

AipPure Plus 组织/细胞 miRNA 快速提取试剂盒(离心柱型)

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

使用说明书

- ◆版本号：231103
- ◆目录号：MR211
- ◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次(MR211-01)
裂解液 MRL	室温	25mL
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
基因组 DNA 清除柱和收集管	室温	50 套
microRNA 吸附柱 RA 和收集管	室温	50 套

- ◆适用范围：适用于组织/细胞/普通植物/外泌体等提取microRNA/包含总RNA。
- ◆产品储存：本试剂盒按照室温储存 12 个月不影响使用效果。不合适的储存于低温（4℃或者-20℃）会造成溶液沉淀，影响使用效果，因此运输和储存均在室温下（15℃-25℃）进行。
- ◆产品介绍：

本试剂盒在我公司领先的 RNA/microRNA 提取技术的基础上，创新性的采用了不用苯酚、氯仿等有毒试剂的技术路线，精心研制而成。传统的 microRNA 提取试剂盒均是采用异硫氰酸胍/苯酚/氯仿(TRIzol 法)加高浓度乙醇硅胶膜吸附小片段 microRNA 的原理方法制成。但是该方法因为使用了有毒的苯酚/氯仿，因其对身体的毒性致癌作用和环境保护的影响受到越来越多的限制。同时 TRIzol 法原理适用范围窄，对于某些样品，提取 microRNA 效果不佳。

本试剂盒配备了独特的通用裂解液，可迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，然后裂解混合物通过基因组 DNA 清除柱，基因组 DNA 被清除而 RNA(包括 microRNA)被选择性滤过。滤过的 RNA 用乙醇调节结合条件后，RNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列特殊漂洗液快速的漂洗—离心的步骤，

将细胞代谢物、蛋白等杂质去除，最后低盐的 RNase-free Water 将纯净的 RNA(包括 microRNA)从硅基质膜上洗脱。

本试剂盒采用分提取操作步骤也可单独纯化富集后的 microRNA 组分和总 RNA(>200 nt)，从而得到分离富集的 microRNA 和 RNA。

◆产品特点：

1. 操作安全，完全不使用有毒的苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 快速简捷，比传统 microRNA 提取试剂盒大大减少了操作时间和步骤。
3. 既可以得到总 RNA(包含了 microRNA)，也可以采用分提取操作步骤单独纯化富集后的 microRNA 组分和总 RNA(>200nt)，从而得到分离富集的 microRNA 和 RNA。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 2.0~2.2，可直接用于 RT-PCR、荧光定量 PCR、Northern-Blot 等相关分子生物学实验。

◆注意事项：

1. 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. 所有的离心步骤均可在室温完成，使用转速可以达到 12,000rpm 的传统台式离心机。
4. 需要自备乙醇，研钵(可选)等。
5. 样品处理量绝对不要超过基因组 DNA 清除柱和 RNA 吸附柱 RA 处理能力，否则造成 DNA 残留或产量降低。开始摸索实验条件时，如果不清楚样品 DNA/RNA 含量时可使用较少的样品处理量，将来根据样品试验情况增加或者减少处理量。
6. 裂解液 MRL 和 Wash Solution 1 中含有刺激性化合物，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。
7. 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)。
8. 关于 DNA 的微量残留：一般说来任何总 RNA 提取试剂在提取过程中无法完全避免 DNA 的微量残留(DNase 消化也无法做到 100%无残留)，该产品由于采取了本公

司独特的缓冲体系和基因组 DNA 清除柱技术，绝大多数 DNA 已经被清除，个别特殊情况需要清除微量基因组 DNA 残留，可使用以下几种 DNA 酶消化的方式。

- 1)传统 DNA 酶消化提取的 RNA/microRNA，热灭活 DNA 酶后直接用于后续实验。
- 2)传统 DNA 酶消化提取的 RNA/microRNA，然后按照 AipPure 增强型 RNA 清洁纯化试剂盒(含小 RNA)(货号：RE282)纯化回收后，用于后续实验。
- 3)直接在吸附柱 RA 上进行 DNase I 柱上消化处理。可购买爱普科学的 AipPure DNase I 柱上消化试剂盒(RNase-free)(货号：RE280)，但是需将说明书的去蛋白液 RW1 改成 Wash Solution 1，可先索取具体操作说明书。

◆操作步骤(提取包含 microRNA 的总 RNA):

提示：第一次使用前请先在 Wash Solution 1 和 Wash Solution 2/3 瓶中按照标签提示加入指定量无水乙醇！并打钩做好标记避免重复加入！

1. 样品处理

<p>贴壁细胞:</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 不需胰酶消化，彻底吸干净培养液体后直接加 500μL(<8*10⁶ 个细胞)裂解液 MRL 反复吹打裂解细胞。不方便直接裂解的培养容器，可以用细胞刮子刮下细胞，或胰蛋白酶消化后吹打下来收集细胞到 1.5mL 离心管内离心，彻底弃上清后加 500μL(<8*10⁶ 个细胞)裂解液 MRL 涡旋振荡或者用移液枪吸头吹打裂解细胞。 2. 接后续操作步骤。
<p>悬浮细胞:</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 直接离心收集细胞，12,000rpm 离心 15 秒，使细胞沉淀下来，彻底去上清后直接加入 500μL(<8*10⁶ 个细胞)裂解液 MRL 涡旋振荡或者用移液枪吸头吹打裂解细胞。 2. 接后续操作步骤。
<p>动物组织: (例如鼠肝脏)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 匀浆处理：取 10-25mg 新鲜组织加入 500μL 裂解液 MRL 后，使用玻璃匀浆器或电动匀浆器进行匀浆，至无明显组织块即可。 2. 液氮研磨：在液氮中研磨组织成细粉后，取适量组织细粉(10-25mg)转入装有 500μL 裂解液 MRL 的 1.5mL 离心管中，涡旋振荡直至无明显粉末团即可。 3. 接后续操作步骤。
<p>普通植物:</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 取 500μL 裂解液 MRL，转入 1.5mL 离心管中。 2. 液氮中研磨适量植物组织成细粉后，取 50mg-100mg 细粉转入上述装有 MRL 的离心管中，立即剧烈振荡 20 秒，充分裂解样本。 3. 用吸头吹打混匀帮助裂解或者剧烈涡旋震荡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。 4. 将裂解物 12,000rpm 离心 5-10 分钟，沉淀不能裂解的碎片。 5. 接后续操作步骤。

2. 将前面步骤得到的裂解匀浆液或者离心后的上清全部加到基因组 DNA 清除柱上(清除柱放在收集管内)。立即 12,000rpm 离心 1 分钟, 收集滤液(RNA/microRNA 在滤液中)。
3. 用微量移液器较精确估计滤过液体积(480 μ L 左右, 滤过时损失体积应该减去), 加入 1.25 倍体积的无水乙醇, 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。
4. 立刻将混合物(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)12,000rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
注: 确保离心后液体全部滤过, 膜上没有残留, 如有必要, 可以加大离心力和离心时间。
5. 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。
6. 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。加入 500 μ L Wash Solution 2/3, 重复操作一遍。
7. 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 12,000rpm 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。
8. 取出吸附柱 RA, 放入一个 1.5mL 新离心管中, 根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-50 μ L RNase-free Water, 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 相对富集方法(microRNA/去除了 microRNA 的总 RNA 分别提取)

提示: 第一次使用前请先在 Wash Solution 1 和 Wash Solution 2/3 瓶中按照标签提示加入指定量无水乙醇! 并打钩做好标记避免重复加入!

1. 首先按照步骤 1 操作, 准备好裂解匀浆液或者离心后的上清。
2. 在裂解匀浆液或离心后的上清加入一半体积的无水乙醇(0.5 体积), 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。
3. 将混合物(每次小于 720 μ L, 多可以分两次加入)加入一个基因组 DNA 清除柱中, (清除柱放入收集管中)12,000rpm 离心 2 分钟, 保留滤液(microRNA 在滤液中)。

注: 此时滤过液含有 microRNA, 基因组 DNA 清除柱内溶液是去除了 microRNA

的总 RNA(不包含 microRNA), 如果需要, 可以按照前面标准操作步骤 5-8 操作, 漂洗、洗脱回收得到去除了 microRNA 的总 RNA。

4. 用微量移液器较精确估计滤过液体积, 加入等体积无水乙醇(必须是室温!), 涡旋或者吹打充分混匀, 不要离心。
5. 立刻将混合物(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)12,000rpm 离心 2 分钟, 弃掉废液。

注: 确保离心后液体全部滤过, 膜上没有残留, 如有必要, 可以加大离心力和离心时间。

6. 按照前面标准操作步骤 5-8 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。相对富集方法提取的 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, 可以尝试使用相对富集方法提取的 microRNA。总的原则是首选提取使用总 RNA(包含了 microRNA)做实验, 只有确实使用总 RNA(包含 microRNA)效果不佳的时候, 或者实验设计要求必须富集分离 microRNA 和 mRNA, 才尝试采用富集 microRNA 的方法。

◆附录 2: DNA 酶柱上消化(详情请参考 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 1-4。
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 6, 完成后续实验步骤。

=====



扫码关注