

版本号: DP141010

# miRcute miRNA isolation kit

## miRcute miRNA提取分离试剂盒

(离心柱型)

目录号: DP501

### 产品内容

产品组成	DP501 (50 preps)
裂解液MZ (Buffer MZ)	60 ml
漂洗液RW (Buffer RW)	12 ml
去蛋白液MRD (Buffer MRD)	12 ml
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	15 ml
RNase-Free吸附柱miRspin (含2 ml收集管) (RNase-Free Spin Column miRspin in a 2 ml Collection Tube)	50 套
RNase-Free吸附柱miRelute (含2 ml收集管) (RNase-Free Spin Column miRelute in a 2 ml Collection Tube)	50 套
RNase-Free离心管 (1.5 ml) (RNase-Free Centrifuge Tubes 1.5 ml)	50个

### 储存条件

裂解液MZ应在2-8℃避光保存, 其他溶液和吸附柱室温(15-25℃)保存。

---

## 产品简介

miRNA提取试剂盒是专门针对miRNA提取而开发的新一代产品，同时还可以提取small interfering RNA(siRNA), small nuclear RNA (snRNA)等small RNA，也可以用于Total RNA的提取。该试剂盒中的裂解液是经过长时间研发改良的，具有一般裂解液不具有的裂解能力和提取灵敏度，试剂盒中的吸附柱采用特殊的硅基质膜填料，大大增强了其对RNA的吸附能力，尤其是small RNA(<200 nt)。得到的RNA纯度更好，质量更高。该试剂盒适用于各种样本（细胞，动物组织，植物组织，血清，血浆）中RNA的提取，每个吸附柱每次可处理30~50 mg动物组织(RNA含量高的组织,如肝脏不能超过30 mg)，100 mg植物组织或 $1 \times 10^7$ 细胞。1 h内即可完成所有操作，提取的RNA没有DNA和蛋白污染，可用于Northern Blot、Dot Blot、PolyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆。

## 注意事项

### 预防RNase污染，应注意以下几方面

1. 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致RNase污染。
2. 使用无RNase的塑料制品和枪头避免交叉污染。
3. RNA在裂解液中不会被RNase降解。但提取后继续处理过程中应使用不含RNase的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在150°C烘烤4 h，塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10 min，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除RNase。
4. 配制溶液应使用无RNase的水。（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入DEPC至终浓度0.1%(v/v)，放置过夜，高压灭菌。）

---

## 操作步骤

第一次使用前应在漂洗液RW和去蛋白液MRD中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。

### 一、组织或细胞中miRNA富集部分的提取。

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. 样品处理

- a. 组织：将组织在液氮中磨碎。每30~50 mg动物组织或者100 mg植物组织加1 ml 裂解液MZ，用匀浆仪进行匀浆处理。样品体积不应超过裂解液MZ体积的十分之一。
- b. 单层培养细胞：直接在培养板中加入裂解液MZ裂解细胞，每10 cm<sup>2</sup>面积加1 ml MZ。用取样器抽打几次。

**注意：裂解液MZ的加入量根据培养瓶面积决定，不是由细胞数决定。如果加量不足，可能导致提取的RNA中有DNA污染。**

- c. 细胞悬液：离心2,100 rpm (400×g) 5 min取细胞，弃上清。加入1 ml 裂解液MZ，振荡器振荡或移液器吸打数次混匀。加裂解液MZ前不要洗涤细胞，以免降解mRNA。

2. 将匀浆样品在室温放置5 min，使得核酸蛋白复合物完全分离。

3. **可选步骤：**4℃ 12,000 rpm (~13,400×g) 离心5 min，取上清，转入一个新的无RNase的离心管中。

**注意：如果样品中含有较多蛋白、脂肪、多糖或肌肉、植物结节部分等，可加此步骤离心去除。离心得到的沉淀中包括细胞外膜、多糖、高分子量DNA，RNA存在于上清溶液中。**

4. 加入200 μl氯仿，盖好管盖，剧烈振荡15 sec，室温放置5 min。

5. 4℃ 12,000 rpm (~13,400×g) 离心15 min，样品会分成三层：黄色的有机相，中间层和无色的水相，RNA主要在水相中，水相的体积约为所用裂解液MZ试剂的50%。把水相转移到新管中，进行下一步操作。

- 
6. 量取转移液的体积，缓慢加入转移液体积0.43倍的无水乙醇（如：500  $\mu$ l的转移液加215  $\mu$ l无水乙醇），混匀（此时可能会出现沉淀）。将得到的溶液和沉淀一起转入向吸附柱miRspin中，室温 12,000 rpm (~13,400  $\times$ g)离心30 sec，若一次不能将全部溶液和混合物加入向吸附柱miRspin中，请分两次转入，离心后弃掉向吸附柱miRspin，保留流出液。
  7. 量取流出液的体积，缓慢加入流出液体积0.75倍的无水乙醇（如：700  $\mu$ l的流出液加525  $\mu$ l无水乙醇），混匀（此时可能会出现沉淀）。将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱miRelute中，室温 12,000 rpm (~13,400  $\times$ g)离心30 sec，若一次不能将全部溶液和混合物加入吸附柱miRelute中，请分两次转入，离心后弃掉流出液，保留吸附柱miRelute。
  8. 向吸附柱miRelute中加入500  $\mu$ l去蛋白液MRD（请先检查是否已加入乙醇），室温静置2 min，室温 12,000 rpm (~13,400  $\times$ g)离心30 sec，弃废液。
  9. 向吸附柱miRelute中加入500  $\mu$ l漂洗液RW（请先检查是否已加入乙醇），室温静置2 min，室温 12,000 rpm (~13,400  $\times$ g)离心30 sec，弃废液。
  10. 重复操作步骤9。
  11. 将吸附柱miRelute放入2 ml收集管中，室温 12,000 rpm (~13,400  $\times$ g) 离心1 min，去除残余液体。

**注意：**此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，离心后将吸附柱miRelute在室温放置片刻，或置于超净工作台上通风片刻，以充分晾干。如果有漂洗液残留，可能会影响后续的RT等实验操作。

12. 将吸附柱miRelute转入一个新的RNase-Free 1.5 ml离心管中，加15-30  $\mu$ l RNase-Free ddH<sub>2</sub>O，室温放置2 min，室温 12,000 rpm (~13,400  $\times$ g)离心2 min。

**注意：**洗脱缓冲液体积不应少于15  $\mu$ l，体积过小影响回收效率。且RNA应保存在-70  $^{\circ}$ C，以防降解。**注意：**如果想提高RNA得率，可重复上步操作一次。

---

## 二、组织或细胞中Total RNA的提取

(提取的total RNA中含有miRNA等small 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。

1. 样品处理(同一、组织或细胞中miRNA富集部分的提取步骤-1)
2. 同一、组织或细胞中miRNA富集部分的提取步骤-2
3. 同一、组织或细胞中miRNA富集部分的提取步骤-3
4. 同一、组织或细胞中miRNA富集部分的提取步骤-4
5. 同一、组织或细胞中miRNA富集部分的提取步骤-5
6. 量取转移液的体积，缓慢加入转移液体积1.5倍的无水乙醇（如：500  $\mu$ l的转移液加750  $\mu$ l无水乙醇），混匀（此时可能会出现沉淀）。将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱miRspin中，室温 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心30 sec，若一次不能将全部溶液和混合物加入吸附柱miRspin，请分两次转入，离心后弃掉流出液，保留吸附柱miRspin。
7. 向吸附柱miRspin中加入500  $\mu$ l去蛋白液MRD（请先检查是否已加入乙醇），室温静置2 min，室温 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心30 sec，弃废液。
8. 向吸附柱miRspin中加入500  $\mu$ l漂洗液RW（请先检查是否已加入乙醇），室温静置2 min，室温 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心30 sec，弃废液。
9. 重复操作步骤8。
10. 将吸附柱miRspin放入2 ml收集管中，室温 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心1 min，去除残余液体。

**注意：**此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，离心后将吸附柱miRspin在室温放置片刻，或置于超净工作台上通风片刻，以充分晾干。如果有漂洗液残留，可能会影响后续的RT等实验操作。

11. 将吸附柱miRspin转入一个新的RNase-Free 1.5 ml离心管中，加30-100  $\mu$ l RNase-Free ddH<sub>2</sub>O，室温放置2 min，室温 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g)离心2 min。

**洗脱缓冲液体积不应少于30  $\mu$ l，体积小影响回收效率。且RNA应保存在-70 $^{\circ}$ C，以防降解。注意：如果想提高RNA得率，可重复上步操作一次。**

---

### 三、全血、血清或血浆中miRNA富集部分的提取。

1. 样品处理：每200  $\mu\text{l}$ 全血、血清或血浆中加入等体积裂解液MZ，振荡器振荡混匀30 sec。
2. 室温放置5 min，使得核酸蛋白复合物完全分离。
3. 室温 12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ ) 离心10 min，取上清，转入一个新的无RNase的离心管中。
4. 加入200  $\mu\text{l}$ 氯仿，盖好管盖，剧烈振荡15 sec，室温放置5 min。
5. 室温 12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ ) 离心15 min，样品会分成三层：黄色的有机相，中间层和无色的水相，RNA主要在水相中，把水相转移到新管中，进行下一步操作。
6. 量取转移液的体积，缓慢加入转移液体积1/3体积的无水乙醇（如：300  $\mu\text{l}$ 的转移液加100  $\mu\text{l}$ 无水乙醇），混匀（此时可能会出现沉淀）。将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱miRspin，室温放置2 min，室温 12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )离心30 sec，离心后弃掉吸附柱miRspin，保留流出液。
7. 量取流出液的体积，缓慢加入流出液体积2/3体积的无水乙醇（如：300  $\mu\text{l}$ 的流出液加200  $\mu\text{l}$ 无水乙醇），混匀（此时可能会出现沉淀）。将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱miRelute，室温放置2 min，室温 12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )离心30 sec，离心后弃掉流出液，保留吸附柱miRelute。
8. 向吸附柱miRelute中加入500  $\mu\text{l}$ 去蛋白液MRD（请先检查是否已加入乙醇），室温静置2 min，室温 12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )离心30 sec，弃废液。
9. 向吸附柱miRelute中加入500  $\mu\text{l}$ 漂洗液RW（请先检查是否已加入乙醇），室温静置2 min，室温 12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )离心30 sec，弃废液。
10. 重复操作步骤9。
11. 将吸附柱miRelute放入2 ml收集管中，室温 12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )离心1 min，去除残余液体。

**注意：**此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，离心后将吸附柱miRelute在室温放置片刻，或置于超净工作台上通风片刻，以充分晾干。如果有漂洗液残留，可能会影响后续的RT等实验操作。

---

12. 将吸附柱miRelute转入一个新的RNase-Free 1.5 ml离心管中，加15-30  $\mu$ l RNase-Free ddH<sub>2</sub>O，室温放置2 min，室温 12,000 rpm (~13,400  $\times$  g)离心2 min。

**注意：**洗脱缓冲液体积不应少于15  $\mu$ l，体积过小影响回收效率。且RNA应保存在-70℃，以防降解。如果想提高RNA得率，可重复上步操作一次；或者增加血清或血浆的样品量并成比例增加裂解液和氯仿的用量。

---

# 浓缩国际权威精华， 铸就TIANGEN优秀品质！

**TIANGEN为您提供国际化标准的生物学产品和服务**

- PCR、RT-PCR系列
- 核酸DNA、RNA分离纯化系列
- DNA分子量标准
- 克隆载体、感受态细胞
- 细胞生物学产品
- 蛋白分子量标准
- 蛋白质染色、检测及定量相关产品