

microRNA 快速提取试剂盒

货号: NG320S 50次
NG320M 100次

试剂盒组成	保存	50 次	100 次
裂解液 MRL	室温	50 ml	100 ml
漂洗液 RW	室温	25 ml	50 ml
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
70%乙醇	室温	5ml RNase-free H ₂ O	10ml RNase-free H ₂ O
		第一次使用前按说明加指定量乙醇	
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml	20 ml
RNase-free 吸附柱 RA	室温	50 个	100 个
RNase-free 微量吸附柱 RB	室温	50 个	100 个
收集管 (2ml)	室温	100 个	200 个

储存事项:

1. 运输和储存均在室温下 (15°C - 25°C) 进行。裂解液 MRL 可以常温运输。
2. 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。

产品介绍:

改进的异硫氰酸胍/酚一步法裂解细胞和灭活 RNA 酶, 然后总 RNA 在高离子盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜, 再通过一系列快速的漂洗 - 离心的步骤, 漂洗液将细胞代谢物、蛋白等杂质去除, 最后低盐的 RNase free water 将纯净 RNA (microRNA) 从硅基质膜上洗脱。

产品特点:

1. 离心吸附柱内硅基质膜全部采用进口特制吸附膜, 柱与柱之间吸附量差异极小, 可重复性好。
2. 结合了异硫氰酸胍/酚一步法试剂稳定性好, 纯度高和离心柱方便快捷的优点, RNA 可以直接从离心柱上洗脱避免了过度干燥不易溶解问题。
3. 独有的 MRL 裂解液配方, 可以有效的消除基因组污染。
4. 多次漂洗去蛋白过程, 提取 RNA 纯度更高。

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 RW 瓶和 70%乙醇瓶中加入指定量无水乙醇!

1. 匀浆处理

a. 组织

用玻璃或强力匀浆器搅匀组织样品, 保存于液氮内样品需要用研钵磨碎, 每50~100mg组织加1ml的裂解液MRL后匀浆。组织样品容积不能超过MRL容积的10%。

b. 单层生长的细胞

直接往直径3.5 cm的培养板中加入1ml的MRL溶解细胞, 并用移液枪轻轻吹打混匀。依据培养板的面积而不是依据细胞的数量来决定所需的MRL量 (每10cm²加1ml)。一般情况下, 普通大小的细胞培养瓶, 加入1ml的MRL, 迅速轻摇使MRL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。当MRL量不足时可导致抽提的RNA中污染有DNA。

c. 悬浮生长的细胞

通过离心来沉淀细胞。在MRL试剂中用移液枪反复吹打来裂解细胞。每5~10×10⁶的动物细胞, 植物或酵母菌细胞或每1×10⁷细菌加1ml的MRL。在加入MRL前应避免洗涤细胞, 否则会增大mRNA降解的可能性。破裂某些酵母菌和细菌可能需要使用匀浆器。

2. 将匀浆样品剧烈震荡混匀, 在 15-30°C 条件下孵育 5 分钟以使核蛋白体完全分解。
3. **可选步骤:** 4°C 的条件下 12,000rpm 离心 10 分钟, 小心取上清转入一个新的 RNase free 的离心管中。
4. 每 1mlMRL 加 0.2ml 氯仿。盖紧样品管盖, 剧烈振荡 15 秒并将其在室温下孵育 3 分钟。
5. 于4°C12,000rpm 离心10分钟, 样品会分成三层: 下层有机相, 中间层和上层无色的水相, RNA存在于水相中。水相层的容量大约为所加MRL体积的60%, 把水相转移到新管中, 进行下一步操作。
6. 加入 0.6 倍体积 70%乙醇 (**请先检查是否已加入无水乙醇!**), 颠倒混匀 (此时可能会出现沉淀)。得到的溶液和可能沉淀一起转入吸附柱 RA 中 (吸附柱套在收集管内)。
7. 10,000rpm 离心 45 秒, 收集下滤液 (下滤液中含有 microRNA), 准确估计下滤液的体积, 加入 2/3 倍体积的无水乙醇, 颠倒几次混匀, 将混合液倒入到微量吸附柱 RB 中 (吸附柱 RB 容量约为 700μl, 所以要分几次离心加入同一吸附柱), 10,000rpm 离心 30 秒弃掉废液。

注: 如果要分离大 RNA (18s 和 28s), 也可以从吸附柱 RA 中按照以下步骤得到。

8. 加入 700μl 漂洗液 RW (**请先检查是否已加入无水乙醇!**), 12,000 rpm 离心 60 秒, 弃掉废液。
9. 加入 500μl 漂洗液 RW, 12,000 rpm 离心 60 秒, 弃掉废液。
10. 将微量吸附柱 RB 放回空收集管中, 12,000 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。
11. 取出微量吸附柱 RB, 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 15-30μl RNase free water (事先在 65-70°C水浴中加热效果更好), 室温放置 2 分钟, 12,000 rpm 离心 1 分钟。收集得到纯净 microRNA 保存于-20°C 或者更低。**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 15 μl, 体积过小降低 RNA 洗脱效率, 减少 RNA 产量。**