

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℃贮存，其他试剂和物品储存于常温（0~30℃），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℃。
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 5~10×10⁶ 细胞，加 100 μl 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 μl Buffer EX，盖上管盖，用力摇晃 15 秒，12000 rpm 离心 15 分钟。

4. 吸取 500 μl 上层水相，转移到一个洁净的 1.5 ml 离心管中，加入 215 μl 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 μl 无水乙醇，勿弃吸头，直接用吸头吸注三次混匀，吸取 730 μl 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 μl 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 μl 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 μl 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℃ 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 5~10×10⁶ 细胞，加 100 μl 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 μl Buffer EX，盖上管盖，用力摇晃 15 秒，12000 rpm 离心 15 分钟。

4. 吸取 500 μl 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 μl 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 μl 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 μl 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 μl 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℃ 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 5~10×10⁶ 细胞，加 100 μl 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 μl Buffer EX，盖上管盖，用力摇晃 15 秒，12000 rpm 离心 15 分钟。

4. 吸取 500 μl 上层水相，转移到一个洁净的 1.5 ml 离心管中，加入 215 μl 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 μl 无水乙醇，勿弃吸头，直接用吸头吸注三次混匀，吸取 750 μl 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 μl 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 μl 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 μl RNase-free Water，在纯化柱中加入 30~50 μl 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 8000rpm 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。