

产品组分

组分名称	组分编号	规格	保存条件
		50 RXN	
Buffer LB	RM30279	50 mL	4°C避光
Buffer PR3*	RM30278	12 mL	RT
Buffer WB3**	RM30280	10 mL	RT
RNA Adsorption Column and Collection Tubes***	RM30281	50 pk	RT
miRNA Adsorption Column and Collection Tubes***	RM30282	50 pk	RT
RNase-free H ₂ O	RM30142	10 mL	RT

*注: 50 RXN Buffer PR3使用前加入28 mL无水乙醇。

**注: 50 RXN Buffer WB3使用前加入42 mL无水乙醇。

***注: 本试剂盒提供RNA吸附柱和miRNA吸附柱, 分别适用于总RNA提取和microRNA富集。

产品说明

本试剂盒适用于快速提取各种细胞组织的 microRNA 和其它小 RNA, 采用独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶, 有机抽提去除蛋白和 DNA, 离心柱内特殊硅基质膜可吸附总 RNA、microRNA 和其他各种小 RNA, 再通过一系列快速的漂洗-离心的步骤, 进一步去除细胞代谢物、蛋白等杂质, 最后使用低盐的洗脱液从硅基质膜上洗脱得到纯净 RNA。

保存条件

Buffer LB: 4°C避光保存; 其他试剂: 室温保存。本试剂按照说明储存 18 个月不影响使用效果。

注意事项

1. Buffer WB3 加入乙醇使用几天后可能出现沉淀晶体, 并不影响使用, 直接吸上清使用即可。
2. 各溶液使用后应及时盖紧盖子, 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化。
3. 所有的离心步骤均在室温完成, 使用转速可达到 13,000 rpm 的离心机。
4. Buffer LB 和 Buffer PR3 含有刺激性化合物, 操作时需戴乳胶手套, 避免沾染皮肤, 眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时, 用大量清水或者生理盐水冲洗。
5. 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 去除了较大片段的 mRNA 和 rRNA 等, 可减少某些下游试验的扩增背景, 只有当背景较高或者非特异扩增较多时, 才尝试使用富集方法提取的 microRNA。

操作说明 (请先阅读注意事项)

实验准备

1. 自备材料: 无水乙醇, 氯仿。
2. 第一次使用前请先在 Buffer PR3 瓶和 Buffer WB3 瓶中加入指定量乙醇, 加入后请及时标记以免多次加入!

样品处理

1. **悬浮细胞:** 收集细胞, 完全吸弃培养液, 轻弹管壁将细胞沉淀完全松散重悬, 每 5×10^6 - 1×10^7 个细胞加入 1 mL Buffer LB, 涡旋或者吹打, 充分裂解混匀。

贴壁细胞: 尽可能吸干净所有培养液残留, 每 10 cm² 的培养皿加入 1 mL 的 Buffer LB, 迅速轻摇使 Buffer LB 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。

注: 贴壁细胞往往不能完全从培养瓶(皿)脱落, 这并不意味着裂解不完全。此时, 细胞膜实际已完全裂开并释放 RNA, 继续后续实验即可。

动植物组织: 用解剖刀将新鲜组织迅速切成小碎块, 根据处理组织的质量, 每 50-100 mg 组织加入 1 mL Buffer LB 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 50-100 mg) 转入装有 1 mL Buffer LB 的 1.5 mL 离心管中, 剧烈吹打涡旋混匀成匀浆。

2. 室温放置 5 分钟以充分分离核酸蛋白复合物。
3. 加入 200 μL 氯仿，剧烈振荡 15 秒。
4. 室温放置 2-3 分钟，13,000 rpm 离心 10 分钟。
5. 小心吸取上清（约 600 μL ），转入至新的离心管。

总 RNA 提取（提取包含 microRNA 的总 RNA）

1. 向上清中加入 1.5 倍体积的**室温保存**的无水乙醇（通常 900 μL ），涡旋混匀。
注：此时可能出现沉淀，但是不影响提取过程，立即吹打混匀。
2. 将混合物（每次小于 700 μL ，可分次加入）加入一个 **RNA 吸附柱**中（吸附柱放入收集管中），12,000 rpm 离心 30-60 秒，**弃掉废液**。
3. 加 700 μL Buffer PR3（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），12,000rpm 离心 30 秒，**弃掉废液**。
4. 加入 500 μL Buffer WB3（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），12,000 rpm 离心 30 秒，**弃掉废液**。
5. 重复步骤 4。
6. 将 **RNA 吸附柱**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。
7. 取出 **RNA 吸附柱**，放入一个 RNase-free 离心管中，在**吸附膜的中间部位**加 30-50 μL RNase-free H_2O ，室温放置 1 分钟，13,000 rpm 离心 1 分钟。
注：可通过以下方式提高回收产量：（1）100°C 预热 RNase-free H_2O ；（2）将 RNA 滤液再次上柱，室温放置 2 min 后洗脱。
8. RNA 溶液可置于 -80°C 长期保存。

microRNA 富集（仅提取 microRNA，不包含 >200 nt 其它 RNA）

1. 向上清中加入 0.5 倍体积**室温保存**的无水乙醇，涡旋或者吹打充分混匀。
2. 将混合物（每次小于 700 μL ，可分次加入）加入一个 **RNA 吸附柱**中（吸附柱放入收集管中），13,000 rpm 离心 30-60 秒，**收集滤液**。
注：滤过物含有 microRNA，吸附柱上面是除去了 microRNA 的总 RNA（不包含 microRNA），可按照【总 RNA 提取】操作步骤 3 - 7 操作，洗脱回收得到去除了 microRNA 的总 RNA。
3. 合并滤液，估计滤液体积，加入 0.65 倍体积**室温保存**的无水乙醇，涡旋或者吹打充分混匀。
4. 将上一步混合物（每次小于 700 μL ，可分次加入）加入 **microRNA 吸附柱**中（吸附柱放入收集管中），13,000 rpm 离心 30 秒，**弃掉废液**。
5. 加入 700 μL Buffer PR3（**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 μL Buffer WB3（**请先检查是否已加入无水乙醇!**），12,000 rpm 离心 30 秒，**弃掉废液**。
7. 重复步骤 6。
8. 将 **microRNA 吸附柱**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。
9. 取出 **microRNA 吸附柱**，放入一个 RNase-free 离心管中，在**吸附膜的中间部位**加 30-50 μL RNase-free H_2O ，室温放置 1 分钟，13,000 rpm 离心 1 分钟。
注：可通过以下方式提高回收产量：（1）100°C 预热 RNase-free H_2O ；（2）将 RNA 滤液再次上柱，室温放置 2 min 后洗脱。
10. RNA 溶液可置于 -80°C 长期保存。