



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com



版本号: 2024-08-1

## MicroRNA提取试剂盒

### MicroRNA Kit

目录号: ZP438

试剂盒组成	ZP438-1 50次	备注
裂解液R	50ml	
去蛋白液M	30ml	
漂洗液RW	15ml	使用前添加55ml无水乙醇
RNA吸附柱	50T	
miRNA微柱	50T	
2ml 收集管	100T	
RNase-free ddH2O	15ml	
说明书	1	

#### ■ 储存条件

裂解液R于2-8°C避光保存；其余试剂常温保存。

#### ■ 自备材料

无水乙醇；三氯甲烷（氯仿）；1.5 mlRNase-free离心管；RNase-free枪头；  
12,000 rpm常温离心机；12,000 rpm低温离心机。

实验室使用，仅用于科研

北京庄盟国际生物基因科技有限公司  
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.



## ■ 产品简介

MicroRNA (miRNA) 是一类长度约为22 个核苷酸的非编码单链RNA分子，一般的总RNA提取试剂盒，非常容易丢失长度小于200nt的小分子RNA。miRNA提取试剂盒能够从动植物组织、培养细胞、血液等样本中选择性地提取小分子RNA (<200nt) ，并去除大分子RNA和基因组DNA，可直接用于miRNA下游实验。试剂盒中的裂解液R是经过长时间研发改良的，具有更强的裂解能力和更高的提取灵敏度，吸附柱采用特殊的硅基质膜填料，大大增强了其对RNA的吸附能力，尤其是small RNA。此外，提供了总RNA(含miRNA)提取，以及大分子RNA (>200nt) 提取的方案。

## ■ 操作步骤：

→ 第一次使用前请先在 漂洗液RW 瓶中加入指定量乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！

### 消化裂解步骤

#### 动/植物组织

##### a. 液氮研磨（推荐）

取1ml裂解液R加入离心管中，放置于冰上预冷。切取小于100mg组织称重，加入液氮预冷的研钵中，分多次将组织研磨成粉末，期间多次添加液氮，将粉末加入离心管中，待液氮完全挥发后，立即关闭管盖并涡旋混匀形成均一透明的溶液。

##### b. 匀浆器匀浆

切取小于100mg组织称重，加入合适的容器中，加入1ml裂解液R，使用匀浆器低温间断匀浆，直至达到理想的匀浆效果。

**注意：组织用量取决于样品中RNA、蛋白等的含量。如动物肝、脾、肾、胸腺等，含有丰富的RNA，组织用量不要超过20 mg。推荐第一次使用时起始用量为30mg，根据提取效果调整样品用量。**

#### 培养细胞

a. 悬浮培养的细胞：计算细胞数量，在离心管中收集小于 $5 \times 10^6$ 个培养细胞，300g离心5 min，弃上清液，加入1ml裂解液R，涡旋或吸打至细胞完全溶解。

**注意：在加入裂解液R前应避免洗涤细胞，否则会增加RNA降解的可能性。**

b. 贴壁培养的细胞：依据培养板的面积加入所需的裂解液R量(每10cm<sup>2</sup>加1ml)。一般情况下，普通大小的细胞培养瓶，加入1ml的裂解液R，迅速轻摇使裂解液R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。

**注意：当裂解液R量不足时可导致抽提的RNA中污染有DNA。**

## 血液（推荐处理量为1-2ml血液）

红细胞裂解液的稀释：根据处理血液样品的体积选取适当体积的10×红细胞裂解液(10×ACK Lysis Buffer目录号：ZS714)，RNase-free ddH<sub>2</sub>O稀释至1×红细胞裂解液。

(1) 向1体积人类全血中加2-3倍体积1×红细胞裂解液(需自备合适的干净管子)。

**注意：为获得最佳的混匀效果，血液和1×红细胞裂解液的混合液体积不应超过管子体积的3/4。如果血液中的白细胞含量较高，可按比例减小血液的使用体积。**

(2) 0°C-25°C孵育3-10min，在孵育过程中颠倒混匀1-2次。

**注意：在孵育的过程中溶液将由不透明状变成透明“红墨水样”状态，表明红细胞裂解。孵育的温度不超过25°C即可，孵育的结果必须是由不透明状变成透明“红墨水样”状态。**

(3) 4°C 10,000rpm(~11,000×g)离心1min，将上清完全去除。

**注意：哺乳动物全血的RNA在白细胞中，1ml全血离心后白细胞约2-20ul体积，通常灰白细胞沉淀上会残留30-50ul红色的粘稠的沉淀，可用200 ul枪小心吸除，如果看不到白色细胞则倒掉上清，进入下一步骤，进一步裂解去除红细胞再清除红色粘稠沉淀。**

(4) 向白细胞沉淀中加入1×红细胞裂解液(加入1×红细胞裂解液的体积是第1步中全血用量的2倍)，涡旋振荡彻底重悬细胞；0°C-25°C孵育3min。

(5) 4°C 10,000rpm(~11,000×g)离心1min，将上清完全去除。用200μl枪从沉淀的另一侧，吸去红色杂质。

(6) 加入30-50μl 1×红细胞裂解液涡旋振荡重悬白细胞。

(7) 加入1ml 裂解液R，涡旋振荡混匀(或吹打混匀)。



## 纯化步骤

### 小分子RNA提取

1. 室温放置5分钟，使细胞充分裂解。

**注意：此时样品可在-70°C保存一个月以上。**

2. 以每1ml 裂解液R加入200 $\mu$ l氯仿的比例加入氯仿，盖好管盖，剧烈振荡15 sec，室温放置5 min。

3. 4°C 12,000rpm离心15 min。此时样品分为三层：红色有机相，中间层和无色水相，吸取上层无色水相到一个新的离心管中。

**注意：分层后裂解液R对RNA的保护作用减弱，因此操作时应低温快速；请小心吸取上清水相，避免吸到中间层和下层有机相而影响后续提取结果，每1ml裂解液R建议吸取500  $\mu$ l上清。**

4. 上清水相中加入1/3倍上清体积的无水乙醇，涡旋混匀10 sec，将得到的溶液和沉淀一起转入已装入收集管的RNA吸附柱中。12,000rpm离心30 sec，离心后弃掉吸附柱，保留滤液。

**注意：吸附柱的最大容量为700 $\mu$ l，若不能一次加入，请分多次转入；若需提取大分子RNA，保留RNA 吸附柱，按大分子RNA提取方案操作。**

5. 得到的滤液中加入2/3倍滤液体积的无水乙醇，用移液枪吸打混匀3-5次。

6. 将上步所得混合液一起转入已装入收集管的miRNA微柱中。12,000rpm 离心30 sec，倒掉收集管中滤液，将miRNA微柱重新放回收集管中。

**注意：吸附柱的最大容量为700 $\mu$ l，若不能一次加入，请分多次转入。**

7. 向miRNA微柱中加入500 $\mu$ l去蛋白液M，室温12,000rpm离心30sec，倒掉收集管中滤液，将吸附柱重新放回收集管中。

8. 向miRNA微柱中加入500 $\mu$ l漂洗液RW（已加乙醇！），室温12,000rpm离心30sec，倒掉收集管中滤液，将miRNA微柱重新放回收集管中。

9. 重复步骤8。

10. 12,000rpm离心2 min。彻底去除miRNA微柱中残留的乙醇。

11. 将miRNA微柱置于一个新的1.5ml RNase-free离心管中，开盖室温晾干2 min。向吸附柱中间部位加入15-30  $\mu$ l的RNase-free Water，室温放置2min，12,000rpm离心1 min，收集miRNA溶液。得到的miRNA溶液保存在-70°C。

**注意：洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要miRNA浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积最好不少于15  $\mu$ l，体积过小降低miRNA洗脱效率，减少RNA产量。**

## 大分子RNA提取

1. 小分子RNA提取（步骤4）中结合了大分子RNA的RNA吸附柱，置于2 ml收集管中。
2. 向RNA吸附柱中加入500 $\mu$ l 去蛋白液M，室温12,000rpm离心30s，倒掉收集管中滤液，将吸附柱重新放回收集管中。
3. 向RNA吸附柱中加入500 $\mu$ l 漂洗液RW（已加乙醇！），室温12,000rpm离心30s，倒掉收集管中滤液，将RNA吸附柱重新放回收集管中。
4. 重复步骤3。
5. 12,000rpm离心2 min。彻底去除RNA吸附柱中残留的乙醇。
6. 将RNA吸附柱置于一个新的1.5 ml RNase-free离心管中，开盖室温晾干2 min。向吸附柱中间部位加入50-100 $\mu$ l的RNase-free Water，室温放置2min，12,000rpm离心1 min，收集大分子RNA溶液。得到的大分子RNA溶液保存在-70°C。

**注意：洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要RNA浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积最好不少于50  $\mu$ l，体积过小降低RNA洗脱效率，减少RNA产量。**

## 总RNA提取（含miRNA）

1. 小分子RNA提取（步骤3）上清水相中加入1倍上清体积的无水乙醇，涡旋混匀10 sec，将得到的溶液和沉淀一起转入已装入收集管的RNA吸附柱中。12,000rpm离心30 sec，倒掉收集管中滤液，将RNA吸附柱重新放回收集管中。  
**注意：吸附柱的最大容量为700 $\mu$ l，若不能一次加入，请分多次转入。**
2. 向RNA吸附柱中加入500 $\mu$ l 去蛋白液M，室温12,000rpm离心30sec，倒掉收集管中滤液，将RNA吸附柱重新放回收集管中。
3. 向RNA吸附柱中加入500 $\mu$ l 漂洗液RW（已加乙醇！），室温12,000rpm离心30sec，倒掉收集管中滤液，将RNA吸附柱重新放回收集管中。
4. 重复步骤3。
5. 12,000rpm离心2 min。彻底去除RNA吸附柱中残留的乙醇。



6. 将RNA吸附柱置于一个新的1.5 ml RNase-free离心管中，开盖室温晾干2 min。向吸附柱中间部位加入50-100 $\mu$ l的RNase-free Water，室温放置2min，12,000rpm离心1 min，收集RNA溶液。得到的RNA溶液保存在-70 $^{\circ}$ C。

**注意：洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要RNA浓度较高，可以适当减少洗脱体积，但是最小体积最好不少于50 $\mu$ l，体积小降低RNA洗脱效率，减少RNA产量。**

## ■ 注意事项

1. 第一次使用前请先在漂洗液RW瓶中加入指定量乙醇，加入后请及时打钩标记已加入乙醇，以免多次加入！
2. 所有操作步骤，如未加说明，均在室温下（15 $^{\circ}$ C-25 $^{\circ}$ C）进行。
3. 裂解液R中含有刺激性有害化合物，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. RNA得率和纯度与样本用量有关，不是样本用量越多越好，不能超过裂解液R和吸附柱的承载量。
5. 尽量采用新鲜的样本。样本（血液样本除外）不能及时提取RNA，应当及时置于-70 $^{\circ}$ C或者液氮保存；或者样本加入裂解液R匀浆后，加氯仿前，可在-70 $^{\circ}$ C保存一个月以上。
6. 动植物组织样本建议使用液氮研磨；采用匀浆器处理时应保持低温，防止因匀浆产生的高温导致RNA降解。
7. RNA提取的关键在于防止RNase 污染，操作过程中使用的离心管、枪头等塑料制品和匀浆设备都应无RNase污染；RNA容易受到外界各种因素影响导致降解，注意保证RNase-free的环境。
8. 常规的琼脂糖凝胶电泳和变性胶电泳均可以用来分析miRNA的质量。好的miRNA产物在电泳后应该只能看到一条5S带，这表明大分子的RNA已完全去除。人全血中RNA含量较少，电泳无条带也是正常的。