

Universal miRNA Extraction Mini Kit

通用型小分子 RNA 小提试剂盒

本产品适合于从 $\leq 1 \times 10^7$ 个培养细胞、 $\leq 50\text{mg}$ 动物软组织(肝脏、脾脏、肾脏, 脑等)样品中提取小分子 RNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术, 配合独特的溶液体系, 有效增强对小分子 RNA 的吸附。试剂盒在 1 小时内可完成一轮实验, 得到的 RNA 可直接用于 Northern Blot 及体外翻译等下游实验。

产品组份

产品编号	RNU461-01	RNU461-02	RNU461-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
NA Extraction Mini Columns	20	100	500
2ml Collection Tubes	20	100	500
MaBol Reagent	12 ml	55 ml	255 ml
Buffer W1R	6 ml	30 ml	140 ml
Buffer W2R*	3 ml	15 ml	2 x 40 ml
RNase Free Water	1.5 ml	10 ml	50 ml

保存条件

本产品除 MaBol Reagent 外, 可在室温($15\sim 25^\circ\text{C}$)保存 12 个月。因 RNase Free Water 不含抑菌剂, 室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。推荐分装并保存于 $2\sim 8^\circ\text{C}$, 以减少污染。

准备事项

- Buffer W2R 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。

实验步骤

样品前处理

1. **A.** 将组织样品进行液氮研磨，称取 $\leq 50\text{mg}$ 组织样品，加入 1ml MaBol Reagent，高速涡旋 20~60 秒打散样品，室温放置 5 分钟。

样品可用液氮研磨、机械/玻璃匀浆器、珠磨仪等工具进行匀浆。之后 $14,000 \times g$ 离心 5 分钟。按第 2 步进行操作。

- B.** 取 10^6 细胞沉淀，加入 1ml MaBol Reagent，涡旋或用移液枪吸打打散细胞，室温放置 5 分钟。

若样品为白细胞沉淀，分离得到白细胞沉淀的血液用量应少于 1.5ml。

2. 加入 $200\mu\text{l}$ 氯仿至裂解液中，用手剧烈震荡混匀，室温静置 5 分钟。
3. 于 4°C ， $13,000 \times g$ 离心 15 分钟，转移上清至新的离心管中。

注意避免吸入中间层或下层液体造成污染。

4. 用移液枪量取上清体积，加入 0.42 倍体积的无水乙醇到上清液中，涡旋混匀 15 秒。
5. 把 NA Extraction Mini Columns 装在 2ml 收集管中。把第 4 步的混合液转移至过滤柱中。 $13,000 \times g$ 离心 1 分钟，弃去柱子，保留滤液。

若需要提取总 RNA，保留该步柱子放于新的 2ml 收集管后跳至第 9 步操作，结束后即可获得总 RNA。

6. 量取滤液体积，加入 0.76 倍体积的无水乙醇至滤液中，吹打混匀。
7. 把新的 NA Extraction Mini Columns 装在新的 2ml 收集管中。转移第 6 步中获得的 $\leq 750\mu\text{l}$ 混合液至柱子中。 $12,000 \times g$ 离心 30 秒。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。转移剩余混合液至柱子。 $12,000 \times g$ 离心 30 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 $500\mu\text{l}$ Buffer W1R 至柱子上。 $13,000 \times g$ 离心 10 秒。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 $600\mu\text{l}$ Buffer W2R 至柱子中， $13,000 \times g$ 离心 10 秒。

11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。加入 600 μ l Buffer W2R 至柱子中，13,000 \times g 离心 10 秒。
12. 倒弃滤液，把柱子装回收集管。13,000 \times g 离心 2 分钟。

该步骤去除 RNA 柱中残留的乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应。当洗脱体积低于 50 μ l 时，该步骤结束后应打开 RNA 柱盖子于室温空气干燥 10 分钟后再进行洗脱，避免乙醇残留对酶促反应的影响。
13. 将柱子转移至 1.5ml 离心管。加入 30~100 μ l RNase Free Water 至柱子膜中央。室温静置 2 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。

柱子最小的洗脱体积是 30 μ l，若对产量要求较高，推荐进行第二次洗脱，将洗脱液重新加至柱子膜中央，室温静置 3 分钟，13,000 \times g 离心 1 分钟。
14. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

常见问题

1. 柱子堵塞

- **样品用量太多：**加入氯仿后未充分振荡混匀。
- **离心不充分：**延长裂解液的离心时间以去除高分子量杂质。

2. RNA 产量低

- **洗脱不充分：**RNase Free Water 需直接加到膜上，并静置 2 分钟后再离心，进行第二步洗脱以提高产量。

3. 需要获得包含总 RNA 在内的所有 RNA。

在第 4 步操作中直接加入 1.5 倍体积的无水乙醇，混匀过柱后保留柱子从第 9 步开始操作即可回收样品中所有 RNA。