

miRNA 纯化试剂盒说明书

产品组成

miRNA 纯化试剂盒	5 次样品	50 次制备
Cat. No.	5007005	5007050
过滤柱	5 套	50 套
核酸纯化柱	5 套	50 套
Buffer TL	5.5 ml	55 ml
Buffer EX	1.2 ml	12 ml
Buffer WAM (浓缩液)	2 ml	20 ml
Buffer WBR (浓缩液)	1.5 ml	15 ml
RNase-free Water	1.5 ml	2 ml×4
说明书	1 份	1 份

产品储存

Buffer TL 请置于 2~8°C 贮存，其他试剂和物品储存于常温 (0~30°C)，可在两年内保持使用性能无明显变化。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：
400-0099-857。

产品介绍

本产品适合从各种不同来源的样本中分离纯化 miRNA。试剂盒采用柱纯化技术，高效筛选获取高纯度的 small RNA (<200 nt)，适用于 Northern Blot、Dot Blot、polyA 筛选、体外翻译、RNase 保护和分子克隆等分子生物学实验。

用户需自备的试剂与物品

1. 无水乙醇
2. RNase-free 的 1.5 ml 离心管或 2 ml 离心管
3. 移液器及吸头 (为避免 RNA 酶的污染, 请选用含有滤芯的 RNase-free 移液器吸头)
4. 配有 21-25 号针头的注射器
5. 乳胶手套、一次性口罩等防护用品和纸巾
6. 台式小量离心机 (可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子)
7. 旋涡振荡器
8. 不使用 RNA 酶的实验室

使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能, 请将温度设置到 25°C。
2. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WAM 和 Buffer WBR 中加入无水乙醇, 并在标签的方框中打勾做好“乙醇已加”的标记。
3. 因为唾液、皮肤上均含有 RNA 酶, 所以 RNA 提取的全过程都需要戴乳胶手套和口罩。

操作步骤 (miRNA 提取步骤) :

1. 不同来源样品的处理：

人或动物组织：

在研钵中用液氮将约 300~500 mg 组织研磨至粉末状，用液氮预冷过的 1.5 ml 离心管称取 50~100 mg 人或动物组织，加入 1 ml Buffer TL。用装有 21-25 号针头的注射器反复吸打 8~10 次（注意将针头保持在液面之下，以减少泡沫的产生），进入步骤 2 的操作。

* 尽量在组织粉末尚未融化前加入 Buffer TL，以减少组织内源性的 RNA 酶对 RNA 的降解。

* 如果组织样品较少(≤ 100 mg)且不易分散，可先在研钵中加液氮将组织研磨成粉末状，然后直接加 1 ml Buffer TL 至研钵中，再继续研磨约 30 秒使研钵中的组织溶解到 Buffer TL 中，吸取匀浆液至一个 1.5 ml 离心管中，用装有 21-25 号针头的注射器反复吸打 8-10 次（注意将针头保持在液面之下，以减少泡沫的产生），进入步骤 2 的操作。

培养的动物细胞：

贴壁培养的细胞：每 10 cm² 培养细胞中加入 1 ml Buffer TL（比如直径为 3.5 cm 细胞培养皿，弃尽培养基后，直接加入 1 ml Buffer TL），勿弃吸头，直接用吸头吸打细胞数次使细胞溶解，吸取匀浆液转移到一个 1.5 ml 离心管中，进入步骤 2 的操作。

悬浮培养的细胞：用 1.5 ml 离心管离心收集 $5\sim 10 \times 10^6$ 细胞，加 100 μ l PBS 溶液，旋涡振荡直至细胞全部悬浮，加入 1 ml Buffer TL，勿弃吸头，直接用吸头吸打细胞数次使细胞溶解，进入步骤 2 的操作。

植物组织 / 植物细胞 / 酵母 / 细菌：

在研钵中用液氮将约 300~500 mg 样品研磨至粉末状，再用液氮预冷的 1.5 ml 离心管称取约 100 mg 研磨成粉末状的组织，加入 1 ml Buffer TL，勿弃吸头，直接用吸头吸打数次使样品溶解，进入步骤 2 的操作。

2. 可选步骤：如样品中含有较多蛋白质，脂肪，多糖或胞外物质（肌肉，植物结节部分等）可于 12000 rpm 离心 5 分钟，取上清。离心得到的沉淀中包括细胞外膜，多糖，高分子量 DNA，上清中含有 RNA。处理脂肪组织时，上层有大量油脂应去除，取离心后澄清的溶液进入下一步操作。

3. 加入 200 μ l Buffer EX，盖上管盖，用力摇晃 15 秒，12000 rpm 离心 15 分钟。

4. 吸取 500 μ l 上层水相，转移到一个洁净的 1.5 ml 离心管中，加入 215 μ l 无水乙醇，勿弃吸头，直接用吸头吸注三次混匀，将混合液全部转移到过滤柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

5. 弃过滤柱，在滤液中加入 780 μ l 无水乙醇，勿弃吸头，直接用吸头吸注三次混匀，吸取 730 μ l 混合液加入到核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

6. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，将步骤 5 中剩余的液体全部倒入核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

7. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 700 μ l Buffer WAM，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WAM 中已经加入无水乙醇。

8. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 750 μ l Buffer WBR，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

9. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

10. 弃 2 ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个 RNase-free 的 1.5 ml 离心管中，在纯化柱中加入 30~50 μ l RNase-free Water，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

11. 弃纯化柱，洗脱的 RNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 RNA 储存于 -70°C 以下备用。

操作步骤（大片段 RNA 和 miRNA 共同提取步骤）：

1. 不同来源样品的处理：

人或动物组织：

在研钵中用液氮将约 300~500 mg 组织研磨至粉末状，用液氮预冷过的 1.5 ml 离心管称取 50~100 mg 人或动物组织，加入 1 ml Buffer TL。用装有 21-25 号针头的注射器反复吸打 8~10 次（注意将针头保持在液面之下，以减少泡沫的产生），进入步骤 2 的操作。

* 尽量在组织粉末尚未融化前加入 Buffer TL，以减少组织内源性的 RNA 酶对 RNA 的降解。

* 如果组织样品较少(≤ 100 mg)且不易分散，可先在研钵中加液氮将组织研磨成粉末状，然后直接加 1 ml Buffer TL 至研钵中，再继续研磨约 30 秒使研钵中的组织溶解到 Buffer TL 中，吸取匀浆液至一个 1.5 ml 离心管中，用装有 21-25 号针头的注射器反复吸打 8~10 次（注意将针头保持在液面之下，以减少泡沫的产生），进入步骤 2 的操作。

培养的动物细胞：

贴壁培养的细胞：每 10 cm² 培养细胞中加入 1 ml Buffer TL（比如直径为 3.5 cm 细胞培养皿，弃尽培养基后，直接加入 1 ml Buffer TL），勿弃吸头，直接用吸头吸打细胞数次使细胞溶解，吸取匀浆液转移到一个 1.5 ml 离心管中，进入步骤 2 的操作。

悬浮培养的细胞：用 1.5 ml 离心管离心收集 5~10 $\times 10^6$ 细胞，加 100 μ l PBS 溶液，旋涡振荡直至细胞全部悬浮，加入 1 ml Buffer TL，勿弃吸头，直接用吸头吸打细胞数次使细胞溶解，进入步骤 2 的操作。

植物组织 / 植物细胞 / 酵母 / 细菌：

在研钵中用液氮将约 300~500 mg 样品研磨至粉末状，再用液氮预冷的 1.5 ml 离心管称取约 100 mg 研磨成粉末状的组织，加入 1 ml Buffer TL，勿弃吸头，直接用吸头吸打数次使样品溶解，进入步骤 2 的操作。

2. 可选步骤：如样品中含有较多蛋白质，脂肪，多糖或胞外物质（肌肉，植物结节部分等）可于 12000 rpm 离心 5 分钟，取上清。离心得到的沉淀中包括细胞外膜，多糖，高分子量 DNA，上清中含有 RNA。处理脂肪组织时，上层有大量油脂应去除，取离心后澄清的溶液进入下一步操作。

3. 加入 200 μ l Buffer EX，盖上管盖，用力摇晃 15 秒，12000 rpm 离心 15 分钟。

4. 吸取 500 μ l 上层水相，转移到一个洁净的 2 ml 离心管（自备）中，加入 1 ml 无水乙醇，勿弃吸头，直接用吸头吸注三次混匀，吸取 750 μ l 混合液加入到核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

5. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，将步骤 4 中剩余的液体全部倒入核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

6. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 700 μ l Buffer WAM，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WAM 中已经加入无水乙醇。

7. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，在核酸纯化柱中加入 750 μ l Buffer WBR，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

8. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

9. 弃 2 ml 离心管，将核酸纯化柱置于一个 RNase-free 的 1.5 ml 离心管中，在纯化柱中加入 50~100 μ l RNase-free Water，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

10. 弃纯化柱，洗脱的 RNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 RNA 储存于 -70°C 以下备用。

操作步骤（大片段 RNA 和 miRNA 分开提取步骤）：

1. 不同来源样品的处理：

人或动物组织：

在研钵中用液氮将约 300~500 mg 组织研磨至粉末状，用液氮预冷过的 1.5 ml 离心管称取 50~100 mg 人或动物组织，加入 1 ml Buffer TL。用装有 21-25 号针头的注射器反复吸打 8~10 次（注意将针头保持在液面之下，以减少泡沫的产生），进入步骤 2 的操作。

* 尽量在组织粉末尚未融化前加入 Buffer TL，以减少组织内源性的 RNA 酶对 RNA 的降解。

* 如果组织样品较少(≤ 100 mg)且不易分散，可先在研钵中加液氮将组织研磨成粉末状，然后直接加 1 ml Buffer TL 至研钵中，再继续研磨约 30 秒使研钵中的组织溶解到 Buffer TL 中，吸取匀浆液至一个 1.5 ml 离心管中，用装有 21-25 号针头的注射器反复吸打 8-10 次（注意将针头保持在液面之下，以减少泡沫的产生），进入步骤 2 的操作。

培养的动物细胞：

贴壁培养的细胞：每 10 cm² 培养细胞中加入 1 ml Buffer TL（比如直径为 3.5 cm 细胞培养皿，弃尽培养基后，直接加入 1 ml Buffer TL），勿弃吸头，直接用吸头吸打细胞数次使细胞溶解，吸取匀浆液转移到一个 1.5 ml 离心管中，进入步骤 2 的操作。

悬浮培养的细胞：用 1.5 ml 离心管离心收集 5~10 $\times 10^6$ 细胞，加 100 μ l PBS 溶液，旋涡振荡直至细胞全部悬浮，加入 1 ml Buffer TL，勿弃吸头，直接用吸头吸打细胞数次使细胞溶解，进入步骤 2 的操作。

植物组织 / 植物细胞 / 酵母 / 细菌：

在研钵中用液氮将约 300~500 mg 样品研磨至粉末状，再用液氮预冷的 1.5 ml 离心管称取约 100 mg 研磨成粉末状的组织，加入 1 ml Buffer TL，勿弃吸头，直接用吸头吸打数次使样品溶解，进入步骤 2 的操作。

2. 可选步骤：如样品中含有较多蛋白质，脂肪，多糖或胞外物质（肌肉，植物结节部分等）可于 12000 rpm 离心 5 分钟，取上清。离心得到的沉淀中包括细胞外膜，多糖，高分子量 DNA，上清中含有 RNA。处理脂肪组织时，上层有大量油脂应去除，取离心后澄清的溶液进入下一步操作。

3. 加入 200 μ l Buffer EX，盖上管盖，用力摇晃 15 秒，12000 rpm 离心 15 分钟。

4. 吸取 500 μ l 上层水相，转移到一个洁净的 1.5 ml 离心管中，加入 215 μ l 无水乙醇，勿弃吸头，直接用吸头吸注三次混匀，将混合液全部转移到过滤柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。此时过滤柱上会吸附有大片段 RNA，放置一边待用。

5. 在滤液中加入 780 μ l 无水乙醇，勿弃吸头，直接用吸头吸注三次混匀，吸取 750 μ l 混合液加入到核酸纯化柱中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

6. 弃滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，将步骤 5 中剩余的液体全部倒入核酸纯化柱中（倒完液体的 2 ml 离心管不要丢弃，将步骤 4 的过滤柱置于其中，进入步骤 7 操作），盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

7. 将核酸纯化柱置回到 2 ml 离心管中，在过滤柱和核酸纯化柱中分别加入 500 μ l Buffer WAM，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WAM 中已经加入无水乙醇。

8. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将过滤柱和核酸纯化柱分别置回到 2 ml 离心管中，分别加入 600 μ l Buffer WBR，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

9. 弃 2 ml 离心管中的滤液，将过滤柱和核酸纯化柱分别置回到 2 ml 离心管中，14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的实验效果。

10. 弃 2 ml 离心管，将过滤柱和核酸纯化柱分别置于一个 RNase-free 的 1.5 ml 离心管中，在过滤柱中加入 50~100 μ l RNase-free Water，在纯化柱中加入 30~50 μ l RNase-free Water，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免管盖脱落而损伤离心机。

11. 弃过滤柱和纯化柱，洗脱的 RNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 RNA 储存于 -70°C 以下备用。