

天
净
沙
系
列

CAT#:220803-50
常温运输和保存

BINGENE

miRNA 纯化试剂盒（过柱法）

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

<p>产品及特点</p>	<p>本产品是用于小 RNA 分离纯化产品，它具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 一步法直接分离纯化小 RNA，比两步法（先分离总 RNA 和再纯化其中的小 RNA）和 PAGE 电泳回收法更简单。得到的小 RNA 长度大部分在 200 nt 以下，包括 5S RNA、tRNA、miRNA、Pre-miRNA、pri-miRNA、siRNA、shRNA 和 snRNA 等。 2. 柱式操作，整个过程只需要十多分钟。 3. 适用范围广，可以用于动物组织、血液及部分植物组织等实验材料。 4. 小 RNA 纯净，OD260/280 一般都在 1.9 以上。 5. 产率一般为 20-40 ug/100 mg 动物组织。 6. 无基因组 DNA 的污染。 7. 可用于 RT-PCR、miRNA 标记、microarray 等后续实验。 																																
<p>规格及成分</p>	<p style="text-align: center;">本产品使用大盒包装</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 25%;">成份</th> <th style="width: 25%;">编号</th> <th style="width: 25%;">规格</th> <th style="width: 25%;">包装材料</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>miRNA 纯化溶液 A</td> <td>220803a</td> <td>25 mL</td> <td>30mL 棕色玻璃瓶</td> </tr> <tr> <td>miRNA 纯化溶液 B</td> <td>220803b</td> <td>25 mL</td> <td>30mL 本色瓶</td> </tr> <tr> <td>miRNA 纯化溶液 C</td> <td>220803c</td> <td>50 mL</td> <td>60mL 本色瓶</td> </tr> <tr> <td>离心吸附柱</td> <td>220144</td> <td>50 套×2</td> <td>塑料袋</td> </tr> <tr> <td>miRNA 专用洗柱液</td> <td>220803d</td> <td>50 mL</td> <td>60mL 本色瓶</td> </tr> <tr> <td>RNA 洗脱液</td> <td>971207</td> <td>10 mL</td> <td>10mL 本色瓶</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>220803sc</td> <td>1 份</td> <td>无</td> </tr> </tbody> </table>	成份	编号	规格	包装材料	miRNA 纯化溶液 A	220803a	25 mL	30mL 棕色玻璃瓶	miRNA 纯化溶液 B	220803b	25 mL	30mL 本色瓶	miRNA 纯化溶液 C	220803c	50 mL	60mL 本色瓶	离心吸附柱	220144	50 套×2	塑料袋	miRNA 专用洗柱液	220803d	50 mL	60mL 本色瓶	RNA 洗脱液	971207	10 mL	10mL 本色瓶	使用手册	220803sc	1 份	无
成份	编号	规格	包装材料																														
miRNA 纯化溶液 A	220803a	25 mL	30mL 棕色玻璃瓶																														
miRNA 纯化溶液 B	220803b	25 mL	30mL 本色瓶																														
miRNA 纯化溶液 C	220803c	50 mL	60mL 本色瓶																														
离心吸附柱	220144	50 套×2	塑料袋																														
miRNA 专用洗柱液	220803d	50 mL	60mL 本色瓶																														
RNA 洗脱液	971207	10 mL	10mL 本色瓶																														
使用手册	220803sc	1 份	无																														
<p>运输及保存</p>	<p>常温运输和保存，有效期一年。</p>																																
<p>自备试剂</p>	<p>氯仿。</p>																																
<p>使用方法</p>	<p>由于离心吸附柱的吸附量限制，本产品每次提取只能处理 100mg 左右的各种组织。如果处理样品量大，请分成很多相当于微量提取的量进行，最后再收集在一起。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 新鲜配制裂解液。将 miRNA 纯化溶液 A 和 miRNA 纯化溶液 B 按 1:1 的比例混合，然后根据组织细胞类型的不同分为下面及种情况使用。注意：miRNA 纯化溶液 A 和 miRNA 纯化溶液 B 混合后必须立即使用，不要放置，否则会产生沉淀。 <ol style="list-style-type: none"> a) 对贴壁细胞：吸尽培养液，在每 10 平方厘米细胞中加入 1 mL 新鲜配制的裂解液，用枪轻柔吹打数次，确保细胞全部裂解。 b) 对悬浮细胞：离心收集细胞，吸尽液体，在每 $1-5 \times 10^6$ 悬浮细胞中加入 1 mL 新鲜配制的裂解液，用枪轻柔吹打数次，确保细胞全部裂解。如果是 fibroblasts 																																

或 carcinoma cell, 1 mL 新鲜配制的裂解液的细胞使用量不要超过 1×10^6 个细胞。

- c) 对新鲜的动物或植物实体组织: 匀浆法: 先将剪切成小块新鲜组织或液氮保存的组织放入 10 mL 或 15 mL 塑料离心管中, 每 50-100 mg 组织加 1 mL 新鲜配制的裂解液, 用剪切式匀浆机匀浆 30 秒左右。对肝、脾、胰、肾等细胞分裂十分旺盛的组织 (细胞中含大量正在复制的 DNA), 建议组织的使用量不要超过 50 mg/ mL 裂解液, 否则十分容易产生 DNA 污染。液氮研磨法: 将组织在液氮中研磨成粉, 然后转移到新配制的裂解液中, 震荡混匀。
- d) 对在 RNA 非冻型保存液中保存的动物或植物实体组织: 先用纸吸去保存液后再剪切成小块, 再按新鲜实体组织的处理方法处理。
2. 将裂解物转移至一个干净的 1.5 mL 塑料离心管中, 然后加入 0.2 倍体积的自备氯仿(1 mL 裂解物需 0.2 ml 氯仿), 振荡器上充分振荡混均 30 秒。
 3. 14000 g 室温离心 3-5 分钟。
 4. 将上清液 (约 0.6-0.8 mL) 转移到离心吸附柱中。注意: 离心后下层有机相和中间层含有 DNA 和蛋白质, 避免触及, 否则将产生蛋白质和 DNA 污染。为保险起见, 可以留下 100 uL 上清液不取。同时吸取上清时最好缓慢进行, 否则容易吸出交界面的不可见的丝状 DNA。
 5. 14000 g 室温离心半分钟, 收集管中的穿透液。大 RNA 及 DNA 将与离心吸附柱的膜结合, 小 RNA 将存在于穿透液中。但由于离心吸附柱的最大吸附能力为 40 ug 动物 RNA, 20 ug 植物 RNA, 所以如果样品中的大 RNA 含量高于上面数值, 则需要减少上样量, 否则穿透液中将同时含有大 RNA 和小 RNA。
 6. 在最后得到的不含大 RNA 的穿透液中加入等体积的 miRNA 纯化溶液 C, 混匀。此时溶液的总积约为 1.5 mL。
 7. 先转移约 0.75mL 到窄口的离心吸附柱中, 14000 g 室温离心半分钟, 弃收集管中的穿透液。
 8. 将上步上柱剩余的样品转移到离心吸附柱中, 14000 g 室温离心半分钟, 弃收集管中的穿透液。
 9. 加 0.7mL miRNA 专用洗柱液到离心吸附柱中, 14000 g 室温离心半分钟, 弃穿透液。
 10. 加 0.3mL miRNA 专用洗柱液到离心吸附柱中, 14000 g 室温离心半分钟, 弃穿透液。此步一般可以省略。
 11. 14000 g 室温离心半分钟以甩出残留液体。此步十分重要, 否则残留的 miRNA 专用洗柱液会影响 miRNA 的使用。

	<p>12. 将离心吸附柱转移到一自备的 RNase-free 收集管中,加入 50uL RNA 洗脱液,室温放置 3-5 分钟。</p> <p>13. 14000 g 室温离心半分钟,离心管中溶液即为 miRNA 样品,可以立即使用或存放于-80℃待用。</p>
关联试剂	miRNA 尿素-PAGE 电泳套装