



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<sub>Amisi</sub> microRNA 快速提取试剂盒

目录号: **RN05**

| 目录编号          | 包装单位       |
|---------------|------------|
| <b>RN0501</b> | <b>50次</b> |

❖ **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  |
|---------------------------------------|--------|---|
| <b>Lysis/Binding buffer</b>           | 4°C 避光 | <b>50 ml</b>  |
| <b>70%乙醇</b>                          | 室温     | <b>9ml RNase-free H<sub>2</sub>O</b><br>第一次使用前按说明加指定量乙醇 |
| <b>Wash Solution 1</b>                | 室温     | <b>12 ml</b><br>第一次使用前加入 <b>28ml</b> 无水乙醇               |
| <b>Wash Solution 2/3</b>              | 室温     | <b>10 ml</b><br>第一次使用前加入 <b>42ml</b> 无水乙醇               |
| <b>RNase-free H<sub>2</sub>O</b>      | 室温     | <b>10 ml</b>  |
| 吸附柱 <b>RA</b> 和收集管                    | 室温     | <b>50 套</b>   |
| <b>microRNA</b> 吸附柱 <b>MA</b><br>和收集管 | 室温     | <b>50 套</b>   |

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/ $\beta$ -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，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ l 700 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ g,加 30-50 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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。