



miRNA Purification Kit

miRNA提取试剂盒

目录号：CW0627S（50 preps）

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

产品内容

Component	CW0627S 50 preps
TRIzol 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。

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游实验）

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 TRlzon Reagent**，震荡混匀。样品体积不超过TRlzon Reagent体积的十分之一。
 - 1b. 单层培养细胞：吸去培养液，加入TRlzon Reagent，每**10 cm²**加入**1 ml TRlzon 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 TRIzol 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TRIzol Reagent**，震荡混匀30秒。
2. 样品中加入**TRIzol 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°C 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 TRIzol 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°C 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 $^{\circ}$ 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。

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其它用途