

Imagene®

GenePure microRNA Kit

GenePure microRNA 快速提取试剂盒



CODONNX
RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

GenePure microRNA 快速提取试剂盒

目录号 RE146

使用说明书

网站: www.codonx.com
 咨询电话: 010-56315162
 技术支持 QQ: 3090544158

- 1/适用范围
- 2/试剂盒组成、储存、稳定性
- 3/储存事项
- 4/产品介绍
- 5/产品特点
- 6/注意事项
- 7/操作步骤
- 8/附录 1 : microRNA 富集方法
- 9/附录 2 : DNA 酶柱上消化
- 10/附录 3 : 使用裂解液 CLB

1/适用范围:

适用于快速提取动物（含昆虫）microRNA或者microRNA/总RNA分别提取。

2/试剂盒组成、储存、稳定性:

| 试剂盒组成 | 保存 | 50 次(RE146-01) |
|------------------------------|----|--------------------|
| 裂解液 LBT Plus | 室温 | 50 ml |
| PLA | 室温 | 5 ml |
| 漂洗液 A | 室温 | 12 ml |
| | | 第一次使用前加入 28ml 无水乙醇 |
| 漂洗液 B | 室温 | 10 ml |
| | | 第一次使用前加入 42ml 无水乙醇 |
| RNase-free H ₂ O | 室温 | 10 ml |
| 微量基因组 DNA 清除柱 CC 和收集管 CT | 室温 | 50 套 |
| RNase-free 吸附柱 AC 和收集管 CT | 室温 | 50 套 |

本试剂盒在室温储存 6 个月不影响使用效果。

3/储存事项:

1. 所有的溶液应该是澄清的，如果环境温度低时溶液可能形成沉淀，此时不应该直接使用，可在 37℃ 水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
2. 不合适的储存于低温（4℃ 或者 -20℃）会造成溶液沉淀，影响使用效果，因此运输和储存均在室温下（15℃ - 25℃）进行。
3. 漂洗液 B 可能加入乙醇使用几天后出现沉淀晶体，并不影响使用，直接不吸晶体，吸上清使用就可以。
4. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

4/产品介绍:

传统的 microRNA 提取试剂盒均是采用异硫氰酸胍/苯酚/氯仿（TRIzol 法）加高浓度乙醇硅胶膜吸附小片段 microRNA 的原理方法制成，但是复杂的样品用 TRIzol 的原理甚至无法提取符合要求的总 RNA，更不用说 microRNA。因此很多世界著名公司采用 Trizol 法原理的 microRNA 提取试剂盒面临复杂样品时束手无策，产品线中干脆就

没有复杂样品 microRNA 提取试剂盒。用户万般无奈只好用传统方法，或者 TRIzol 法提取，用异丙醇/乙醇沉淀方法来提取 microRNA，虽然也能提取到部分 microRNA，但是沉淀法损失巨大或者和杂质共沉淀，影响实验结果，投稿时常常面临质疑。而本试剂盒在创新性的不用苯酚、氯仿的技术路线下解决该问题。

独特的裂解液迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶，RNA 助提剂 PLA 帮助结合多糖多酚并通过离心去除，然后裂解混合物通过基因组 DNA 清除柱 CC，基因组 DNA 被清除而 RNA（包括 microRNA）被选择性滤过。滤过的 RNA 用乙醇调节结合条件后，RNA 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列特殊漂洗液快速的漂洗—离心的步骤,将细胞代谢物，蛋白等杂质去除，最后低盐的 RNase free H₂O 将纯净 RNA（包括 microRNA）从硅基质膜上洗脱。

采用分提取操作步骤也可单独纯化富集后的 microRNA 组分和总 RNA (>200 nt) 从而得到分离富集的 microRNA 和 RNA。

5/产品特点:

1. 完全不使用有毒的苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 快速，简捷，单个样品操作一般可在 30 分钟内完成。
3. 独有的 RNA 助提剂可以有效提高清除效果。
4. 多次柱漂洗确保高纯度，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 典型的比值达 2.0~2.2，可用于 RT-PCR，Northern-blot 和各种实验。

6/注意事项

1. **所有的离心步骤均可在室温完成（或4℃离心也可以），**使用转速可以达到13,000 rpm的传统台式离心机。
2. 需要自备乙醇，β-巯基乙醇，研钵(可选)。
3. 样品处理量绝对不要超过基因组清除柱CC和和RNA吸附柱AC处理能力，否则造成DNA残留或产量降低。开始摸索实验条件时，如果不清楚样品DNA/RNA含量时可使用较少的样品处理量，将来根据样品试验情况增加或者减少处理量。
4. 裂解液LBT Plus和漂洗液A中含有刺激性化合物，操作时戴乳胶手套，**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。**
5. 关于DNA 的微量残留：

一般说来任何总 RNA 提取试剂在提取过程中无法完全避免DNA 的微量残留

(DNase消化也无法做到100%无残留),该产品由于采取了本公司独特的缓冲体系和基因组DNA清除柱技术,绝大多数DNA已经被清除,个别特殊情况需要清除微量基因组DNA残留,可使用以下几种DNA酶消化的方式。

- 1) 传统DNA酶消化提取的RNA/microRNA,热灭活DNA酶后直接用于后续实验。
- 2) 传统DNA酶消化提取的RNA/microRNA,然后使用RNA清洁纯化试剂盒(货号:RE132,但是需要将说明书改动一个地方,第二步加入250 μ l无水乙醇改成加入700 μ l无水乙醇)清洁纯化后用于后续实验。
- 3) 直接在吸附柱AC上进行DNase I柱上消化处理。购买DNA酶柱上消化试剂盒(货号:RE128,但是需将说明书的去蛋白液PRS改成漂洗液A)可先索取具体操作说明书。
6. 碰到特别复杂多糖多酚,淀粉等次级代谢产物特别丰富的样品,如葡萄果实,水稻种子,裂解液LBT Plus效果不佳的情况下,应该购买专用裂解液CLB。裂解液CLB是本公司为特别复杂的样品研发的最强配方,绝大部分裂解液LBT Plus无法提取的复杂样品都可以提取成功。见附录3。

7/操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)

提示:

- ⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 A 和漂洗液 B 瓶加入指定量无水乙醇!
- ⇒ 对于 RNA 酶或者特殊组织:操作前在裂解液 LBT Plus 中加入 β -巯基乙醇至终浓度 1%,如 1 ml LBT Plus 中加入 10 μ l β -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 LBT Plus 4 $^{\circ}$ C可放置一个月。

1. 直接研磨法(提取简单样品推荐此法,但是简单样品也可以用液氮研磨法):

- a. 新鲜组织称重后取 100mg 迅速剪成小块放入研钵(冰冻保存或者液氮保存样品可直接称重后取 100mg 放入研钵),加入 10 体积(1ml) LBT Plus 和 1 体积(100 μ l) PLA 室温下充分研磨成匀浆,注意应该迅速研磨让组织和裂解液 LBT Plus 立刻充分接触以抑制 RNA 酶活性。

注: PLA 是提取困难样品不可缺少成分。

- b. 将裂解物转入离心管,剧烈摇晃振荡 15 秒,13,000rpm 离心 5-10 分钟,沉淀不能裂解的碎片和结合有杂质的 PLA。

- c. 取 480 μ l 裂解物上清(在不超过基因组 DNA 清除柱 CC 能力的情况下可以取

更多的上清，这样可以提高产量，如残留基因组 DNA 较多，可适当减少取上清量）将裂解物上清加到 DNA 清除柱 CC 上（清除柱 CC 放在收集管 CT 内）。

d. 立刻接**操作步骤**的步骤 3。

2. 液氮研磨法（提取复杂，易降解样品时推荐此法）：

a. 取 500 μ l 裂解液 LBT Plus，转入 1.5ml 离心管中，加 50 μ l PLA 混匀备用。

b. 液氮中研磨适量组织成细粉后，取 50mg 细粉转入上述装有 LBT Plus 和 PLA 的离心管，立即用手剧烈振荡 20 秒，充分裂解。

c. 用吸头吹打混匀帮助裂解或者剧烈涡旋震荡直到得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 秒)，可以剪切 DNA，降低粘稠度和提高产量。

d. 将裂解物 13,000 rpm 离心 5-10 分钟，沉淀不能裂解的碎片和结合有杂质的 PLA。

e. **取裂解物上清(在不超过基因组 DNA 清除柱 CC 能力的情况下可以取更多的上清，这样可以提高产量)**将裂解物上清加到 DNA 清除柱 CC 上（清除柱 CC 放在收集管 CT 内）。

f. 立刻接**操作步骤**的步骤 3。

注意：以上液氮研磨法用户可以根据需要加倍处理，可以提高产量。也就是使用 1ml 的裂解液 LBT Plus 和 100 μ l PLA 和 100mg 的样品。

3. 立即 13,000 rpm 离心 60 秒，收集滤液（RNA 在滤液中）。

4. 用微量移液器较精确估计滤过液体积（480 μ l 左右，滤过时候损失体积应该减去），加入 1.25 倍体积的无水乙醇，此时可能出现沉淀，但是不影响提取过程，立即吹打混匀，不要离心。

5. 立刻将混合物(每次小于 700 μ l，多可以分两次加入)加入一个吸附柱 AC 中，（吸附柱 AC 放入收集管 CT 中）13,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

确保离心后液体全部滤过去，膜上没有残留，如有必要，可以加大离心力和离心时间。

6. 加 700 μ l 漂洗液 A（请先检查是否已加入无水乙醇!），12,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。

7. 加入 500 μ l 漂洗液 B（请先检查是否已加入无水乙醇!），12,000 rpm 离心 30 秒，

弃掉废液。加入 500 μ l 漂洗液 B，重复一遍。

8. 将吸附柱 AC 放回空收集管 CT 中，13,000 rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
9. 取出吸附柱 AC，放入一个 RNase free 离心管中，根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30-50 μ l RNase free water，室温放置 1 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟。
将洗脱液加回到吸附柱重复洗脱步骤一遍可以提高产量约 10-15%。
10. 得到的 RNA/microRNA 可以立即用于下游反应或者尽快置于低温保存。

8/附录 1: microRNA 富集方法 (microRNA/去除了 microRNA 的总 RNA 分别提取)

提示:

- ⇒ 对于 RNA 酶或者特殊样品组织：操作前在裂解液 LBT Plus 中加入 β -巯基乙醇至终浓度 1%，如 1 ml LBT Plus 中加入 10 μ l β -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 LBT Plus 4 $^{\circ}$ C 可放置一个月。

1. 直接研磨法 (提取简单样品推荐此法，但是简单样品也可以用液氮研磨法)：

a. 新鲜组织称重后取 100mg 迅速剪成小块放入研钵 (冰冻保存或者液氮保存样品可直接称重后取 100mg 放入研钵)，加入 **10 体积(1ml)**LBT Plus 和 **1 体积(100 μ l)** PLA 室温下充分研磨成匀浆，注意应该迅速研磨让组织和裂解液 RLT 立刻充分接触以抑制 RNA 酶活性。

注：PLA 是提取困难样品不可缺少成分。

b. 将裂解物转入离心管，剧烈摇晃振荡 15 秒，13,000rpm 离心 5-10 分钟，沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的 PLA。

c. 取 **480 μ l** 裂解物上清 (在不超过基因组 DNA 清除柱 CC 能力的情况下可以取更多的上清，这样可以提高产量，如残留基因组 DNA 较多，可适当减少取上清量) 转到一个新离心管。加入上清体积一半的无水乙醇(**0.5 体积**)，此时可能出现沉淀，但是不影响提取过程，立即吹打混匀，不要离心。

d. 立刻接**富集方法**的步骤 3。

2. 液氮研磨法 (提取复杂，易降解样品时推荐此法)：

a. 取 500 μ l 裂解液 LBT Plus，转入 1.5ml 离心管中，加 50 μ l PLA 混匀备用。

- b. 液氮中研磨适量组织成细粉后，取 50mg 细粉转入上述装有 LBT Plus 和 PLA 的离心管，立即用手剧烈振荡 20 秒，充分裂解。
- c. 用吸头吹打混匀帮助裂解或者剧烈涡旋震荡直到得到满意匀浆结果(或者电动匀浆 30 秒)，可以剪切 DNA，降低粘稠度和提高产量。
- d. 将裂解物 13,000 rpm 离心 5-10 分钟，沉淀不能裂解的碎片和结合有杂质的 PLA。
- e. **取裂解物上清(在不超过基因组 DNA 清除柱 CC 能力的情况下可以取更多的上清，这样可以提高产量)** 转到一个新离心管。加入上清体积一半的无水乙醇(0.5 体积)，此时可能出现沉淀,但是不影响提取过程，立即吹打混匀,不要离心。
- f. 立刻接**富集方法**的步骤 3。

注意：以上液氮研磨法用户可以根据需要加倍处理，可以提高产量。也就是使用 1ml 的裂解液 LBT Plus 和 100 μ l PLA 和 100mg 的样品。

3. 将混合物(每次小于 720 μ l，多可以分两次加入)加入一个基因组清除柱 CC 中，(清除柱 CC 放入收集管 CT 中) 13,000 rpm 离心 2 分钟，**保留滤液 (microRNA 在滤液中)**。

此时，滤过液含有 microRNA，基因组 DNA 清除柱 CC 上面是去除了 microRNA 的总 RNA (不包含 microRNA)，如果需要，可以按照前面标准操作步骤 6—10 操作漂洗，洗脱回收得到去除了 microRNA 的总 RNA。

4. 用微量移液器较精确估计滤过液体积，加入 0.65 倍体积无水乙醇 (必须是室温的)，涡旋或者吹打充分混匀，不要离心。
5. 立刻将混合物(每次小于 700 μ l，多可以分两次加入)加入一个吸附柱 AC 中，(吸附柱放入收集管 CT 中) 13,000 rpm 离心 2 分钟，弃掉废液。

确保离心后液体全部滤过去，膜上没有残留，如必要，可加大离心力和离心时间。

6. 按照前面标准操作步骤 6—10 操作漂洗，洗脱得到富集的 microRNA。

注意：不同的实验可以选择不同的方法，例如Northern Blot或者表达芯片谱分析可以选择提取包括microRNA的总RNA。富集方法提取的microRNA因为去除了较大片段的 mRNA 和 rRNA 等，可能减少某些下游试验的扩增背景，当背景较高或者非特异扩增较多时，可以尝试使用富集方法提取的 microRNA。

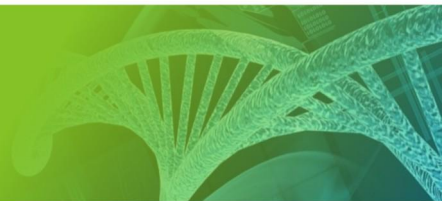
9/附录 2: DNA 酶柱上消化 (详细请参考 DNase I 柱上消化试剂盒说明书)

1. 按照前面所列操作步骤操作，直到做完操作步骤 5。
2. 取 45 μ l DNase I buffer 和 5 μ l RNase free DNase I 在离心管轻轻吹打混匀成工作液（处理多个离心柱子要按照比例放大制备工作液）。
3. 向吸附柱 AC 中加入 350 μ l 漂洗液 A，12,000 rpm 离心 30 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管 CT 中。
4. 向吸附柱 AC 中央加入 50 μ l 的 DNase I 工作液，室温（20 $^{\circ}$ C-30 $^{\circ}$ C）放置 15 分钟。注意直接将工作液滴在膜中央上向膜四周浸润充分和膜接触，不要让工作液滴在 O 型垫圈或是离心柱管壁上挂壁或者挂在垫圈上不能充分和膜接触。
5. 向吸附柱 AC 中加入 350 μ l 漂洗液 A，12,000 rpm 离心 30-60 秒，弃废液，将吸附柱放回收集管 CT 中。
6. 接操作步骤 7 完成后续步骤。

10/附录 3：使用裂解液 CLB

提示：

- ⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 A 和漂洗液 B 瓶加入指定量无水乙醇!
 - ⇒ 取 1ml 裂解液 CLB 至离心管内(如果 CLB 有析出或者沉淀需先置于 65 $^{\circ}$ C 水浴重新溶解)，在裂解液 CLB 中加入 5% β -巯基乙醇（1ml CLB 加 50 μ l β -巯基乙醇）。颠倒混匀后 65 $^{\circ}$ C 水浴中预热。
1. 液氮中研磨新鲜或-70 $^{\circ}$ C 冷冻的材料至细粉。
 2. 转移 100-150mg 细粉（水分少的样品如种子叶片等可加 100mg，水分多的样品如西瓜可多加一些）加至预热的裂解液 CLB（已加有 β -巯基乙醇）离心管中，立即激烈涡旋 30—60 秒或者用吸头吹打混匀裂解，短时放回 65 $^{\circ}$ C 水浴中（5 min-10 min，时间稍长一点 10 分钟产量可能提高一些），中间偶尔颠倒 1-2 次帮助裂解。
 β -巯基乙醇是裂解液 CLB 的关键成分，必要的时候可以提高终浓度到 10-20%。
 3. 振荡混匀后室温 13,000rpm 离心 10 分钟。
 4. 取裂解物上清（在不超过基因组 DNA 清除柱 CC 能力的情况下可以取更多的上清，这样可以提高产量）转到一个新离心管。
若上清表面有漂浮物，用吸头挑开吸取下面液体即可。
 5. 立刻接后续操作步骤。



CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd

Yizhuang Biomedical Park
Building 6, No.88 6th Kechuang St. Economic-Technological Development Area, Beijing, China
Tel: 010-56315162 www.codonx.com