



miRNA Isolation Kit

miRNA 提取分离试剂盒

产品简介

miRNA提取试剂盒是专门针对miRNA提取而开发的新一代产品，同时还可以提取small interfering RNA(siRNA), small nuclear RNA (snRNA)等small RNA，也可以用于Total RNA的提取。该试剂盒适用于各种样本（细胞，动物组织，植物组织，血清，血浆）中RNA的提取，每个吸附柱每次可处理30~50 mg动物组织(RNA含量高的组织,如肝脏不能超过30 mg)，100 mg植物组织或 1×10^7 细胞。1 h内即可完成所有操作，提取的RNA没有DNA和蛋白污染，可用于Northern Blot、Dot Blot、PolyA 筛选、体外翻译、RNase 保护分析和分子克隆。

试剂盒组成

产品编号	R8101	R8105	R8106	R8107
次数	5	50	100	200
miRNA 柱	5	50	100	200
tRNA 柱	5	50	100	200
TRNsol	5ml	55ml	110ml	110ml*5
RNA Wash Buffer I	3ml	33ml	55ml	110ml
RNA Wash Buffer II	2ml	13ml	26ml	26ml*2
DEPC-Water	1ml	13ml	20ml	30ml
说明书	1	1	1	1

储存和稳定性

TRNsol 4℃放置，其他试剂室温保存。试剂盒从购买之日起1年内有效。

预防RNase 污染，应注意以下几方面：

- 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致RNase污染。
- 使用无RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染。
- RNA 在Buffer PR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1500C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。
- 配制溶液应使用RNase-free ddH₂O。（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入DEPC 至终浓度0.1%(v/v)，混匀后放置过夜，高压灭菌）。

浓缩的DNA Wash Buffer需用无水乙醇按如下稀释：

- R8101 加8 ml；R8105加入52 ml ；R8106与R8107每瓶加入104 ml 无水乙醇

操作步骤

1. 匀浆并裂解样本：

- 组织样本：**每50~100mg组织加入1ml TRNsol，建议使用机械匀浆器来匀浆。另外也可用液氮来破碎组织。样本的体积应不超过所使用的TRNsol的体积的10%。
- 悬浮培养的细胞：**离心沉淀收集细胞。1ml的TRNsol试剂可用于处理(5~10) $\times 10^6$ 个动物、植物或酵母细胞，或 1×10^8 个细菌细胞。在加入TRNsol前应避免洗涤细胞，因为这样可以增加mRNA降解及RNA酶污染的可能性。
- 单层贴壁培养的细胞：**通过直接把1ml TRNsol加至一直径为3.5cm的培养皿的方法来裂解细胞，用枪头吹打裂解物几次。TRNsol的用量随培养皿的面积而定（1ml/10ml）。如果加的TRNsol不足，则会导致在分离得的RNA中有DNA污染。
- 血液样品：**250 μ l的新鲜全血加750 μ l TRNsol，剧烈颠倒混匀。注：第二步操作中，加入氯仿的量为0.2ml。

2. 每1 ml TRNsol中加0.2 ml 氯仿。盖上离心管盖子，剧烈地振荡15sec，在冰上孵育5 min。室温下，12,000 \times g下离心10min。

此时混合物分成三层：底层为苯酚氯仿相层，中间层，和上层水相层。RNA完全存在于水相中。

3. 转移不多于80%上层水相至新的离心管中，缓慢加入0.4倍体积的无水乙醇（如500 μ l上清，加入200 μ l无水乙醇），混匀。

4. 将得到溶液和沉淀一起转入tRNA吸附柱中，12,000 rpm (~13,400 \times g)离心30 秒。保留滤过液，丢弃tRNA吸附柱（如果要提总RNA，保留tRNA吸附柱，并按第六步起的步骤操作）。

若一次不能将全部溶液和混合物加入GBC吸附柱，请分两次转入GBC吸附柱中，12,000 rpm (~13,400 \times g)离心30 秒，保留滤过液。

5.量取滤过液体积，缓慢加入滤过液体积0.7倍的无水乙醇（如700 μ l滤过液加入490 μ l无水乙醇），混匀，并转移到miRNA柱子中，12,000 rpm (~13,400 \times g)离心30 秒，弃滤过液，保留柱子。

若一次不能将全部溶液和混合物加入GBC吸附柱，请分两次转入GBC吸附柱中，12,000 rpm (~13,400 \times g)离心30 秒，弃掉收集管中的废液。

6. 向miRNA柱中加入500 μ l Wash Buffer I 离心1min，弃废液。

7. 向miRNA柱子中加入600 μ l Wash Buffer II，12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心30 秒，倒掉废液。

注意：Wash Buffer II使用前请先检查是否已加入无水乙醇

8.向miRNA柱中加入600 μ l Wash Buffer II，12,000 rpm (~13,400 \times g) 离心30秒，倒掉废液。

9. 12,000 rpm(~13,400 \times g)离心1 分钟，倒掉废液，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，漂洗液中乙醇的残留会影响后续的实验

10. 将miRNA柱转入一个新的离心管中，加15-30 μ l DEPC-Water，室温放置2 分钟，4℃ 12,000 rpm (~13,400 \times g)离心1分钟。

可能出现的问题与对策

问 题	原 因	建 议
少或无洗脱 RNA	RNA 依然保留在柱子上	<ul style="list-style-type: none"> 再次洗脱 洗脱前把 DEPC 水预热至 70℃ 离心前把柱子水浴 5min
	柱子过载了	<ul style="list-style-type: none"> 减少起始原料的量
柱子堵塞 RNA 被降解	没有完全裂解	<ul style="list-style-type: none"> 加如 TRNsol 后混和均匀 延长离心时间 减少起始原料的量
	来源有问题	<ul style="list-style-type: none"> 不要冷冻血液 样品保存时间过长, 请用新鲜样品 依照方案来做, 并且操作要迅速
	RNA 酶污染	<ul style="list-style-type: none"> 确保在操作中不要导入 RNA 酶 检查各缓冲液是否有 RNA 污染
下游应用中出现了问题	在洗脱的过程中有盐遗留下来	<ul style="list-style-type: none"> 确保 Wash Buffer II 已经用适量的无水乙醇稀释过 乙醇稀释后的 Wash Buffer II 必须在室温下保存 再用 Wash Buffer II 洗涤
	有 PCR 抑制剂	<ul style="list-style-type: none"> 减少起始原料的量 转移上清时不要超过上清的 80%
有 DNA 杂质		<ul style="list-style-type: none"> 用无 RNA 酶的 DNA 酶降解之, 并在 75℃ 下变性 5min
低吸光度比值	用酸性缓冲液或水来洗脱 RNA	<ul style="list-style-type: none"> 用 TE 缓冲液来代替 DEPC 水进行洗脱或稀释。

可能用到的产品

货号	品名	规格
P3105	Plasmid Maix Kit	10T
P2105	Endo-free Plasmid Mini kit	50T
P6105	Yeast Plasmid Kit	50T
C4105	MiniElute DNA-Pure Kit	50T
P3415	2XPCR Master Mix	1ml
D1105	Blood DNA Kit	50T
D4105	Plant DNA Kit	50T
D7105	Hpure Fugal DNA Kit	50T
D3105	Baterial DNA Kit	50T
D8105	Soil DNA Kit	50T
R1106	TRNsol(TRIzol)	100ml
R4105	Total RNA Kit II	50T
R5105	Plant RNA Kit	50T
G4210	DH5a 感受态	5*0.2ml
G0668	DEPC-water	100ml
G3420	6X loading buffer	2ml
G3422	DAB 染色液	100ml
G0577	苏木素伊红染色液	50ml*2
G3424	RIPA 裂解液	100ml
P0018	ECL 发光液	100ml
G3418	TMB Solution For Blotting	100ml
G4308	TMB solution For Elisa	100ml
G3005	30%丙烯酰胺 (29:1)	500ml
G3403	40%丙烯酰胺 (37.5:1)	500ml
G0528	4%多聚甲醛	500ml
G3422	BCA 蛋白浓度测定试剂盒	500T
G3155	Bradford 蛋白浓度测定试剂盒	1000T
G4256	10X 丽春红染色液	10ml

广州捷信斯生物科技有限公司

地址: 广州市国际生物岛螺旋四路一号研发B区403

电话: 020-82160415 Email: genebase@vip.163.com WEB: www.gbcbio.cn