



MicroRNA Extraction and Purification Kit (ultrafiltration)

MicroRNA 分离纯化试剂盒(超滤法)

说明书

【产品简介】

本试剂盒的裂解抽提试剂采用独特的配方和添加剂,能高效的裂解细胞和组织,有效的去除大片段 RNA,富集纯化 30bp 以下的小 RNA。另外本试剂还可以有效地抑制各种外源性和内源性的核酸酶,同时结合特制的纯化柱,能最大限度的保持核酸的完整性、高得率以及纯度。

【试剂盒组成】

试剂盒组成	LN-0116A(10 次)	LN-01165B (20 次)
裂解液 LB	12 ml	24ml
漂洗液 WB	4 ml	8ml
离心纯化柱	10 个	20 个
miRNA 分离柱	10 个	20 个
洗脱液 EB	2x2ml	4x2ml
说明书	1 份	1 份

注意: 1. 第一次使用前,请按照标签提示往漂洗液 WB 中加入无水乙醇。

2. 此试剂盒只提取小于 30bp 的小 RNA,其它大片段基因被除去,因此不适合做 microRNA 的相对定量实验。

【试剂运输及储存条件】

试剂运输可在常温环境下进行。储存时,可保存在室温。裂解液LB存放于4℃。本试剂盒有效期为12个月,请在有效期内使用。

【操作步骤】

1. A:从组织中提取总 RNA,在冷冻的研钵中切下一小块深层冷冻的组织样品,并用电子天平称量。然后立即将该组织转移至加有 1ml 裂解液 LB 的无 RNA 酶的离心管中,用电动匀浆机在冰浴中匀浆组织约 15s 直到看不见明显的组织块,之后操作见第 2 步。

注意: 组织样品应储存于液氮或低温冰箱(-80℃)。该实验流程只适用于在小于 50mg 的组织样品中抽提总 RNA,如果样品比较多,则需要适量多加裂解液 LB 来消化组织。

B:从细胞样品中提取 RNA,先把培养皿或培养瓶置于冰上,弃尽培液,用预冷的 1XPBS 洗涤细胞两次。然后加入 1ml 裂解液 LB,用细胞刮刮下所有细胞,将裂解物转移至无 RNA 酶的 1.5ml 离心管中,充分振荡 30s,之后操作见第 2 步。

注意: 1. 试剂盒中不提供 1xPBS,可自行配制。2. 重悬细胞还可以先将细胞 2000xg,离心 3min,用 1XPBS 洗涤后再加入 1 ml 裂解液 LB。3. 该实验流程只适用于从少于 1×10^7 细胞中提取 RNA,否则就需要更多的裂解液 LB。

2. 把裂解物于室温静置5min后,加入0.2ml三氯甲烷,小心盖上管盖,剧烈摇动15s。

注意: 请不要漩涡震荡,避免引入DNA污染。

3. 将离心管再次置于室温2-3min,然后4℃, 12,000 x g离心15min。

注意: 离心会使溶液分为三相,含有RNA的水相上清液,包含蛋白和DNA的中层以及包含DNA的下层有机相。在 4℃离心对于溶液的分层是非常关键的。

4. 将上清水相转移至另一新的无RNA酶离心管中,并加入1.5倍体积的100%乙醇,漩涡振荡混匀5s。

5. 立即吸取700μl样品以及有可能形成的沉淀,加入带有2ml收集管的离心纯化柱。轻盖盖子, 10,000 x g, 室温离心15s, 弃尽废液。

6. 将剩余的样品转移至离心柱,重复第6步。



7. 往离心柱中加入700 μ l漂洗液WB, 轻盖盖子, 10,000 x g, 室温离心15s, 弃尽废液。
注意: 第一次使用前请确认是否已经往漂洗液WB中加入适量无水乙醇。
8. 往离心柱中加入500 μ l漂洗液WB, 轻盖盖子, 10,000 x g, 室温离心15s, 弃尽废液, 重复一次, 之后10,000 x g离心空柱2min干燥硅胶膜。
注意: 完全去除洗液对最后溶解是非常重要的, 洗液的残留会影响最终的洗脱。
9. 将离心柱转移至一新的无RNA酶的1.5ml离心管中, 往硅胶膜中央滴加200 μ l无核酸酶水, 轻盖管盖, 室温静置1-5min, 10,000 x g 离心1min洗脱RNA。
注意: 洗脱体积不宜小于200 μ l, 否则会影响洗脱效果。
10. 把洗脱液滴加回硅胶膜重复第10步洗脱。
11. 把溶解的RNA转移至miRNA分离柱, 4 $^{\circ}$ C 10,000 x g 离心15min。
12. 将离心回收的小RNA至于冰上, 保存请置于-80 $^{\circ}$ C。

注: 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。