

天  
净  
沙  
系  
列

CAT#:80104-50  
常温运输和保存

**TIANDZ**

一站式柱式 miRNA<sub>OUT</sub>

One-Stop Column miRNA<sub>OUT</sub>

使用手册 V1.2

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: [www.tiandz.com](http://www.tiandz.com); 电话: 400-6765278; 电邮: [order@tiandz.com](mailto:order@tiandz.com)

<p><b>产品及特点</b></p>	<p>本产品是在天泽基因 miRNAout (CAT#:70501)基础上自主开发的柱式升级产品,是目前国内外市场上最快速最简单的小 RNA 分离纯化产品。它具有下列特点:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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。</li> <li>2. 柱式操作,比 miRNAout 更加简单快捷,整个过程只需要十多分钟。</li> <li>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。</li> <li>4. 小 RNA 纯净,OD260/280 一般都在 1.9 以上。</li> <li>5. 产率一般为 20-40 ug/100 mg 动物组织。</li> <li>6. 无基因组 DNA 的污染。</li> <li>7. 可用于 RT-PCR、miRNA 标记、microarray 等后续实验。</li> </ol>																													
<p><b>规格及成分</b></p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>大包装包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>柱式 miRNA 纯化溶液 A</td> <td>80104a</td> <td>25 mL</td> </tr> <tr> <td>柱式 miRNA 纯化溶液 B</td> <td>80104b</td> <td>25 mL</td> </tr> <tr> <td>柱式 miRNA 纯化溶液 C</td> <td>80104c</td> <td>50 mL</td> </tr> <tr> <td>离心吸附柱 (广口)</td> <td>60911</td> <td>50 套</td> </tr> <tr> <td>离心吸附柱 (窄口)</td> <td>170606</td> <td>50 套</td> </tr> <tr> <td>miRNA 专用洗柱液</td> <td>80104d</td> <td>50 mL</td> </tr> <tr> <td>RNA 洗脱液</td> <td>71207</td> <td>10 mL</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>80104sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成份	编号	大包装包装	柱式 miRNA 纯化溶液 A	80104a	25 mL	柱式 miRNA 纯化溶液 B	80104b	25 mL	柱式 miRNA 纯化溶液 C	80104c	50 mL	离心吸附柱 (广口)	60911	50 套	离心吸附柱 (窄口)	170606	50 套	miRNA 专用洗柱液	80104d	50 mL	RNA 洗脱液	71207	10 mL	使用手册	80104sc	1 份
成份	编号	大包装包装																												
柱式 miRNA 纯化溶液 A	80104a	25 mL																												
柱式 miRNA 纯化溶液 B	80104b	25 mL																												
柱式 miRNA 纯化溶液 C	80104c	50 mL																												
离心吸附柱 (广口)	60911	50 套																												
离心吸附柱 (窄口)	170606	50 套																												
miRNA 专用洗柱液	80104d	50 mL																												
RNA 洗脱液	71207	10 mL																												
使用手册	80104sc	1 份																												
<p><b>运输及保存</b></p>	<p>常温运输和保存,有效期一年。</p>																													
<p><b>自备试剂</b></p>	<p>氯仿。</p>																													
<p><b>使用方法</b></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,可以在 1.5 mL 塑料离心管中。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"> <li>1. 新鲜配制裂解液。将溶液 A 和溶液 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:溶液 A 和溶液 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"> <li>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</li> </ol> </li> </ol>																													

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  $1 \times 10^6$  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<sub>LOCKER</sub> 等非冻型保存液中保存的动物或植物实体组织组织：先用纸吸去 RNA<sub>LOCKER</sub> 液体后再剪切成小块，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. 12000-15000 g 室温离心 3-5 分钟。
  4. 将上清液（约 0.6-0.8 mL）转移到广口的离心吸附柱中。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。不要使用专门吸附小 RNA 的窄口离心吸附柱。
  5. 12000-15000 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。如果不减少上样量，也可以将穿透液再次重复上柱以去除大 RNA。由于此时离心吸附柱已经吸附了大 RNA，所以需要提前对离心吸附柱进行预处理（具体步骤见本手册最后的附录）。
  6. 在最后得到的不含大 RNA 的穿透液加等体积的溶液 C，混匀。此时溶液的总积约 1.5 mL。
  7. 先转移约 0.75mL 到窄口的离心吸附柱中，12000-15000 g 室温离心半

	<p>分钟，弃收集管中的穿透液。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>8. 将上步上柱剩余的样品转移到离心吸附柱中，12000-15000 g 室温离心半分钟，弃收集管中的穿透液。</li> <li>9. 加 0.7mL miRNA 专用洗柱液到离心吸附柱中，12000-15000 g 室温离心半分钟，弃穿透液。</li> <li>10. 加 0.3mL miRNA 专用洗柱液到离心吸附柱中，12000-15000 g 室温离心半分钟，弃穿透液。此步一般可以省略。</li> <li>11. 12000-15000 g 室温离心半分钟以甩出残联液体。此步十分重要，否则残留的 miRNA 专用洗柱液会影响 miRNA 的使用。</li> <li>12. 将离心吸附柱转移到一自备的 RNase-free 收集管中，加入 30-50uL RNA 洗脱液，室温放置 3-5 分钟。</li> <li>13. 12000-15000 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。</li> </ol> <p>附录：宽口离心吸附柱反复上样去除大 RNA 的流程</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 将结合有大 RNA 和 DNA 的宽口离心吸附柱中加入 0.1mL 自备的超纯水，12000-15000 g 室温离心半分钟，弃收集液。</li> <li>2. 再加 0.1mL 自备的超纯水，重复上步一次。</li> <li>3. 将第 5 步的得到、需要进一步去除其中大 RNA 和 DNA 污染的穿透液直接上柱，12000-15000 g 室温离心半分钟，收集穿透液（此穿透液含小 RNA）。</li> <li>4. 如果大 RNA 已经去干净，可以直接进入第 6 步。一般样品只需要额外处理一次就可以去除全部的大 RNA 污染。</li> </ol>
<p><b>关联试剂</b></p>	<p>一站式 miRNA 尿素-PAGE 电泳套装（产品编号：70606）</p>