

miRNA Purification Kit

miRNA 提取试剂盒

项目号: M665531 (50 preps)

保存条件: TRIzon Reagent 2-8°C 避光保存, 其它组分室温 (15-30°C)。

产品内容

组分	M665531 50 preps
TRIZON Reagent	60 ml
Buffer RWT (concentrate)	15 ml
Buffer RW2 (concentrate)	11 ml
RNase-Free Water	10 ml
Spin Columns RM with Collection Tubes	50
Spin Columns RS with Collection Tubes	50
RNase-Free Centrifuge Tubes (1.5 ml)	50

产品简介

miRNA 提取试剂盒专用于从各种动物组织、植物组织、细胞、血清、血浆等样本中分离纯化 miRNA, 还可以提取 siRNA, snRNA 等其他小于 200 nt 的小分子 RNA, 同时也可用于总 RNA 的提取。本品将酚/胍裂解技术和硅基质膜纯化技术相结合, 独特的裂解液在有效抑制 RNases 的同时, 可以通过有机抽提的方法除去细胞或组织样品中的大部分 DNA 和蛋白。对于一些敏感的下流实验中, 如需富集 miRNA 可适用该试剂盒单独对 miRNA 进行富集。本品适用样本范围广, 制备的 RNA 纯度高, 可直接用于敏感的下流应用, 如 Northern Blot 分析, Real-Time PCR, Microarray Analysis 等。

自备试剂：氯仿、无水乙醇（新开封或提取 RNA 专用）。

实验前准备及重要注意事项

1. 预防 RNase 污染，应注意以下几方面：

- 1) 使用无 RNase 的塑料制品和枪头，避免交叉污染。
 - 2) 玻璃器皿应在使用前于 180℃ 高温下干烤 4 小时，塑料器皿可在 0.5 M NaOH 中浸泡 10 分钟，用水彻底冲洗后高压灭菌。
 - 3) 配制溶液应使用无 RNase 的水。
 - 4) 操作人员戴一次性口罩和手套，实验过程中要勤换手套。
2. 提取的样品避免反复冻融，否则影响 miRNA 提取的量和质量。
3. 第一次使用前应按照试剂瓶标签说明在 Buffer RWT 和 Buffer RW2 中加入无水乙醇。
4. 所有离心步骤若无特殊说明均在室温下进行，且所有操作步骤动作要迅速。

操作步骤

Protocol A: miRNA 富集（可直接用于敏感的下流实验）

1. 样品处理

- 1a. 组织：将组织在液氮中磨碎。每 30–50 mg 组织加 1 ml TRIzon Reagent，震荡混匀。样品体积不超过 TRIzon Reagent 体积的十分之一。
 - 1b. 单层培养细胞：吸去培养液，加入 TRIzon Reagent，每 10 cm² 加入 1 ml TRIzon Reagent（裂解液用量视培养瓶面积而定）。
 - 1c. 细胞悬液：离心得到细胞沉淀，弃上清。每 5×10^6 – 1×10^7 细胞加入 1 ml TRIzon Reagent（细胞不需洗涤）。
 - 1d. 血浆或血清：取 200 μ l 血浆或血清样本，加入 5 倍体积 TRIzon Reagent，震荡混匀 30 秒。
2. 样品中加入 TRIzon Reagent 后反复吹打几次，使其充分裂解。室温放置 5 分钟，使蛋白核酸复合物完全分离。
3. 可选步骤：4℃ 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 5 分钟，取上清，转入一个新的离心管（自备）中（如样品中含较多蛋白、脂肪、多糖等，可选做此步骤）。
4. 向上清中加入氯仿，每使用 1 ml TRIzon Reagent 加入 200 μ l 氯仿，盖好管盖，剧烈振荡 15 秒，室温放置 5 分钟。
5. 4℃ 12,000 rpm 离心 15 分钟，样品分为三层：红色有机相，中间层，无色水相，将上层无色水相移到一个新的离心管（自备）中。
6. 向步骤 5 得到的溶液中加入 1/3 倍体积的无水乙醇，混匀，将得到的溶液和沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱 RM (Spin Columns RM) 中。若一次不能将全部溶液加入吸附柱，请分多次转入。12,000 rpm 离心 30 秒，离心后弃掉吸附柱 RM，保留流出液。
7. 向步骤 6 得到的溶液中加入 2/3 倍体积的无水乙醇，混匀。
8. 将上步所得溶液和沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱 RS (Spin Columns RS)。若一次不能将全部溶液加入吸附柱，请分多次转入。12,000 rpm 离心 30 秒，倒掉收集管中废液，将吸附柱 RS 重新放回收集管中。

9. 向吸附柱 RS 中加入 700 μ l Buffer RWT (使用前检查是否加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 30 秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 RS 重新放回收集管中。
10. 向吸附柱 RS 中加入 500 μ l Buffer RW2 (使用前检查是否加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 30 秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 RS 重新放回收集管中。
11. 重复步骤 10。
12. 12,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液。将吸附柱 RS 置于室温数分钟, 以彻底晾干。注意: 此步骤的目的是将吸附柱 RS 中残留的乙醇去除, 乙醇的残留会影响后续的酶促反应 (酶切、PCR 等)。
13. 将吸附柱 RS 置于一个新的无 RNase 离心管中, 向吸附柱中间部位加入 30-50 μ l RNase-Free Water, 室温放置 1 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟, 收集 RNA 溶液, 得到的 RNA 溶液保存在-70°C, 防止降解。

注意:

- 1) RNase-Free Water 体积不应小于 30 μ l, 体积过小影响回收率。
 - 2) 如果要提高 RNA 的产量, 可用 30-50 μ l 新的 RNase-Free Water 重复步骤 13。
 - 3) 如果要提高 RNA 浓度, 可将得到的溶液重新加入到吸附柱 RS 中, 重复步骤 13
- Protocol B: 总 RNA 的提取 (提取的总 RNA 包括 miRNA 等其他 <200 nt 的小分子 RNA) 1~5 步骤同 protocol A。

6. 向步骤 5 得到的溶液中加入 1.25 倍体积的无水乙醇, 混匀。
7. 将上步所得到的溶液和沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns RM) 中。若一次不能将全部溶液加入吸附柱 RM 中, 请分多次转入。12,000 rpm 离心 30 秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 RM 重新放回收集管中。
8. 向吸附柱 RM 中加入 700 μ l Buffer RWT (使用前检查是否加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 30 秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 RM 重新放回收集管中。
9. 向吸附柱 RM 中加入 500 μ l Buffer RW2 (使用前检查是否加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 30 秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 RM 重新放回收集管中。
10. 重复步骤 9。
11. 12,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液。将吸附柱 RM 置于室温数分钟, 以彻底晾干。

注意: 此步骤的目的是将吸附柱 RM 中残留的乙醇去除, 乙醇的残留会影响后续的酶促反应 (酶切、PCR 等)。

12. 将吸附柱 RM 转入新的无 RNase 离心管中, 向吸附柱中间部位加入 30-50 μ l RNase-Free Water, 室温放置 1 分钟, 室温 12,000 rpm 离心 1 分钟, 收集 RNA 溶液, 得到的 RNA 溶液保存在-70°C, 防止降解。

注意:

- 1) RNase-Free Water 体积不应小于 30 μ l, 体积过小影响回收率。
- 2) 如果要提高 RNA 的产量, 可用 30-50 μ l 新的 RNase-Free Water 重复步骤 12。
- 3) 如果要提高 RNA 浓度, 可将得到的溶液重新加入到吸附柱 RM 中, 重复步骤 12。