

天
净
沙
系
列

CAT#:180808-50
常温运输和保存

TIANDZ

柱式大 RNA-miRNA 双提试剂盒 Column RNA-miRNAout

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; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

产品及特点	本产品是在天泽基因在柱式 RNA 提取产品基础上自主开发的大 RNA-miRNA 双提产品。它具有下列特点： 1. 一款试剂盒两用，同时分离纯化大 RNA（mRNA、18S rRNA、28S rRNA）和 miRNA（5S rRNA、tRNA、miRNA、Pre-miRNA、pri-miRNA、siRNA、shRNA 和 snRNA 等）。 2. 柱式连贯操作，比市场上的两步法（先分离总 RNA 再从中纯化其中的 miRNA）更简单快捷。 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。 4. RNA 纯净，OD260/280 一般都在 1.9 以上。 5. 可用于 RT-PCR、miRNA 标记、microarray 等各种后续实验。			
规格及成分		成 份	编 号	大纸盒包装
		RNA 双提溶液 A	180808a	25 mL
		RNA 双提溶液 B	180808b	25 mL
		RNA 双提溶液 C	180808c	50 mL
		离心吸附柱（宽口）	60911a	50 套
		离心吸附柱（窄口）	60911b	50 套
		通用洗柱液	60408	50 mL
		miRNA 专用洗柱液	180808d	50 mL
		RNA 洗脱液	71207	10 mL
		使用手册	180808sc	1 份
运输及保存	常温运输和保存，其中溶液 A 长期保存需要放 4℃，有效期一年。			
自备试剂	氯仿。			
使用方法	下列操作是从 100mg 样品中同时提取大 RNA 和 miRNA 的操作。如果只需要大 RNA 或 miRNA，则不相关操作可以跳过。 一、通用步骤 1. 新鲜配制裂解液。将溶液 A 和溶液 B 按 1:1 的比例混合得裂解液，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。 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 1×10^6 个细胞。 c) 对新鲜的动物组织：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，用匀浆器匀浆 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。 d) 对新鲜的植物组织：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，用匀浆器匀浆 30 秒左右。 e) 对非冻型组织 RNA 保存液保存的动物或植物组织：先用纸吸去保存液后再剪切成小块，放入 10 mL-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，用匀浆器匀浆 30 秒左右。 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. 14000 g 室温离心 5 分钟。 4. 将上层水相（约 0.6-0.8 mL）转移到一个宽口离心吸附柱中以吸附大 RNA。注意：当样品的比重大时，可能上层是有机相，下层才是水相。两相之间含有 DNA 和蛋白质，避免触及，否则将产生蛋白质和 DNA 污染。 5. 14000 g 室温离心半分钟，大 RNA 将与宽口离心吸附柱的膜结合，miRNA 将存在于穿透液中。注意：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，如果样品中的大 RNA 含量高于上面数值，则大 RNA 也会进入穿透液，因此不要超载。 二、大 RNA 提取步骤 6. 加 0.7mL 通用洗柱液到宽口离心吸附柱中，14000 g 室温离心半分钟，弃穿透液。 7. 再加 0.3mL 通用洗柱液到宽口离心吸附柱中，14000 g 室温离心半分钟，弃穿透液。 8. 14000 g 室温离心半分钟以甩出残留液体。此步十分重要，否则残留的通用洗柱液会影响大 RNA 的使用。 9. 将宽口离心吸附柱转移到一干净的 RNase-free 离心管中，加入 50uL RNA 洗脱液。 10. 14000 g 室温离心半分钟，离心管中溶液即为大 RNA 样品，可以立即使
--	---

	用（电泳、测 OD，RT-PCR 等）或存放于-80℃待用。 三、miRNA 提取操作 11. 在第 5 步所得的穿透液上加等体积的溶液 C，所得混合液总体积约为 1.5 mL)，颠倒混匀。 12. 先转移 0.7mL 混合液到一窄口离心吸附柱中，室温静置 5 分钟。 13. 14000g 室温离心半分钟。注意：由于 miRNA 太短，挂膜效率较低，因此大约有 30%左右的 miRNA 还在穿透液中,如果需要回收这些 miRNA，可以将收集管中的穿透液转移到一新离心管中保存，稍后按附录的沉淀法进一步回收。如果不需要则弃之。 14. 再转移 0.7mL 混合液到窄口离心吸附柱中，室温静置 5 分钟。 15. 14000 g 室温离心半分钟。将收集管中的穿透液和上步所得的穿透液汇集，（如果需要回收其中的 miRNA）或弃之（如果不需要回收其中的 miRNA) 16. 加 0.7mL miRNA 专用洗柱液到窄口离心吸附柱中，14000 g 室温离心半分钟，弃穿透液。 17. 再加 0.3mL miRNA 专用洗柱液到同一窄口离心吸附柱中，14000 g 室温离心半分钟，弃穿透液。 18. 14000 g 室温离心半分钟以甩出残留液体。此步十分重要，否则残留的 miRNA 专用洗柱液会影响 miRNA 的使用。 19. 将窄口离心吸附柱转移到一干净的 RNase-free 离心管中，加入 30uL RNA 洗脱液。 20. 14000 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（电泳、测 OD，RT-PCR 等）或存放于-80℃待用。 附录 1：从第 15 步所得穿透液中用沉淀法回收残留的 miRNA 21. 将穿透液在 14000 g 室温离心 20-30 分钟。 22. 小心吸弃上清。注意不要碰及管内的离心面，miRNA 将在此面形成沉淀。 23. 加入 1mL 自备的 75%乙醇，14000 g 室温离心 5 分钟。。 24. 小心吸弃上清。注意不要碰及管内的离心面。 25. 14000 g 室温离心半分钟，小心吸弃残留液体，不要碰及管内的离心面。 26. 加入 20uL RNA 洗脱液吹打溶解管底和管壁的 miRNA 沉淀。所得溶液即为 miRNA 样品，可以立即使用或存放于-80℃待用。
关联产品	Trizol 伴侣 (CAT#:81027)