一站式 miRNA 柱式提取试剂盒

产品编号	规格
MRN1217-50	50 次

保存条件及效期:

常温运输，4℃保存，保存期限一年。

产品描述:

本产品是在 miRNAout 基础上自主开发的柱式升级产品，是目前国内外市场上最快速最简单的小 RNA 分离纯化产品。它具有下列特点:

1. 一步法直接分离纯化小 RNA，比两步法（先分离总 RNA 和再纯化其中的小 RNA）和 PAGE 电泳回收法更简单。得到的小 RNA 长度大部分在 200 nt 以下，包括 5S RNA、tRNA、miRNA、Pre-miRNA、pri-miRNA、siRNA、shRNA 和 snRNA 等。
2. 柱式操作，比 miRNAout 更加简单快捷，整个过程只需要十多分钟。
3. 适用范围广，可以用于动物组织、血液、植物等各种实验材料。
4. 小 RNA 纯净，OD260/280 一般都在 1.9 以上。
5. 产率一般为 20-40 ug/100 mg 动物组织，10-30 ug/100 mg 植物组织。
6. 无基因组 DNA 的污染。
7. 可用于 RT-PCR、miRNA 标记、microarray 等后续实验。

规格及成分:

成 份	50 次包装
溶液 A	25 mL
溶液 B	25 mL
溶液 C	50 mL
离心吸附柱	100 套
通用洗柱液	50 mL
RNA 洗脱液	10 mL
使用手册	1 份

使用方法:

由于离心吸附柱的吸附量限制，本产品每次提取只能处理 100mg 左右的各种组织，可以在 1.5 mL 塑料离心管中。如果处理样品量大，请分成很多相当于微量提取的量进行，最后再收集在一起。

1. 新鲜配制裂解液。将溶液 A 和溶液 B 按 1:1 的比例混合，然后根据组织细胞类型的不同分为下面及种情况使用。注意：溶液 A 和溶液 B 混合后必须立即使用，不要放置，否则会产生沉淀。

a) 对贴壁细胞：吸尽培养液，在每 10 平方厘米细胞中加入 1 mL 新鲜配制的裂解液，用枪轻柔吹打数次，确保细胞全部裂解。

b) 对悬浮细胞：离心收集细胞，吸尽液体，在每 1-5×10^6 悬浮细胞中加入 1 mL 新鲜配制的裂解液，用枪轻柔吹打数次，确保细胞全部裂解。如果是 fibroblasts 或 carcinoma cell，1 mL 新鲜配制的裂解液的细胞使用量不要超过 1×10^6 个细胞。

c) 对新鲜的动物组织：先将剪切成小块新鲜组织或液氮保存的组织放入 10 mL 或 15 mL 塑料离心管中，每 50-100 mg 组织加 1 mL 新鲜配制的裂解液，用匀浆器匀浆 30 秒左右。对肝、脾、胰、肾等细胞分裂十分旺盛的组织（细胞中含大量正在复制的 DNA），建议组织的使用量不要超过 50 mg/ mL 裂解液，否则十分容易产生 DNA 污染。

d) 对新鲜的植物组织：先将剪切成小块新鲜组织或液氮保存的组织放入 10 mL 或 15 mL 塑料离心管中，每 50-100 mg 组织加 1 mL 新鲜配制的裂解液，用匀浆器匀浆 30 秒左右。

e) 对 RNALOCKER 保存动物或植物组织：先用纸吸去 RNALOCKER 液体后再剪切成小块，放入 10 mL 或 15 mL 塑料离心管中，每 50-100 mg 组织加 1 mL 新鲜配制的裂解液，用匀浆器匀浆 30 秒左右。

2. 将裂解物转移至一个干净的 1.5 mL 塑料离心管中,然后加入 0.2 倍体积的自备氯仿(1 mL 裂解物需 0.2 ml 氯仿)，振荡器上充分振荡混均 30 秒。

3. 12000-15000 g 室温离心 3-5 分钟。

4. 将上清液（约 0.6-0.8 mL）转移到一根离心吸附柱中以去除大 RNA（最好标记以跟后面要用的专门吸附小 RNA 的另一离心吸附柱区别开来，本试剂盒提供的离心吸附柱之间没任何区别，可以随机选一个做大 RNA 吸附，另一个做小 RNA 吸附）。注意：离心后下层有机相和中间层含有 DNA 和蛋白质，避免触及，否则将产生蛋白质和 DNA 污染。为保险起见，可以留下 100 uL 上清液不取。同时吸取上清时最好缓慢进行，否则容易吸出交界面的不可见的丝状 DNA。

5. 12000-15000 g 室温离心半分钟，收集管中的穿透液。大 RNA 及 DNA 将与离心吸附柱的膜结合，小 RNA

将存在于穿透液中。但由于离心吸附柱的最大吸附能力为 40 ug 动物 RNA，20 ug 植物 RNA，如果样品中的大 RNA 含量高于上面数值，则穿透液中将同时含有大 RNA 和小 RNA，在此情况下，穿透液需要再次重复上柱以去除大 RNA。由于此时离心吸附柱已经吸附了大 RNA，所以需要预处理（具体步骤见本手册最后的附录）。

6. 在最后得到的不含大 RNA 的穿透液中加等体积的溶液 C，混匀。此时溶液的总体积约 1.5 mL。
7. 先转移约 0.75mL 到一新的离心吸附柱中。注意：不要使用已经使用过的、用来吸附大 RNA 的离心吸附柱。12000-15000 g 室温离心半分钟，弃收集管中的穿透液。
8. 将上步上柱剩余的样品转移到离心吸附柱中，12000-15000 g 室温离心半分钟，弃收集管中的穿透液。
9. 加 0.7mL 通用洗柱液到离心吸附柱中，12000-15000 g 室温离心半分钟，弃穿透液。
10. 加 0.3mL 通用洗柱液到离心吸附柱中，12000-15000 g 室温离心半分钟，弃穿透液。此步一般可以省略。
11. 12000-15000 g 室温离心半分钟以甩出残联液体。此步十分重要，否则残留的通用洗柱液会影响 miRNA 的使用。
12. 将离心吸附柱转移到一自备的 RNase-free 收集管中，加入 50-100 uL RNA 洗脱液。
13. 12000-15000 g 室温离心半分钟，离心管中溶液即为 miRNA 样品，可以立即使用或存放于-80℃待用。

附录：

1. 将结合有大 RNA 和 DNA 的离心吸附柱中加入 0.1mL 自备的超纯水，12000-15000 g 室温离心半分钟，弃收集液。
2. 再加 0.1mL 自备的超纯水，重复上步一次。
3. 将第 5 步的得到、需要进一步去除其中大 RNA 和 DNA 污染的穿透液直接上柱，12000-15000 g 室温离心半分钟，收集穿透液（此穿透液含小 RNA）。

如果大 RNA 已经去干净，可以直接进入第 6 步；如果大 RNA 没有去除干净，则用本附录 1-2 的方法处理离心吸附柱，然后再将此穿透液加入（接本附录第 3 步）。一般样品只需要额外处理一次就可以去除全部的大 RNA 污染。