

版本号: FRI1228

FinePure miRNA 柱式提取试剂盒

FinePure miRNA Isolation Kit

(离心柱型)

目录号: FR903

产品内容:

产品组成	FR903 (50 preps)
Buffer RBL	60 ml
Buffer MZ	60 ml
Buffer MRW1	12 ml
Buffer RW2	12 ml
RNase Free ddH ₂ O	15 ml
FinePure Mini Spin Columns	50 个
RNAPure miRelute Spin Columns	50 个
2 ml Collection Tubes	2×50 个
1.5 ml RNase Free Microcentrifuge Tubes	50 个

储存条件:

试剂盒中 Buffer MZ 常温运输, 收到后应在 2-8°C 避光保存, 其他组分室温(15-25°C)保存。

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

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专为 miRNA 提取优化, 具有较强的裂解能力和灵敏度, 试剂盒中的吸附柱采用进口的玻璃纤维素膜, 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, 植物组织等)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 1×10^7 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。

准备事项:

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 Buffer MRW1 和 Buffer RW2 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. 柱平衡步骤: 向吸附柱 FinePure Mini Spin Columns 和 RNAPure miRelute Spin Columns 中(吸附柱放入收集管中)分别加入 500 μ l Buffer RBL, 12,000 rpm 离心 2 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。(请使用当天处理过的柱子)
2. 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 Buffer MZ, 用匀浆仪进行匀浆处理。样品体积不应超过 Buffer MZ 体积的 1/10。

-
- b. 单层培养细胞：直接在培养板中加入 Buffer MZ 裂解细胞，每 10 cm² 面积加 1 ml MZ，用取样器抽打几次。
- 注意：Buffer 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 Buffer MZ，振荡器振荡或移液器吸打数次混匀。加 Buffer MZ 前不要洗涤细胞，以免降解 mRNA。
3. 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。
 4. (可选) 4°C 12,000 rpm 离心 5 min，取上清，转入一个新的 RNase Free 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。
 5. 加入 200 μl 氯仿，盖好管盖，剧烈振荡 15 sec，室温放置 5 min。
 6. 4°C 12,000 rpm 离心 15 min，样品会分成三层：粉色的有机相，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 Buffer MZ 试剂的 50%。把水相转移到新管中，进行下一步操作。
 7. 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 μl 的转移液加 215 μl 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 FinePure Mini Spin Columns 中，室温 12,000 rpm 离心 30 sec，若一次不能将全部溶液和混合物加入向吸附柱中，请分两次转入，离心后弃掉吸附柱，保留流出液。
 8. 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 μl 的流出液加 525 μl 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 RNAPure miRelute Spin Columns 中，室温 12,000 rpm 离心 30 sec，若一次不能将全部溶液和混合物加入吸附柱中，请分两次转入，离心后弃掉流出液，保留吸附柱。
 9. 向吸附柱中加入 500 μl Buffer MRW1（请先检查是否已加入乙醇），室温 12,000 rpm 离心 30 sec，弃废液。
 10. 向吸附柱中加入 500 μl Buffer RW2（请先检查是否已加入乙醇），室温 12,000 rpm 离心 30 sec，弃废液。
 11. 重复操作步骤 10 一次。
 12. 将吸附柱放入 2 ml 收集管中，室温 12,000 rpm 离心 3 min，去除残余液体。

13. 将吸附柱转入一个新的 1.5 ml RNase Free Microcentrifuge Tubes 中，加 30 μ l RNase Free ddH₂O，室温放置 1 min，12,000 rpm 离心 1 min。

注意：RNase Free ddH₂O 体积不应少于 30 μ l，体积过小影响回收效率。RNA 应保存在-70°C，以防降解。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. 柱平衡步骤：向吸附柱 FinePure Mini Spin Columns 中（吸附柱放入收集管中）加入 500 μ l Buffer RBL，12,000 rpm 离心 2 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。（请使用当天处理过的柱子）
2. 样品处理(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. 同一、组织或细胞中 miRNA 富集部分的提取步骤-6
7. 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 μ l 的转移液加入 750 μ 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 FinePure Mini Spin Columns 中，室温 12,000 rpm 离心 30 sec，若一次不能将全部溶液和混合物加入吸附柱，请分两次转入，离心后弃掉流出液，保留吸附柱。
8. 向吸附柱中加入 500 μ l Buffer MRW1（请先检查是否已加入乙醇），室温 12,000 rpm 离心 30 sec，弃废液。
9. 向吸附柱中加入 500 μ l Buffer RW2（请先检查是否已加入乙醇），室温 12,000 rpm 离心 30 sec，弃废液。
10. 重复操作步骤 9 一次。
11. 将吸附柱放入 2 ml 收集管中，室温 12,000 rpm 离心 3 min，去除残余液体。
12. 将吸附柱转入一个新的 1.5 ml RNase Free Microcentrifuge Tubes 中，加 30-100 μ l RNase Free ddH₂O，室温放置 1 min，12,000 rpm 离心 1 min。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于 30 μ l，体积过小影响回收效率。RNA 应保存在-70°C，以防降解。如果想提高 RNA 得率，可重复上步操作一次。