

AipPure 组织/细胞 miRNA 快速提取试剂盒(离心柱型)

AipPure Tissue/Cell miRNA Rapid Extraction Kit(Centrifugal Column)

使用说明书

◆版本号：231103

◆目录号：MR201

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次(MR201-01)
Lysis/Binding Buffer	4°C(避光)	50mL
70%乙醇	室温	9mL RNase-free Water 第一次使用前按说明加指定量乙醇
Wash Solution 1	室温	12mL 第一次使用前加入 28mL 无水乙醇
Wash Solution 2/3	室温	10mL 第一次使用前加入 42mL 无水乙醇
RNase-free Water	室温	10mL
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

◆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。

◆产品储存：本试剂盒按照指示储存 12 个月不影响使用效果。运输在常温下进行，不影响使用效果。

◆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. 快速简捷，单个样品操作一般可在 30 分钟内完成，也不需要乙醇沉淀等容易丧失

微小分子 RNA 的步骤。

3. 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 等实验。

◆**注意事项：**

1. 70%乙醇、Wash Solution 1 和 Wash Solution 2/3 加入无水乙醇后，可以在常温密封保存。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，吸上清使用即可。
2. 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。
3. 所有的离心步骤均在室温完成，使用转速可以达到 13,000rpm 的传统台式离心机。
4. 需要自备乙醇、氯仿、一次性注射器和研钵等。
5. Lysis/Binding Buffer 和 Wash Solution 1 含有刺激性化合物，操作时需穿防护服并佩戴一次性手套，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。
6. **预防 RNase 污染及实验前的准备：**经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致 RNase 污染。使用 RNase-free 的塑料制品和枪头避免交叉污染。RNA 提取过程中应使用 RNase-free 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 0.5M NaOH 中浸泡 10 分钟，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除 RNase。配制溶液应使用 RNase-free 的水或 DEPC 水(DEPC 水的制备：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)。
7. **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 5kb 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。如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 的提取纯度不纯。

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 和 Wash Solution 2/3 瓶中按照标签提示加入指定量乙醇! 并打钩做好标记避免重复加入!

1. 样本处理

<p>贴壁细胞:</p>	<ol style="list-style-type: none"> 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充分混匀。 接后续操作步骤。
<p>悬浮细胞:</p>	<ol style="list-style-type: none"> 收集 <math>10^7</math> 悬浮细胞到一个 1.5mL 离心管。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。 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。 接后续操作步骤。
<p>动物组织: (例如鼠肝脑)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 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。 可选步骤, 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 5mL(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。 接后续操作步骤。

- 室温放置 5 分钟以充分分离核酸蛋白复合物。
- 加入 200μL 氯仿, 剧烈振荡 15 秒。
- 室温放置 2-3 分钟, 13,000rpm 离心 10 分钟。
- 小心取上清(约 600μL)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, 通常 900μL), 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, 立刻接下一步。
- 将混合物(每次小于 700μL, 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)12,000rpm 离心 30-60 秒, 弃掉废液。

- 加入 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。
- 加入 500 μ L Wash Solution 2/3(请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。再加入 500 μ L Wash Solution 2/3, 重复操作一遍。
- 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 13,000rpm 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。
- 取出吸附柱 RA, 放入新的 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, 12,000rpm 离心 1 分钟, 收集 RNA 溶液, -70 $^{\circ}$ C 保存 RNA, 防止降解。
注 如果预期 RNA 产量>30 μ g, 加 30-50 μ L RNase-free Water 重复步骤 10 操作, 合并两次洗脱液; 如果需要 RNA 浓度高, 可使用第一次的洗脱液重新加回到吸附柱重复步骤操作 10。洗脱两遍的 RNA 洗脱液浓度高, 分两次洗脱合并洗脱液的 RNA 产量高, 比前者高 15-30%, 但是浓度要低, 用户根据实验需要自行选择。

◆附录 1: microRNA 富集方法(仅仅提取 miRNA, 不包含>200nt 其它总 RNA 成份)

- 按照前面标准操作步骤 1-4 操作, 直到得到上清。
- 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!), 涡旋或者吹打充分混匀, 不要离心。
- 将混合物加入一个吸附柱 RA 中, (吸附柱放入收集管中)12,000rpm 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。
注: 此时滤过物含有 microRNA, 吸附柱内溶液是除去了 microRNA 的总 RNA(不包含 microRNA), 如果需要, 可以按照前面标准操作步骤 7-10 操作漂洗, 洗脱回收得到去除了 microRNA 的总 RNA。
- 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!), 涡旋或者吹打充分混匀, 不要离心。
- 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, 混合物量多可以分两次加入)加入 microRNA 吸附柱 MA 中, (吸附柱放入收集管中)12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
- 按照前面标准操作步骤 7-10 操作, 漂洗、洗脱得到富集的 microRNA。
注 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。

◆附录 2: DNA 酶柱上消化(详细请参考 RE280/AipPure DNase I 柱上消化试剂盒)

1. 按照前面所列操作步骤操作，直到做完操作步骤 1-6。
2. 取 45 μ L DNase I Buffer 和 5 μ L RNase-free DNase I 在离心管内轻轻吹打混匀，配制成 DNase I 工作液。

注：处理多个离心柱子要按照比例放大制备工作液。

3. 向吸附柱 RA 中加入 350 μ L Wash Solution 1，12,000rpm 离心 30 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
4. 向吸附柱 RA 中央加入 50 μ L 的 DNase I 工作液，室温(20 $^{\circ}$ C-30 $^{\circ}$ C)放置 15 分钟。

注 直接将工作液滴在膜中央上向膜四周浸润充分和膜接触，不要让工作液滴在 O 型垫圈上，或离心柱管壁上挂壁，或挂在垫圈上不能充分和膜接触。

5. 向吸附柱 RA 中加入 350 μ L Wash Solution 1，12,000rpm 离心 30-60 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
6. 立即接操作步骤 8，完成后续实验步骤。

=====

