

描述: 海基生产的组织细胞 miRNA 提取试剂盒是目前世界上提取小 RNA (<200nt) 操作步骤最简单、重复性最好、小 RNA 产率最高的方法。使用该试剂盒提取的小 RNA (Small RNA) 中, 长度在 15~200nt 范围的 RNA 在 95% 以上, 基本不含有大 RNA 和 DNA。使用该试剂通过一步上柱即可获得高纯度 miRNA, 可在 45min 内完成小 RNA 的提取。该试剂盒广泛适用于动物组织、细胞和多糖多酚含量不高的植物组织样本。

组分:

名称	25 次 B1802A	100 次 B1802B
miRNA Reagent A	7.5 ml	30ml
miRNA Reagent B	10 ml	40 ml
miRNA 吸附柱	25 套	100 套
RnaseFree TE Buffer	5ml	5ml

储存: 室温可保存 2 年。

使用防护建议: miRNA Reagent A 溶液中含有胍盐, 其具有强烈的腐蚀性, 试验时请务必佩戴防护眼镜、手套、口罩等防护措施, 如有皮肤接触请立即用大量清水冲洗, 再另行就医。

样本使用量及小 RNA 产量

样品类型	样品量	小 RNA 产量
动物组织 (肝脏、脾脏、肾脏等)	10~30 mg	0.2~10µg
动物组织 (骨骼肌、心肌)	20~40 mg	0.1~5µg
动物组织 (脑、皮肤)	20~50 mg	0.1~2µg
植物组织 (多糖多酚含量不高的)	20~40 mg	0.1~2µg
细胞	$0.5 \times 10^6 \sim 10^7$ 个	0.1~2µg

自备试剂: 异丙醇、乙醇、75%异丙醇

操作方法:

1. 组织样本提取

(1) 向 1.5ml EP 管中加入 300µl miRNA Reagent A。植物组织则再加入 10µl β-巯基乙醇, 混合均匀。

(2) 在液氮条件下充分将组织研磨粉碎, 将一定的样品量(见样本使用量表) 研磨成粉状的组织加入到上述 300µl miRNA Reagent A 中, **立即**手腕用力震荡至组织粉末彻底溶解于裂解液中。室温静置 5min 以充分裂解细胞。

注意: 将组织加入到 miRNA Reagent A 后要迅速将组织震散, 否则易引起组织成团状, 不容易裂解。如发生成团状, 务必用移液器将团状组织吹打松散。

(3) 向上述裂解完毕的裂解液中加入 350µl miRNA Reagent B, 上下颠倒混合均匀。13,000rpm 离心 5min, 吸取 550µl 上清液, 转移到新的 1.5ml EP 管中。

(4) 向上述溶液中加入 200µl 无水乙醇, 手腕用力震荡数次, 室温放置 5min。

(5) 13,000rpm 离心 10min, 转移 700µl 上清液到新的 1.5ml EP 管中。

(6) 向上述溶液中加入 300µl 异丙醇, 手腕用力上下颠倒数次。

(7) 分两次将上述溶液倒入到 miRNA 吸附柱中, 13,000rpm 离心 1min, 倒掉过滤液。

(8) 向吸附柱中加入 700µl 75%异丙醇洗涤一次, 13,000rpm 离心 1min, 倒掉过滤液。

(9) 向吸附柱中加入 500µl 无水乙醇洗涤一次, 13,000rpm 离心 1min, 倒掉过滤液。

(10) 吸附柱 13,000rpm 空离心 2min, 去掉残留的乙醇。

(11) 将吸附柱放入到新 1.5ml EP 管中, 室温放置 2min, 使残留乙醇挥发。在吸附柱滤芯上加入 30µl RnaseFree TE Buffer, 室温静置 2min, 13,000rpm 离心 2min, 洗脱产物即为提取的 miRNA。(通常取 1~2µl 该产物, 即可使用海基一步法 miRNA 反转录试剂盒进行反转录反应, 货号: D1802)。

2. 细胞样本提取

(1) 贴壁细胞:胰酶消化细胞后,离心收集细胞沉淀。用 100 μ l 1 \times PBS 重悬细胞后,加入 300 μ l miRNA Reagent A 颠倒混合均匀,室温放置 5min。

(2) 悬浮细胞:直接离心后,收集细胞沉淀。用 100 μ l 1 \times PBS 重悬细胞后,加入 300 μ l miRNA Reagent A 颠倒混合均匀,室温放置 5min。

(3) 向上述裂解完毕的裂解液中加入 250 μ l miRNA Reagent B,上下颠倒混合均匀。13,000rpm 离心 5min,吸取 550 μ l 上清液,转移到新的 1.5ml EP 管中。

注意:加入细胞体积数与 miRNA Reagent B 总体积数为 350 μ l。如加入 50 μ l 细胞,则 miRNA Reagent B 使用 300 μ l。

(4) 向上述 550 μ l 上清溶液中加入 200 μ l 无水乙醇,手腕用力震荡数次,室温放置 5min。

(5) 13,000rpm 离心 10min,转移 700 μ l 上清液到新的 1.5ml EP 管中。

(6) 向上述溶液中加入 300 μ l 异丙醇,手腕用力上下颠倒数次。

(7) 分两次将上述溶液倒入到 miRNA 吸附柱中,13,000rpm 离心 1min,倒掉过滤液。

(8) 向吸附柱中加入 700 μ l 75%异丙醇洗涤一次,13,000rpm 离心 1min,倒掉过滤液。

(9) 向吸附柱中加入 500 μ l 无水乙醇洗涤一次,13,000rpm 离心 1min,倒掉过滤液。

(10) 吸附柱 13,000rpm 空离心 2min,去掉残留的乙醇。

(11) 将吸附柱放入到新 1.5ml EP 管中,室温放置 2min,使残留乙醇挥发。在吸附柱滤芯上加入 30 μ l RnaseFree TE Buffer,室温静置 2min,13,000rpm 离心 2min,洗脱产物即为提取的 miRNA。(通常取 1~2 μ l 该产物,即可使用海基一步法 miRNA 反转录试剂盒进行反转录反应,货号: D1802)。

常见问题汇总:

(1) 本方法提取的小 RNA,95%以上为小 RNA (<200nt),有时会残留一些>200nt 的 RNA,通常残留的>200nt RNA 不影响后续试验操作。

(2) 本试剂盒提取的小 RNA 由于不含 mRNA 等大分子量的 RNA,因此更适合做后续反转录试验,从而进行定量试验。

(3) 使用本试剂盒提取的 miRNA 浓度通常在 50ng/ μ l 左右,取 5~10 μ l 即可用于电泳检测。取 1~2 μ l 即可用于海基 HG TaqMan miRNA 反转录试剂盒进行反转录反应(货号: D1802),

并使用海基优化的 miR-TaqMan RealTime PCR 技术(货号: TAPXXXXX)。