

**描述:** 海基生产的全血 miRNA 提取试剂盒是目前世界上提取小 RNA (<200nt) 操作步骤最简单、重复性最好、小 RNA 产率最高的方法。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, 基本不含大 RNA 和 DNA。使用该试剂通过一步上柱即可获得高纯度 miRNA, 可在 45min 内完成小 RNA 的提取。该试剂盒适用于冻存和新鲜的抗凝全血样本 (注意该试剂盒不适用于血清和血浆)。

**组分:**

名称	25 次 B1803A	100 次 B1803B
miRNA Reagent A	7.5 ml	30ml
miRNA Reagent B	10 ml	40 ml
miRNA 吸附柱	25 套	100 套
RnaseFree TE Buffer	5ml	5ml

**储存:** 室温可保存 2 年。

**使用防护建议:** miRNA Reagent A 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

**操作方法:**

- (1) 向 1.5ml EP 管中加入 300 $\mu$ l miRNA Reagent A。将 150 $\mu$ l 抗凝全血加入到上述 300 $\mu$ l miRNA Reagent A 中, 立即手腕用力震荡混合均匀。室温静置 5min 以充分裂解细胞。
- (2) 向上述裂解完毕的裂解液中加入 250 $\mu$ l miRNA Reagent B, 上下颠倒混合均匀。13,000rpm 离心 5min, 吸取 550 $\mu$ l 上清液, 转移到新的 1.5ml EP 管中。
- (3) 向上述溶液中加入 200 $\mu$ l 无水乙醇, 手腕用力震荡数次,

室温放置 5min。

- (5) 13,000rpm 离心 10min, 转移 700 $\mu$ l 上清液到新的 1.5ml EP 管中。
- (6) 向上述溶液中加入 300 $\mu$ l 异丙醇, 手腕用力上下颠倒数次。
- (7) 分两次将上述溶液倒入到 miRNA 吸附柱中, 13,000rpm 离心 1min, 倒掉过滤液。
- (8) 向吸附柱中加入 700 $\mu$ l 75%异丙醇洗涤一次, 13,000rpm 离心 1min, 倒掉过滤液。
- (9) 向吸附柱中加入 500 $\mu$ l 无水乙醇洗涤一次, 13,000rpm 离心 1min, 倒掉过滤液。
- (10) 吸附柱 13,000rpm 空离心 2min, 去掉残留的乙醇。
- (11) 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 $\mu$ l RnaseFree TE Buffer, 室温静置 2min, 13,000rpm 离心 2min, 洗脱产物即为提取的 miRNA。(通常取 3~5 $\mu$ l 该产物, 即可使用海基 HG TaqMan miRNA 反转录试剂盒进行反转录反应, 货号: D1802)。

**常见问题汇总:**

- (1) 本方法提取的小 RNA, 95% 以上为小 RNA (<200nt), 有时会残留一些 >200nt 的 RNA, 通常残留的 >200nt RNA 不影响后续试验操作。
- (2) 本试剂盒提取的小 RNA 由于不含 mRNA 等大分子量的 RNA, 因此更适合做后续反转录试验, 从而进行定量试验。
- (3) 使用本试剂盒提取的 microRNA 浓度通常在 50ng/ $\mu$ l 左右, 取 5~10 $\mu$ l 即可用于电泳检测。取 3~5 $\mu$ l 即可用于海基 HG TaqMan miRNA 反转录试剂盒进行反转录反应 (货号: D1802), 通常使用海基优化的 miR-TaqMan RealTime PCR 技术 (货号: TAPXXXXX)。