

EasyPure[®] miRNA Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号: ER601

版本号: Version 2.0

保存: LB10在2-8°C避光保存一年, 其余在室温(15°C-25°C)干燥条件下保存一年。

产品说明

本产品适用于从细胞、组织、新鲜血液、外泌体中提取miRNA和Total RNA, 裂解样品后, 加入RNA Extraction Agent后, 溶液分为无色水相和粉红色有机相, RNA在水相。通过调整加入水相中无水乙醇的用量, 使RNA离心柱特异性地吸附大分子量RNA (28S rRNA, 18S rRNA, mRNA)后, 将流出液 (包含小于200 nt的RNA, 如miRNA, siRNA, shRNA, snRNA等) 再经miRNA离心柱特异性地吸附纯化得到的miRNA; 通过调整加入水相中无水乙醇的用量, 使RNA离心柱吸附所有RNA (包含小于200 nt的RNA, 如miRNA, siRNA, shRNA, snRNA等)。本产品裂解能力强、提取量高、应用范围广。

产品组成

Component	ER601-01-V2 (50 rxns)
Lysis Buffer 10 (LB10)	55 ml
RNA Extraction Agent	11 ml
Wash Buffer 10 (WB10)	12 ml
RNA Spin Columns with Collection Tubes	50个
miRNA Spin Columns with Collection Tubes	50个
RNase-free Tube (1.5 ml)	50个
RNase-free Water	10 ml

样品要求

Material	Amount
Tissue	50-100 mg
Cell	1×10 ⁷ cells
Fresh Blood/Exosome	50-200 μl

操作步骤

请提前将低温离心机调至2-8°C, WB10使用前加入48 ml的无水乙醇。

准备试剂: 无水乙醇。

样品处理:

1、匀浆处理

a. 贴壁培养细胞

- 倒出培养液, 用1×PBS清洗一次。
- 每10 cm²生长的培养细胞中加入1 ml的LB10, 水平放置片刻, 使裂解液均匀分布于细胞表面并裂解细胞, 然后使用移液枪吹打细胞使其脱落 (对于贴壁牢固的培养细胞可用细胞刮勺剥离细胞)。
- 将内含细胞的裂解液转移至离心管中, 用移液枪反复吹吸直至裂解液中无明显沉淀。
- 室温静置5分钟。

b. 悬浮培养细胞

- 将悬浮培养细胞连同培养液一起倒入离心管中, 8,000×g 2-8°C离心2分钟, 弃上清。
- 向每1×10⁷个细胞中加入1 ml的LB10。
- 用移液枪反复吹吸直至裂解液中无明显沉淀。
- 室温静置5分钟。

c. 动、植物组织样品

- 将超低温冷冻的样品称量后, 迅速转移至用液氮预冷的研钵中, 用研杵充分研磨组织直至研磨成粉末状, 其间可以补加液氮。如果研磨不彻底会影响RNA的收率和质量。
- 将研磨成粉末状的样品转移至离心管中, 每50-100 mg组织加入1 ml LB10。用匀浆仪进行匀浆处理, 或用枪反复吹吸混匀。
- 室温静置5分钟。



d. 血液

- 每 $\leq 200 \mu\text{l}$ 血液中加入1 ml LB10, 振荡混匀。
- 室温静置5分钟。

e. 外泌体

- 用100 μl PBS重悬外泌体, 加入1 ml LB10, 振荡混匀。
- 室温静置5分钟。

2、每使用1 ml LB10, 加0.2 ml RNA Extraction Agent, 剧烈振荡30秒, 室温孵育3分钟。

3、10,000 $\times g$ 2-8 $^{\circ}\text{C}$ 离心15分钟。此时样品分成三层, 无色的水相(上层), 中间层, 粉红色有机相(下层)。RNA主要在水相中, 水相体积约为所用LB10试剂的50%-60%(为了避免吸到中间层导致DNA污染, 可以适当留下一部分水相)。

4、转移无色的水相于新的离心管中, 进行不同的处理可得到miRNA或者Total RNA。过程如下:

此后离心均可在室温中进行。

miRNA纯化:

- (1) 在离心管的水相中加入1/3转移液体积的无水乙醇(如: 500 μl 转移液中加入167 μl 的无水乙醇, 此时可能会出现沉淀), 颠倒混匀。
- (2) 将溶液和沉淀全部加入RNA Spin Column中, 12,000 $\times g$ 室温离心30秒, 保留流出液。
- (3) 准确测量流出液的体积, 转移到干净的1.5 ml或2 ml RNase-free离心管中, 加入**1.25倍**流出液体积的无水乙醇(如: 650 μl 流出液中加812.5 μl 的无水乙醇, 此时可能会出现沉淀), 轻轻颠倒混匀。
- (4) 将溶液和沉淀全部加入miRNA Spin Column中, 12,000 $\times g$ 室温离心30秒, 弃掉流出液(溶液体积大于 miRNA Spin Column体积, 重复该步骤直到所有的溶液加完为止)。
- (5) 加入500 μl WB10(使用前请先检查是否加入无水乙醇), 室温12,000 $\times g$ 离心30秒, 弃掉流出液。
- (6) 重复步骤(5)一次。
- (7) 室温12,000 $\times g$ 离心2分钟, 彻底去除残留的乙醇。
- (8) 将miRNA Spin Column放入1.5 ml RNase-free Tube中, 加30-50 μl RNase-free Water 在离心柱的中央, 室温静置1分钟。
- (9) 室温12,000 $\times g$ 离心1分钟, 洗脱miRNA。
- (10) 将miRNA 置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

Total RNA纯化:

- (1) 在离心管的水相中加入**1.25倍**转移液体积的无水乙醇(如: 500 μl 转移液中加入625 μl 的无水乙醇, 此时可能会出现沉淀), 轻轻颠倒混匀。
- (2) 将溶液和沉淀全部加入RNA Spin Column中, 12,000 $\times g$ 室温离心30秒, 弃掉流出液(溶液体积大于RNA Spin Column体积, 重复该步骤直到所有的溶液加完为止)。
- (3) 加入500 μl WB10(使用前请先检查是否加入无水乙醇), 室温12,000 $\times g$ 离心30秒, 弃掉流出液。
- (4) 重复步骤(3)一次。
- (5) 室温12,000 $\times g$ 离心2分钟, 彻底去除残留的乙醇。
- (6) 将RNA Spin Column放入1.5 ml RNase-free Tube中, 加入100 μl RNase-free Water 在离心柱的中央, 室温静置1分钟。
- (7) 室温12,000 $\times g$ 离心1分钟, 洗脱Total RNA。
- (8) 将Total RNA置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

注意事项

- 加入RNA Extraction Agent后, 一定要充分振荡, 确保抽提效果。
- 实验所用有机试剂(无水乙醇), 要确保无RNase污染; 所用耗材如离心管、枪头也要确保RNase free。
- 所得miRNA不适合用分光光度计定量。

本产品仅供研究, 不用于临床诊断。

版本号: V2.0-202302

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

