

miRNA Purification Kit

经典miRNA提取分离试剂盒

目录号：A O 3 2 0 7

试剂盒组成

Component	A O 3 2 0 7 (5 0 T)
Buffer RZ	5 0 ml
Buffer miRW1	2 5 ml
Buffer RW2 (concentrate)	1 3 ml (使用前按瓶上标签加入无水乙醇)
RNase-free H ₂ O	1 0 ml
Spin Columns RA with Collection Tubes	5 0
Spin Columns miRA with Collection Tubes	5 0

保存方法

Buffer RZ建议收到后置于2 - 8℃避光保存，其它组分RT（15 - 30℃）。

产品介绍

miRNA提取分离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RNase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。

实验前准备及重要注意事项

需自备无水乙醇和氯仿。

使用无RNase的塑料制品和枪头避免交叉污染。

Buffer RZ和Buffer miRW1中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或生理盐水冲洗。

第一次使用Buffer RW2前应按照试剂瓶标签的说明加入无水乙醇。

操作步骤

Protocol A：总RNA的提取

提取的总RNA包括miRNA等其他<200 nt的小分子RNA，对miRNA的纯度要求不高时，比如在研究miRNA RT-PCR、miRNA Northern blot时也可以采用此方法。

样品处理：

1 a) 组织：将组织在液氮中充分研磨，每30 - 50 mg动物组织或者100 mg植物组织中加入1 ml Buffer RZ，震荡混匀。样品体积不超过Buffer RZ体积的十分之一。

1 b) 单层培养细胞：吸去培养液，向直径3.5 cm的培养板/瓶中加入1 ml Buffer RZ（按培养板面积而不是细胞数决定加入量，每10 cm²加入1 ml），用移液器轻轻反复吸打裂解细胞至溶液透明。

1 c) 细胞悬液：离心得到细胞沉淀，弃上清，每 $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ 细胞加入1 ml Buffer RZ混匀裂解细胞。加入Buffer RZ前不要洗涤细胞，以免降解mRNA。

样品中加入Buffer RZ后反复吹打几次，使其充分裂解。室温（15 - 30℃）放置5 min，使得核酸蛋白复合物完全分离。

加入200 μ l氯仿，盖好管盖，剧烈振荡15 s，室温放置3 min。

4℃，12,000 rpm离心10 min，样品会分成三层：下层有机相，白色的中间层和无色的上层水相，RNA存在于水相中。将上层水相移到一个新的离心管中（量取溶液体积）。

向步骤4得到的溶液中加入1.5倍上清体积的无水乙醇，颠倒混匀（可能会出现沉淀，不影响后续操作），将得到的溶液 and 可能产生的沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱（Spin Columns RA）中，若一次不能将全部溶液加入吸附柱，请分两次转入，室温12,000 rpm离心30 s，弃废液，将吸附柱RA重新放回收集管中。

向吸附柱miRA中加入500 μ l Buffer miRW1，室温12,000 rpm离心30 s，弃废液。

向吸附柱miRA中加入600 μ l Buffer RW2（使用前检查是否加入无水乙醇！），室温12,000 rpm离心30 s，弃废液。

重复步骤7。

将吸附柱miRA放回空收集管内，室温12,000 rpm离心2 min。

注意：这一步的目的是去除吸附柱中残余乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR等）。

将吸附柱miRA放入新的RNase-free离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加30 - 50 μ l RNase-Free H₂O，室温放置2 min，室温12,000 rpm离心1 min，得到miRNA溶液，-70℃保存。

注意：RNase-Free H₂O体积不应少于30 μ l，体积过小影响回收效率。如需提高终浓度，可将洗脱的miRNA溶液再次加入到吸附柱中二次洗脱。

Protocol B: miRNA富集提取

富集的miRNA去除了较大片段的mRNA和rRNA等，对miRNA的纯度要求较高时，比如在研究miRNA芯片、miRNA克隆时建议采用此方法。

1~4步骤同protocol A。

向步骤4得到的溶液中加入0.43倍体积的无水乙醇，混匀（此时可能会出现絮状沉淀），将得到的溶液 and 可能产生的絮状沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱RA（Spin Columns RA）中。

12,000 rpm离心30 s，离心后弃掉吸附柱RA，保留滤液（计算体积，miRNA在滤液中）。

向滤液中加 0.75 倍滤液体积的无水乙醇，混匀。将得到的溶液转入已装入收集管的吸附柱 miRA (Spin Columns miRA) 中。若一次不能将全部溶液加入吸附柱，请分两次转入。室温 12,000 rpm 离心 30 s，倒掉收集管中废液，将吸附柱 miRA 重新放回收集管中。

向吸附柱 RA 中加入 500 μ l Buffer miRW1，室温 12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。

向吸附柱 RA 中加入 600 μ l Buffer RW2（使用前检查是否加入无水乙醇！），室温 12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。

重复步骤 8。

将吸附柱放回空收集管内，室温 12,000 rpm 离心 2 min。

注意：这一步的目的是去除吸附柱中残余乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应（酶切、PCR 等）。

将吸附柱 RA 放入新的 RNase-free 离心管中，向吸附膜中间悬空滴 30 - 50 μ l RNase-Free H₂O，室温放 2 min，室温 12,000 rpm 离心 1 min，得到 RNA 溶液，-70℃ 保存。

注意：RNase-Free H₂O 体积不应少于 30 μ l，体积过小影响回收效率。如需提高终浓度，可将洗脱的 RNA 溶液再次加入到吸附柱中二次洗脱。