 操作流程

### 【推荐】Total RNA (含 Small RNA) 纯化步骤:

以下操作步骤根据推荐的最大样本起始量进行纯化。

1. 取 200  $\mu$ l 血液样本 (有核或无核全血、血清、血浆及凝血块等) 至 2.0 ml 离心管中。
2. 向上述离心管中加入 900  $\mu$ l 裂解液 Buffer BLS for small RNA, 立即高速涡旋混匀或用移液器反复吹打直至裂解液中无明显沉淀。
3. 将上述裂解液室温静置 5 min。
4. 向上述裂解液中加入 200  $\mu$ l 氯仿 (或 RNA 提取辅助试剂 Code No. AG21303), 充分混匀。室温静置 5 min。
5. 将上述混合液于 12,000  $\times$  g 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min。小心取出离心管, 此时匀浆液分为三层, 即: 上清液 [ Total RNA (含 Small RNA) ]、中间蛋白层及下层有机相。  
**【注: 此步骤离心完后, 可将离心机恢复至室温 (20~25  $^{\circ}$ C) 。】**
6. **准确量取**上清液转移至新的 2.0 ml 离心管中 (切勿吸出中间蛋白层), 缓慢加入 2 倍上清液体积的无水乙醇 (如: 500  $\mu$ l 的上清液加入 1 ml 无水乙醇), 用移液器吹打混匀, 若出现明显粘稠物或沉淀, 用移液器吹打多次, 打散沉淀, 使其悬浮在溶液中。  
**【注: 若沉淀不散会导致 Small RNA Mini Columns 堵塞, 影响收量及纯度。】**
7. 立即将上述混合液全部转移至 Small RNA Mini Columns 中, 室温静置 2 min, 12,000 rpm 室温离心 1 min, 弃滤液。  
**【注: Small RNA Mini Columns 的最大容积为 700  $\mu$ l, 使用时如果液体的体积超出最大容积, 请分次转移: 上样 700  $\mu$ l 混合液后, 静置, 离心, 去滤液, 然后将剩余混合液再次上样, 重复此步骤。】**
8. 向上述 Small RNA Mini Columns 中加入 600  $\mu$ l Buffer RWA for small RNA, 室温静置 2 min, 12,000 rpm 室温离心 1 min, 弃滤液。  
**【注: 请确认 Buffer RWA for small RNA 中已经加入了指定体积的无水乙醇 ( Buffer RWA for small RNA 与无水乙醇体积比为 2 : 3 ) 。】**
9. 向上述 Small RNA Mini Columns 中加入 650  $\mu$ l Buffer RWB, 室温静置 2 min, 12,000 rpm 室温离心 1 min, 弃滤液。  
**【注: 请确认 Buffer RWB 中已经加入了指定体积的无水乙醇 ( Buffer RWB 与无水乙醇体积比为 3 : 7 ) 。】**
10. 重复步骤 9 一次。
11. 将上述 Small RNA Mini Columns 安置于新的 2.0 ml Collection tubes 中, 12,000 rpm 室温离心 2 min。  
**【注: ① 此步骤需竖直将吸附柱放入 (取出), 避免吸附柱柱头触碰收集管壁, 造成污染;  
② 安置于新的 2.0 ml Collection tubes 中, 有利于提高 RNA 纯度。】**
12. 将上述 Small RNA Mini Columns 安置于新的 RNase Free Tubes 上, 在吸附柱膜的中央处加入 15  $\mu$ l ~ 200  $\mu$ l RNase Free Water, 室温静置 2 min, 然后 12,000 rpm 室温离心 2 min 洗脱 Total RNA (含 Small RNA), 溶解后的 RNA 可直接用于后续检测或置于 -80 $^{\circ}$ C 中保存。  
**【注: 此步骤需竖直将吸附柱放入 (或取出), 避免吸附柱柱头触碰 RNase Free Tubes 管壁, 造成污染。】**

### Small RNA 纯化步骤:

本产品所提供的 Small RNA Mini Columns 数量, 对应 25 次 Small RNA 纯化实验。

1. 取 200  $\mu$ l 血液样本 (有核或无核全血、血清、血浆及凝血块等) 至 1.5 ml 离心管中。
2. 向上述离心管中加入 200  $\mu$ l 裂解液 Buffer BLS for small RNA, 立即高速涡旋混匀或用移液器反复吹打直至裂解液中无明显沉淀。
3. 将上述裂解液室温静置 5 min。
4. 12,000 rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 小心转移上清液至新的 1.5 ml 离心管中。
5. 向上述离心管中加入 200  $\mu$ l 氯仿 (或 RNA 提取辅助试剂 Code No. AG21303), 充分混匀。室温静置 5 min。
6. 将上述混合液于 12,000  $\times$  g 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min。小心取出离心管, 此时匀浆液分为三层, 即: 上清液 (含 Small RNA 和 Total RNA)、中间蛋白层及下层有机相。
7. **准确量取**上清液转移至新的 1.5 ml 离心管中 (切勿吸出中间蛋白层), 缓慢加入 1/3 倍上清液体积的无水乙醇 (如: 240  $\mu$ l 的上清液加入 80  $\mu$ l 无水乙醇), 用移液器吹打混匀, 若出现明显粘稠物或沉淀, 用移液器吹打多次, 打散沉淀, 使其悬浮在溶液中。  
**【注: 若沉淀不散会导致 Small RNA Mini Columns 堵塞, 影响收量及纯度。】**
8. 立即将上述混合液全部转移至 Small RNA Mini Columns 中, 室温静置 2 min, 12,000 rpm 室温离心 1 min, 弃吸附柱, **准确量取**滤液的体积, 转移至新的 1.5 ml 离心管。

9. 向上述离心管中缓慢加入 2/3 倍滤液体积的无水乙醇（如：270  $\mu$ l 的滤液加入 180  $\mu$ l 无水乙醇），用移液器吹打混匀，若出现明显粘稠物或沉淀，用移液器吹打多次，打散沉淀，使其悬浮在溶液中。  
**【注：若沉淀不打散会导致 Small RNA Mini Columns 堵塞，影响收量及纯度。】**
  10. 立即将上述混合液全部转移至 Small RNA Mini Columns 中，室温静置 2 min，12,000 rpm 室温离心 1 min，弃滤液。
  11. 向上述 Small RNA Mini Columns 中加入 600  $\mu$ l Buffer RWA for small RNA，室温静置 2 min，12,000 rpm 室温离心 1 min，弃滤液。  
**【注：请确认 Buffer RWA for small RNA 中已经加入了指定体积的无水乙醇（Buffer RWA for small RNA 与无水乙醇体积比为 2 : 3）。】**
  12. 向上述 Small RNA Mini Columns 中加入 650  $\mu$ l Buffer RWB，室温静置 2 min，12,000 rpm 室温离心 1 min，弃滤液。  
**【注：请确认 Buffer RWB 中已经加入了指定体积的无水乙醇（Buffer RWB 与无水乙醇体积比为 3 : 7）。】**
  13. 重复步骤 12。
  14. 将上述 Small RNA Mini Columns 安置于新的 2.0 ml Collection tubes 中，12,000 rpm 室温离心 2 min。  
**【注：① 此步骤需竖直将吸附柱放入（取出），避免吸附柱柱头触碰收集管壁，造成污染；  
② 安置于新的 2.0 ml Collection tubes 中，有利于提高 RNA 纯度。】**
  15. 将上述 Small RNA Mini Columns 安置于新的 RNase Free Tubes 上，在吸附柱膜的中央处加入 15  $\mu$ l ~ 30  $\mu$ l RNase Free Water，室温静置 2 min，然后 12,000 rpm 室温离心 2 min 洗脱 Small RNA，溶解后的 Small RNA 可直接用于后续检测或置于 -80 $^{\circ}$ C 中保存。  
**【注：此步骤需竖直将吸附柱放入（或取出），避免吸附柱柱头触碰 RNase Free Tubes 管壁，造成污染。】**
-