

Universal microRNA Purification Kit 说明书

Cat.No.:EZB-miRN1

使用本试剂盒前, 请务必仔细阅读本说明书, 以保证操作正确

产品组分

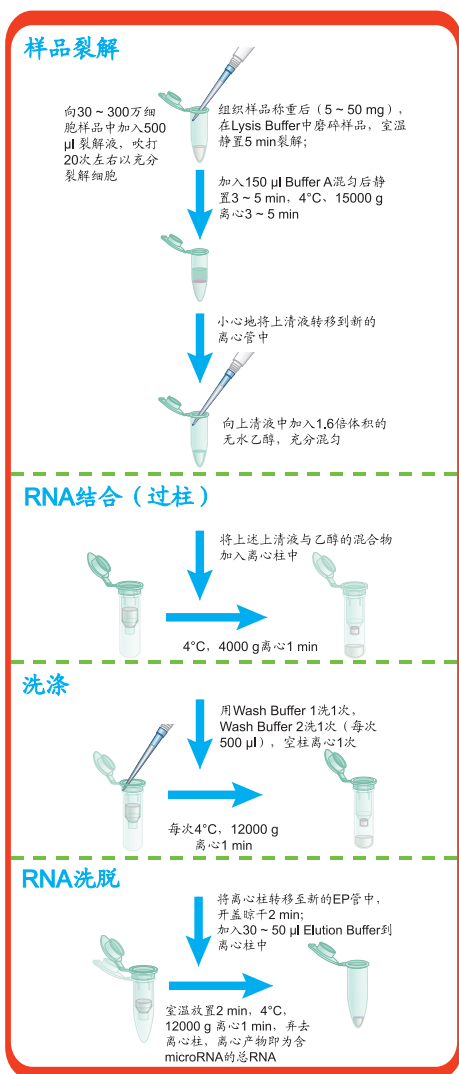
组分	EZB-miRN1 (50 Preps)
Lysis Buffer	30 ml
Buffer A	12 ml
Wash Buffer 1*	8 ml
Wash Buffer 2*	8 ml
Elution Buffer	10 ml
Spin Columns for RNA (with Collection Tubes)	50 Preps

注: *1. Wash Buffer 1和Wash Buffer 2首次使用前须加入32 ml的无水乙醇并充分混匀, 并在加入无水乙醇后在瓶身做好标记。

保存条件

Lysis Buffer和Buffer A需2~8°C避光保存, 其余组分室温保存(注: Buffer A在4°C保存时会出现结晶或冻结现象, 仅需在使用前置于室温融化后使用即可, 不影响使用)。有效期12个月。

实验流程



注意

1. Wash Buffer 1和Wash Buffer 2首次使用前须加入32 ml的无水乙醇并充分混匀(Wash Buffer 1和Wash Buffer 2与无水乙醇的体积比为1:4), 并在加入无水乙醇后在瓶身做好标记。
2. Elution Buffer使用前建议分装为3~4份保存, 以防污染。
3. 本试剂盒可用于组织和细胞样品microRNA的提取。
4. 建议用6孔板或35 mm培养皿培养细胞, 培养至细胞密度达到80%以上时进行miRNA提取, 不建议用100 mm培养皿培养的细胞直接裂解提取miRNA, 否则可能导致细胞裂解不充分或离心柱堵塞或导致基因组残留。
5. 本试剂盒中离心的过程都是在4°C的离心机中进行, 其余的操作步骤都是在室温中进行, 所以实验前需提前预冷离心机。
6. 样品裂解以后, 如果不打算继续进行RNA提取, 可将裂解产物转移到EP管中冻存在-80°C, 下次解冻后恢复到室温使用, 加Buffer A混匀, 继续进行后续的步骤即可。
7. RNA洗脱时一定要将洗脱液加到柱中央的膜上(如果洗脱液加到侧壁上, 会导致miRNA没有被溶解而使产量大大减少), 同时注意避免移液器枪尖将膜刺破。
8. 如果提取高脂肪含量组织(例如肝脏、脂肪)的miRNA, 则建议使用货号为“EZB-RN001A”的RNA提取试剂盒, 以获得更好的纯度。
9. 关于组织用量, 可参考如下表格:

组织种类	肿瘤、胚胎、心、肾、脾、胰脏、肺、眼	肌肉、皮肤、血管
参考用量(mg)	5~50	20~50

样品裂解

1A. 对于组织样品

a1. 取一定重量的组织样品放入1.5 ml EP管中【初次使用本试剂盒时, 建议使用精密天平称量1~2个样品, 称取5~50 mg, 其余样品根据称量过的样品体积, 切取相近体积的组织样品即可】, 加入500 μl裂解液(Lysis Buffer), 用电动研磨器或研磨棒对组织样品进行充分匀浆。

a2. 组织研磨均匀后室温静置5 min, 以充分裂解组织。

1B. 对于细胞样品

b1. 对于悬浮细胞样品: 取出30~300万细胞转移至1.5 ml EP管中, 500 g离心3 min, 弃净上清, 然后加入500 μl裂解液, 吹打10次左右以充分裂解细胞。

b2. 对于细胞数 $\leq 3 \times 10^6$ 的贴壁细胞样品: 弃去培养基, 贴壁轻轻加入PBS清洗细胞, 然后把PBS吸弃干净, 直接向培养皿中加入500 μl裂解液, 吹打10~20次左右以充分裂解细胞, 然后把裂解产物转移至1.5 ml EP管。

2. 向裂解产物中加入150 μl Buffer A, 用手快速剧烈振荡混匀15 sec(不建议涡旋混匀), 室温静置3~5 min。

3. 15000 g(约13000 rpm), 4°C离心3~5 min, 将上清液转移至新的1.5 ml EP管中(吸取上清液时不要吸到中间层和下层液体, 以免造成杂质残留)。

RNA结合(过柱)

4. 向吸出的上清中加入1.6倍体积的无水乙醇充分混匀。如果加入乙醇后出现沉淀, 建议用移液器吹打至沉淀不可见为止, 然后将样品转移至RNA离心吸附柱(Spin Column for RNA)中, 4000 g, 4°C离心1 min, 弃去液体。倒掉流出液后, 可以将收集管口朝下, 用吸水纸将收集管口残留的液体吸干净。

洗涤

5. 加入500 μl Wash Buffer 1到离心柱中, 12000 g, 4°C离心1 min; 小心取出离心柱, 倒掉流出液, 用吸水纸将收集管口残留的液体吸干净。(注意: 将离心柱从收集管中取出时, 应小心操作, 防止离心柱底部接触到液体)。

6. 加入500 μl Wash Buffer 2, 12000 g, 4°C离心1 min(洗柱)。倒掉废液, 用吸水纸将收集管口残留的液体吸干净。

7. 将离心柱放回收集管, 12000 g, 4°C离心1 min以充分去除残留的废液。

8. 弃去收集管, 将离心柱转移至无RNase的1.5 ml EP管中, 开盖晾干2 min。

RNA洗脱

9. 向离心柱中央的膜上加入30~50 μl洗脱液(Elution Buffer), 室温放置2 min。

10. 12000 g, 4°C离心1 min(可选操作: 在初次洗脱离心后, 将液体加回离心柱, 再放置5 min, 使RNA充分溶解后再次离心, 能增加RNA产量)。弃去离心柱, 所得的RNA(含miRNA的总RNA)应迅速转移至冰上放置并在充分混匀后进行浓度测定, 然后进行后续实验, 或储存于-80°C(因RNA不稳定, 建议尽快进行逆转录或其他后续实验)。

Universal microRNA Purification Kit Trouble Shooting

1、microRNA产量过低，或用已经验证过的引物检测基因表达，检测到的内参基因Ct值偏大，或无法做出正常的扩增结果。

解决办法：

a.检查所使用的试剂是否受到污染：可与未使用过的产品作对照，比较两组结果是否一致。建议试剂盒开封后，每种buffer分装为2份（可用15、50 ml离心管分装），每次使用时应严格按照规范操作，防止交叉污染。

b.溶解好的引物应该分装为小份冻存，以减少引物降解及降低污染的可能性。

c.检查操作流程是否正确。例如：

1.Wash Buffer使用前需加入标签所示体积的无水乙醇混匀才可使用。

2.组织样品裂解前须称重，研磨均匀后需室温静置5 min以充分裂解组织。裂解的组织加入Buffer A溶液混匀并静置后高速离心取上清。对于RNA含量丰富的组织（如肝脏），建议用量不多于10 mg，以免纯化的microRNA中混有大量不需要的5S rRNA。

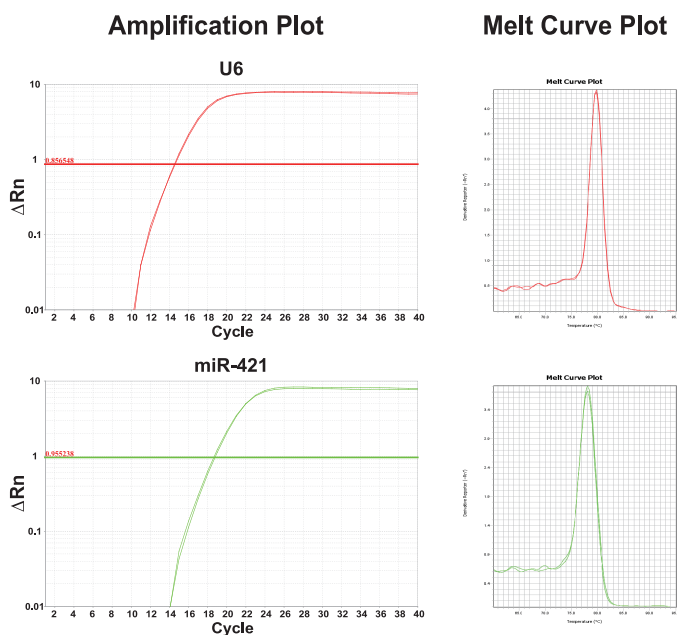
3.组织裂解产物加Buffer A溶液混匀静置离心后，取上清上柱前务必加入1.6倍体积的无水乙醇，充分混匀后加入离心柱中离心（重复过柱一次可以提高RNA纯化效率）。

4.洗涤时需用12000 g高速离心充分去除Wash Buffer，然后空柱离心一次，然后开盖晾干2 min（此步骤可防止Wash Buffer残留在柱上）。

5.洗脱液的体积可以根据需要在一定范围内调整（一般30 ~ 50 μ l，不可少于20 μ l，否则无法充分溶解microRNA），以浓度满足后续实验需求为宜。重复洗脱一次及延长放置时间至5 min均可提高microRNA产量。

代表性实验结果

本试剂盒用于提取 miRNA 的qPCR测试结果请见下图：



由上述qPCR的检测结果可见，本试剂盒能够很好的用于miRNA的提取。