

miRNA Purification Kit

Version 07/21

miRNA 提取分离试剂盒

目录号：

RHYC72 试剂盒

组成

Component	RHYC72 (50 preps)
Buffer RZ	50 ml
Buffer miRW1	25 ml
Buffer RW2 (concentrate)	13 ml (使用前按瓶上标签加入无水乙醇)
RNase-free H ₂ O	10 ml
Spin Columns RA with Collection Tubes	50
Spin Columns miRA with Collection Tubes	50

保存方法

Buffer RZ 常温运输，4°C避光保存（室温存放 3 个月无影响），其它组分 RT（15-30°C）。

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 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。对于一些敏感的下游实验中，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游应用，如 Northern Blot 分析，Real-Time PCR，Microarray Analysis 等。

实验前准备及重要注意事项

1. 需自备无水乙醇和氯仿。
2. 使用无 RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染。
3. 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。

4. 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 : 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. 样品处理：

1a) **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。

1b) **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。

1c) **细胞悬液**：离心得到细胞沉淀，弃上清，每 5×10⁶-1×10⁷ 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。

1d) **血清或血浆**：取 250 μl 血清或血浆样本，加入 **750 μl Buffer LS**，震荡混匀 30 s。

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

3. 加入 **200 μl 氯仿**，盖好管盖，剧烈振荡 15 s，室温放置 3 min。

4. 4°C，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**）。

5. 向步骤 4 得到的溶液中加入 **0.43 倍体积的无水乙醇**，混匀（此时可能会出现沉淀），将得到的溶液和沉淀一起转入已装入收集管的吸附柱 RA（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。12,000 rpm 离心 30 s，离心后弃掉吸附柱 RA，保留流出液（**合并两次流出液，计算体积**）。

6. 向步骤 5 得到的溶液中加入 **0.75 倍体积的无水乙醇**，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，请分多次转入。室温 12,000 rpm 离心 30 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 miRA 重新放回收集管中。

7. 向吸附柱 miRA 中加入 **500 μl Buffer miRW1**，室温 12,000 rpm 离心 30 s，弃废液。

8. 向吸附柱 miRA 中加入 **600 μl 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。

9. 重复步骤 8。

10. 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)。

11. 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 **30-40 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°C 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 : 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。

1~4 步骤同 protocol A。

5 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), 将得到的溶液和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, 请分多次转入, 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。

6 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。

7 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。

8 重复步骤 7。

9 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)。

10 将吸附柱 RA 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 RNA 溶液, -70°C 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。
