

M5 HiPer Animal microRNA Extraction Kit

动物 microRNA 提取试剂盒 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer Animal microRNA Extraction Kit	50T	MF044-01

【储存条件】

本试剂盒请严格按照说明书指示温度保存，储存 6 个月不影响使用效果。漂洗液 A 和漂洗液 B/C 加入无水乙醇后，可以在常温保存。漂洗液 B/C 可能加入乙醇使用几天后出现沉淀晶体，吸上清使用就可以，不影响使用。

【产品简介】

近年来因为对 RNA 干扰和调节性小 RNA 的广泛深入研究，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，以及调控它们的 circRNA）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，而酚/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。

【产品特色】

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用 Whatman 特制吸附膜，柱与柱之间吸附量差异极小，可重复性好。
2. 不需要乙醇沉淀等容易丧失微小分子 RNA 的步骤，快速方便，一般可在 25-30 分钟内完成。
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 和各种实验。

【产品组份】

	50T	注意事项
Lysis/Binding Buffer	50ml	4 度避光保存
漂洗液 A	12ml	初次使用前请按瓶标说明加入指定量的无水乙醇
漂洗液 B/C	10ml	初次使用前请按瓶标说明加入指定量的无水乙醇
RNase-Free H ₂ O	10ml	室温密闭干燥保存
RNase-Free 吸附套管(RA)	50 套	室温密闭干燥保存
microRNA 吸附套管 (MA)	50 套	室温密闭干燥保存

【注意事项】

1. 所有的离心步骤均在室温完成（4℃ 离心也可以），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。
2. 需要自备乙醇（尽量新开封或者 RNA 专用），氯仿，一次性注射器，研钵。
3. Lysis/Binding Buffer、漂洗液 A 中含有刺激性化合物，**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。**
4. 样品处理量绝对不要超过基因组清除柱 DA 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。
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 RLT 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 2.1-2.2 之间 (100%纯的 RNA 比值一般是 2.2, 我们的产品标准一般可以达到 2.1-2.2)。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)】

<实验前请先阅读注意事项, 第一次使用前请先在漂洗液 A, 漂洗液 B/C 中加入指定量的无水乙醇!>

1. 组织培养细胞

- 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。)
- 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。
- 接操作步骤项下 3。

2. 动物组织 (例如鼠肝脏)

- 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, 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。
- 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 200μl 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 600μl) 转入到新的离心管, 加入 1.5 倍体积的无水乙醇 (必须是室温的, 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, 立刻接下步。

7. 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) 12,000 rpm 离心 30-60 秒, 弃掉废液。

8. 加 700μl 漂洗液 A (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 500μl 漂洗液 B/C (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 500μl 漂洗液 B/C, 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 30-50μl RNase-Free H₂O (事先在 100°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 μ g,加 30-50 μ l RNase-Free H₂O 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 15-30%, 但是浓度要低,用户根据需要选择>。

【microRNA 富集方法（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 μ l），加入一半体积（0.5 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。
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 μ l, 如果液体多可以分两次加入)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。

【其他说明】

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。



【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。