

EZ-press microRNA Purification Kit PLUS 说明书

Cat.No.: B0005-plus

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

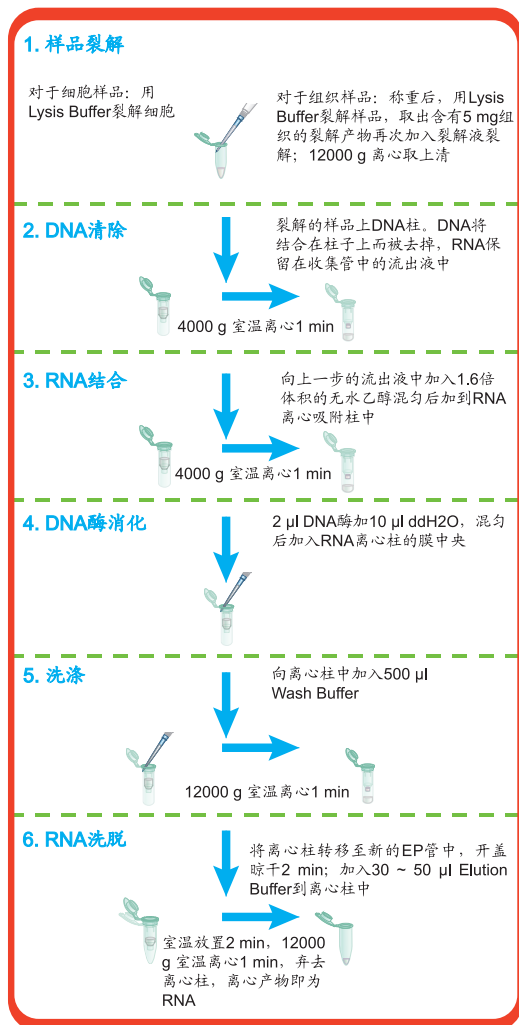
| 组分 | B0005-plus (50 Preps) |
|---|-----------------------|
| Lysis Buffer | 30 ml |
| Wash Buffer ¹ | 8 ml |
| Elution Buffer | 10 ml |
| gDNA Remover | 110 µl |
| DNA Removing Spin Columns (with Collection Tubes) | 50 Preps |
| Spin Columns for RNA (with Collection Tubes) | 50 Preps |

注：¹ Wash Buffer首次使用前，请加入32 ml的无水乙醇并充分混匀。

保存条件

本产品中的gDNA Remover置于-20°C保存；DNA Removing Spin Columns需避光保存在4°C；其余组分室温保存。有效期12个月。

实验流程



注意

1. Wash Buffer使用前须加入瓶身标签所示体积的无水乙醇混匀后才可使用。
2. 建议使用前把Elution Buffer分装为3~4份，以减小污染的概率。
3. RNA提取须在室温进行，提取过程中不可置于冰上。
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RNA提取，不建议用100 mm培养皿培养的细胞直接裂解提取RNA，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. 本试剂盒提取的是包含miRNA的总RNA。

样品裂解

1A. 对于细胞数 ≤ 3 × 10⁶ 的贴壁细胞样品：

- a) 弃去培养基，用PBS清洗细胞。
- b) 加入500 µl裂解液（Lysis Buffer），用移液器用力吹打10次，使细胞充分裂解。
- c) 将裂解产物转移至1.5 ml EP管中，用Vortex高速震荡10 sec，充分裂解细胞。

1B. 对于悬浮细胞或者细胞数 > 3 × 10⁶ 的贴壁细胞样品：

- a) (悬浮细胞直接从下一步开始) 用胰酶消化细胞，然后加培养基终止消化。
- b) 取出约1 × 10⁶ 细胞转移至1.5 ml EP管中，500 g离心3~5 min，弃净上清。
- c) 加入500 µl裂解液，用涡旋振荡器高速震荡10 sec，以便细胞被充分裂解。

1C. 对于动物组织样品（适合内脏、胚胎、肿瘤等易裂解的组织，不适合皮肤等坚韧组织），坚韧的组织建议用EZB-miRN1：

- a) 取1~100 mg组织样品放入1.5 ml EP管中，加入300 µl裂解液，用研磨棒或电动研磨器对组织样品进行匀浆。
- b) 若组织重量 < 5 mg，直接进入步骤c)。若组织重量 > 5 mg，吸取含有5 mg组织的裂解产物到新的1.5 ml EP管中，加入裂解液至300 µl，再次研磨，直至液体呈均一浆状。
- c) 室温放置5 min。用涡旋振荡器高速震荡10 sec，以充分裂解组织。12000 g离心2 min，将上清转移至新的1.5 ml EP管中（切勿吸到杂质）。

DNA清除（过DNA柱）

2. 将上述细胞或组织裂解产物转移至DNA柱（DNA Removing Spin Column）中，4000 g离心1 min，保留收集管中的流出液，弃去离心柱。

RNA结合（过RNA柱）

3. 向上述流出液中加入1.6倍体积的无水乙醇，吹打10下使之充分混匀。然后将样品转移至RNA离心柱（RNA Spin Column）中，4000 g离心1 min（若离心后柱中有液体残留，可用12000 g再次离心1 min），弃去液体。

DNA酶消化

4. 每个样品按照2 µl DNA酶（gDNA Remover）加10 µl ddH₂O（需灭菌的），吹吸10下混匀后加入RNA离心柱中央的膜上，室温放置5 min，以充分降解可能残留的微量基因组DNA。

洗涤

- 5 加入500 µl 洗涤液（已加入无水乙醇的Wash Buffer）到离心柱中，12000 g离心1 min。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（建议操作：倒掉液体后，可将收集管倒扣在吸水纸上轻轻叩击两下，然后将离心柱放回收集管，12000 g空柱离心1 min）。

6. 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

- 7 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。

8. 12000 g离心1 min（可选操作：在初次洗脱离心后，可以将液体加回离心柱，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）应迅速转移到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备用（因RNA不稳定，建议尽快进行逆转录或其他后续实验）。

EZ-press microRNA Purification Kit PLUS Trouble Shooting

1. miRNA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. 整个RNA提取的操作过程必须在室温进行，不可置于冰上（直至洗脱离心后得到RNA方可置于冰上），以避免其间产生不溶物堵塞离心柱。

2. Wash Buffer使用前需加入32 ml无水乙醇混匀后才可使用。

3. 组织样品裂解前须称重，如果超过5 mg需要研磨两次（详见操作步骤），用Vortex充分振荡混匀，高速离心取上清。

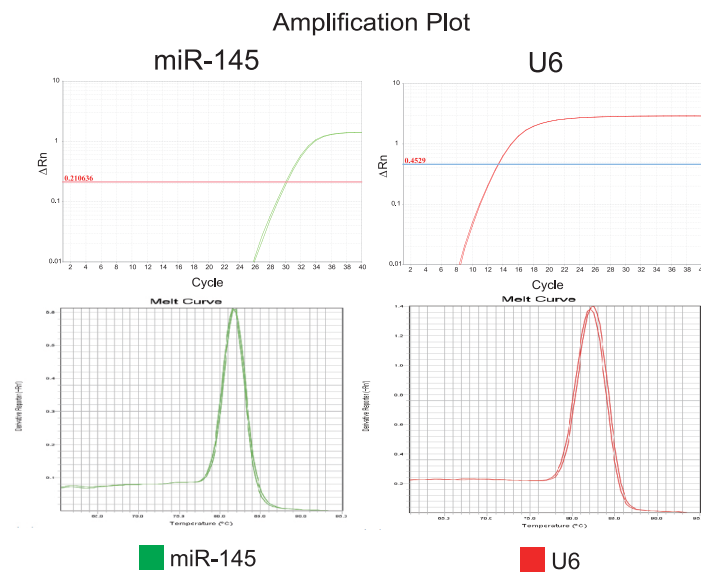
4. 裂解产物（或组织裂解、离心后的上清）直接加入DNA清除柱，4000 g离心1 min，保留流出液，弃去DNA清除柱。

5. 上述清除DNA后的产物中，需要加入1.6倍体积的无水乙醇，混匀后加入RNA离心吸附柱中，使miRNA与RNA离心吸附柱充分结合。

6. 洗涤时需用12000 g高速离心充分去除Wash Buffer，然后开盖晾干2 min。

7. 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，最少不可少于20 μ l，否则无法充分溶解miRNA），以浓度满足后续实验需求为宜。

代表性实验结果



上图：EZ-press microRNA Purification Kit PLUS提取A549细胞的miRNA后，分别使用针对miR-145和U6的特异性引物进行逆转录，然后进行qPCR检测的结果。结果显示，miR-145与U6均能被高效率、特异性的检测到。表明该试剂盒能够快速、高效率的提取microRNA。