



北京艾德莱生物科技有限公司

Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

- ◆ **RNAmisi microRNA 快速提取试剂盒**
- ◆ 目录号 **RN05**
- ◆ 使用手册
- ◆ 实验室使用，仅用于体外

RNA_{Amisi} microRNA 快速提取试剂盒

目录号: **RN05**

目录编号	包装单位
RN0501	50次

❖ **适用范围:**

适用于快速提取各种细胞组织miRNA和其它各种小RNA

❖ **试剂盒组成、储存、稳定性:**

试剂盒组成	保存	50 次
Lysis/Binding buffer	4°C 避光	50 ml
70%乙醇	室温	9ml RNase-free H₂O 第一次使用前按说明加指定量乙醇
Wash Solution 1	室温	12 ml 第一次使用前加入 28ml 无水乙醇
Wash Solution 2/3	室温	10 ml 第一次使用前加入 42ml 无水乙醇
RNase-free H₂O	室温	10 ml
吸附柱 RA 和收集管	室温	50 套
microRNA 吸附柱 MA 和收集管	室温	50 套

本试剂盒按照指示储存 6 个月不影响使用效果。

储存事项

1. Wash Solution 1 和 Wash Solution 2/3 加入无水乙醇后，可以在常温保存一个月，如果要更长时间保存，请存放在 4°C，**但是使用前，应该先回复到室温。**
2. Wash Solution 2/3 可能加入乙醇使用几天后出现沉淀晶体，并不影响使用，直接不吸晶体，吸上清使用就可以。
3. 运输在常温下进行，不影响使用效果。
4. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

❖ **产品介绍：**

近年来对 RNA 干扰和调节性小 RNA 的广泛研究迫切需要一种能有效提取 15 -30 核苷酸左右大小 RNA（包括 siRNA 和 miRNA）的试剂盒。但是传统的 RNA 提取方法如硅胶膜不能有效吸附回收，酚/胍抽提和乙醇沉淀并不能有效沉淀回收微小分子 RNA。本试剂盒采用独特的裂解液/ β -巯基乙醇迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，强烈有机抽提去除蛋白和 DNA，RNA 包括微小分子 RNA 吸附于离心柱内特殊硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗—离心的步骤，漂洗液将细胞代谢物，蛋白等杂质进一步去除，最后低盐的洗脱液将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。



❖ **产品特点：**

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口世界著名公司特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。克服了国产试剂盒膜质量不稳定的弊端。
2. 也不需要乙醇沉淀等容易丧失微小分子 RNA 的步骤。
3. 快速，简捷，单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 1.9~2.0，基本无 DNA 残留，可用于 RNAi，RT-PCR，Northern-blot 和各种实验。

❖ **注意事项**

1. **第一次使用前请先在 70%乙醇、Wash Solution 1 瓶和 Wash Solution 2/3 瓶中加入指定量乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！**
2. **所有的离心步骤均在室温完成**，使用转速可以达到 13, 000 rpm 的传统台式离心机，如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
3. 需要自备乙醇，氯仿，一次性注射器，研钵。
4. **Lysis/Binding buffer 和 Wash Solution 1 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，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**
5. 预防 RNase 污染，应注意以下几方面：
 - 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 在裂解液中时不会被 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℃ 烘烤 4 小时，塑料器皿可在 0.5 M



NaOH 中浸泡10 分钟，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)，37℃放置过夜，高压灭菌。）

6. RNA 纯度及浓度检测：

完整性：RNA 可用普通琼脂糖凝胶电泳（电泳条件：胶浓度 1.2%；0.5×TBE 电泳缓冲液；150v，15 分钟）检测完整性。由于细胞中 70%-80%的 RNA 为 rRNA，电泳后 UV 下应能看到非常明显的 rRNA 条带。动物 rRNA 大小分别约为 5 kb 和 2kb，分别相当于 28S 和 18S rRNA。动物 RNA 样品中最大 rRNA 亮度应为次大 rRNA 亮度的 1.5-2.0 倍，否则表示 RNA 样品的降解。出现弥散片状或条带消失表明样品严重降解。

纯度：OD260/OD280 比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的 RNA，OD260/OD280 读数（10mM Tris, pH7.5）在 1.8-2.1 之间。OD260/OD280 读数受测定所用溶液的 pH 值影响。同一个 RNA 样品，假定在 10mM Tris, pH7.5 溶液中测出的 OD260/OD280 读数 1.8-2.1 之间，在水溶液中所测读数则可能在 1.5-1.9 之间，但这并不表示 RNA 不纯。

浓度：取一定量的 RNA 提取物，用 RNase-free 水稀释 n 倍，用 RNase-free 水将分光光度计调零，取稀释液进行 OD260, OD280 测定，按照以下公式进行 RNA 浓度的计算：终浓度（ng/μl）= (OD260)×(稀释倍数 n)×40。

❖ **操作步骤：**（提取包含 **microRNA** 的总 **RNA**）

提示：

⇒ 第一次使用前请先在 70%乙醇、Wash Solution 1 瓶和 Wash Solution 2/3 瓶中加入指定量乙醇！

1. 组织培养细胞

a. 收集 $<10^7$ 悬浮细胞到一个 1.5ml 离心管。（对于贴壁细胞，孔板培养和细胞瓶培养可以直接裂解，尽可能吸干净所有培养液残留后直接加入 1ml 的 Lysis/Binding buffer, 迅速轻摇使 Lysis/Binding buffer 充分和瓶底所有细胞接触裂解细胞并灭活 RNA 酶，轻轻用移液枪反复吹打混匀接**操作步骤**项下 3。）

b. 13, 000rpm 离心 10 秒（或者 300g 离心 5 分钟），使细胞沉淀下来。**完全吸弃上清**，留下细胞团，注意不完全弃上清会稀释裂解液导致产量纯度降低。

c. 轻弹管壁将细胞沉淀**完全松散重悬**，加入 1ml Lysis/Binding buffer，涡旋或者吹打，充分裂解混匀。

d. 接**操作步骤**项下 3。

2. 动物组织（例如鼠肝脑）

a. 新鲜组织用解剖刀迅速切成小碎块,根据处理组织的质量，按照 50-100mg 加入 1ml 的比例加入 Lysis/Binding buffer 后电动或者手动彻底匀浆。或者在液氮中研磨组织成细粉后,取适量组织细粉(约 50-100mg)转入装有 1ml Lysis/Binding buffer 的 1.5ml 离心管中,剧烈吹打涡旋混匀。

b. **可选,一般不需要：**如果处理量大,有明显颗粒或者不溶物,非常粘稠或者裂解不充分,可立即用带针头的一次性 5 ml(约 0.9mm 针头) 注射器抽打裂解物 10 次或直到得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 秒),可以剪切 DNA,降低粘稠度和提高产量。

c. 接**操作步骤**项下 3。

3. 室温放置 5 分钟以充分分离核酸蛋白复合物。
4. 加入 200 μ l 氯仿, 剧烈振荡 15 秒。
5. 室温放置 2-3 分钟, 13, 000rpm 离心 10 分钟。
6. 小心取上清(约 600 μ l) 转入到新的离心管, 加入 1.5 倍体积的无水乙醇(必须是室温的, 通常 900 μ l), 涡旋混匀。此时可能出现沉淀,但是不影响提取过程,立即吹打混匀,不要离心, 立刻接下步。
7. 将混合物(每次小于 700 μ l, 多可以分两次加入)加入一个吸附柱 RA 中,(吸附柱放入收集管中) 12,000 rpm 离心 30-60 秒, 弃掉废液。
8. 加 700 μ l 700 μ l Wash Solution 1 (**请先检查是否已加入无水乙醇!**), 12, 000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
9. 加入 500 μ l Wash Solution 2/3 (**请先检查是否已加入无水乙醇!**), 12,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。加入 500 μ l Wash Solution 2/3,重复一遍。
10. 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 13,000 rpm 离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液, 以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
11. 取出吸附柱 RA, 放入一个 RNase free 离心管中, 根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-50 μ l RNase free water (事先在 100 $^{\circ}$ C 水浴中预热效果更好), 室温放置 1 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟。
12. 如果预期 RNA 产量>30 μ g,加 30-50 μ l RNase free water 重复步骤 11, 合并两次洗脱液,或者使用第一次的洗脱液加回到吸附柱重复步骤一遍(如果需要 RNA 浓度高)。

洗脱两遍的 RNA 洗脱液浓度高, 分两次洗脱合并洗脱液的 RNA 产量比前者高 1 5-30%, 但是浓度要低,用户根据需要选择。

附：**microRNA 富集方法**（仅仅提取 **microRNA**，不包含>200 nt 其它总 RNA 成份。）

1. 按照前面标准操作步骤 1—5 操作，直到得到上清。
2. 较精确估计上清体积（约 600 μ l），加入等体积 70% 乙醇（请先检查是否已加入无水乙醇!）（必须是室温的），涡旋或者吹打充分混匀，不要离心。
3. 将混合物加入一个吸附柱 RA 中，（吸附柱放入收集管中）12,000 rpm 离心 30-60 秒，**收集滤过物**。将滤过物从收集管转移到一个新的离心管后，把吸附柱子放回空的收集管内，再加入剩下的混合物，离心，**收集滤过物**。**合并两次滤过物**，计算体积。
此时，滤过物含有 microRNA，吸附柱子上面是除去了 microRNA 的总 RNA（不包含 microRNA），如果需要，可以按照前面标准操作步骤 8—11 操作漂洗，洗脱回收得到去除了 microRNA 的总 RNA。
4. 较精确估计**滤过物体积**，加入 0.65 倍体积无水乙醇（必须是室温的），涡旋或者吹打充分混匀，不要离心。
5. 取一套新的 **microRNA 吸附柱 MA**，将上一步骤混合物(每次小于 700 μ l,多可以分两次加入)加入 **microRNA 吸附柱 MA** 中，（吸附柱放入收集管中）12,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
6. 按照前面标准操作步骤 8—11 操作漂洗，洗脱得到富集的 microRNA。

注意：不同的实验可以选择不同的方法，例如Northern Blot或者表达芯片谱分析可以选择提取包括microRNA的总RNA。富集方法提取的microRNA因为去除了较大片段的mRNA和rRNA等，可能减少某些下游试验的扩增背景，当背景较高或者非特异扩增较多时，可以尝试使用富集方法提取的microRNA。