

Version: AC 6.0 (2024.02.22修订)

# SPARKeasy Animal Tissue/Cell microRNA Kit

## 动物组织/细胞microRNA快速提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: AC1501

### 01/产品组分

序号	组分	50 次 AC1501
1	Lysis/Binding buffer	50 mL
2	70%乙醇	9 mL RNase Free H <sub>2</sub> O 第一次使用前加入 21 mL 无水乙醇
3	Wash Solution 1	12 mL 第一次使用前加入 28 mL 无水乙醇
4	Wash Solution 2/3	10 mL 第一次使用前加入 42 mL 无水乙醇
5	RNase Free H <sub>2</sub> O	10 mL
6	吸附柱 RA 和收集管	50 套
7	microRNA 吸附柱 MA 和收集管	50 套
8	RNase-Free 收集管 (1.5 mL)	50 个

### 02/保存条件

Lysis/Binding buffer 于 4°C 避光保存, 其他组分室温 (15-25°C) 保存。

### 03/产品概述

近年来对 RNA 干扰和调节性小 RNA 的广泛研究迫切需要一种能有效提取 15-30 nt 左右大小 RNA (包括 siRNA 和 miRNA) 的试剂盒。但是传统的 RNA 提取方法如硅胶膜法不能有效吸附回收, 酚/胍抽提和乙醇沉淀并不能有效沉淀回收微小分子 RNA。

本试剂盒采用独特的裂解液/ $\beta$ -巯基乙醇能迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶, 去除蛋白和 DNA, RNA 包括微小分子 RNA 吸附于离心柱内特殊硅基质膜, 再通过一系列快速的去蛋白、漂洗的步骤将细胞代谢物、蛋白等杂质去除, 最后低盐的洗脱液将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。该产品可在一小时之内完成样品 RNA 的提取, 提取的总 RNA 完整性好, 无蛋白和基因组 DNA 污染。

### 04/自备材料

无水乙醇、氯仿

## 05/注意事项

### 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 第一次使用前请先在 70%乙醇、Wash Solution 1 瓶和 Wash Solution 2/3 瓶中加入指定量无水乙醇，加入后请及时打钩标记，以免多次加入！
- ◇ Wash Solution 2/3 加入无水乙醇使用几天后可能出现沉淀晶体，并不影响使用，直接吸上清使用即可。
- ◇ 各溶液使用后应及时盖紧盖子，避免试剂长时间暴露于空气中。
- ◇ Lysis/Binding buffer 和 Wash Solution 1 含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤、眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或生理盐水冲洗。
- ◇ 所有离心操作步骤，均可在室温（15-25°C）下进行。

## 06/使用方案（提取包含microRNA的总RNA）

### 1. 样本处理

#### ◆组织培养细胞

- a. 收集 $<10^7$ 悬浮细胞到一个 1.5 mL 离心管。（对于贴壁细胞，孔板培养和细胞瓶培养的可以直接裂解，尽可能吸干净所有培养液残留后直接加入 1 mL 的 Lysis/Binding buffer，迅速轻摇使 Lysis/Binding buffer 充分和瓶底所有细胞接触，裂解细胞并灭活 RNA 酶，用移液器轻轻反复吹打混匀接操作步骤 2。）
- b. 12,500 rpm（14,500×g）离心 10 s（或 300×g 离心 5 min），使细胞沉淀下来。完全吸弃上清，留下细胞团，注意不完全弃上清会稀释裂解液导致产量纯度降低。
- c. 轻弹管壁将细胞沉淀完全松散重悬，加入 1 mL Lysis/Binding buffer，涡旋或吹打，充分裂解混匀。
- d. 接操作步骤 2。

#### ◆动物组织（例如鼠肝脑）

- a. 新鲜组织用解剖刀迅速切成小碎块，根据处理组织的质量，50-100 mg 加入 1 mL 的 Lysis/Binding buffer 后彻底匀浆，或在液氮中研磨组织成细粉后，取适量组织细粉（约 50-100 mg）转入装有 1 mL Lysis/Binding buffer 的 1.5 mL 离心管中，剧烈吹打涡旋混匀。
- b. 可选，一般不需要：如果处理量大，有明显颗粒或者不溶物，非常粘稠或者裂解不充分，可立即用移液器抽打裂解物 10 次或直到得到满意匀浆结果（或电动匀浆 30 s），可以剪切 DNA，降低粘稠度和提高产量。

c. 接操作步骤 2。

2. 室温放置 5 min 以充分分离核酸蛋白复合物。
3. 加入 200  $\mu\text{L}$  氯仿，剧烈振荡 15 s。
4. 室温放置 2-3 min，12,500 rpm (14,500 $\times$ g) 离心 10 min。
5. 取上清 (约 600  $\mu\text{L}$ ) 转入新的离心管，加入 1.5 倍体积的无水乙醇 (必须是室温的，通常 900  $\mu\text{L}$ )，涡旋混匀。此时可能出现沉淀，但不影响提取过程，立即吹打混匀，不要离心，立刻接下一步。
6. 将混合物 (每次小于 700  $\mu\text{L}$ ，多可以分两次加入) 加入一个吸附柱 RA 中 (吸附柱放入收集管中)，12,000 rpm (13,400 $\times$ g) 离心 30-60 s，弃废液。
7. 加 700  $\mu\text{L}$  Wash Solution 1 (请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000 rpm (13,400 $\times$ g) 离心 30 s，弃废液。
8. 加入 500  $\mu\text{L}$  Wash Solution 2/3 (请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000 rpm (13,400 $\times$ g) 离心 30 s，弃废液。重复此步骤。
9. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，12,500 rpm (14,500 $\times$ g) 离心 2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
10. 取出吸附柱 RA，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 30-50  $\mu\text{L}$  RNase Free H<sub>2</sub>O (事先在 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热效果更好)，室温放置 1 min，12,000 rpm (13,400 $\times$ g) 离心 1 min。
11. 如果预期 RNA 产量 > 30  $\mu\text{g}$ ，加 30-50  $\mu\text{L}$  RNase Free H<sub>2</sub>O 重复步骤 10，合并两次洗脱液或使用第一次的洗脱液加回到吸附柱重复洗脱一遍。

▲使用第一次洗脱液重复洗脱两遍的 RNA 浓度高，分两次洗脱合并洗脱液的 RNA 产量比前者高 15-30%，但是浓度要低，用户可根据需要选择。

#### ◇ RNA 提取方法



## 附录:

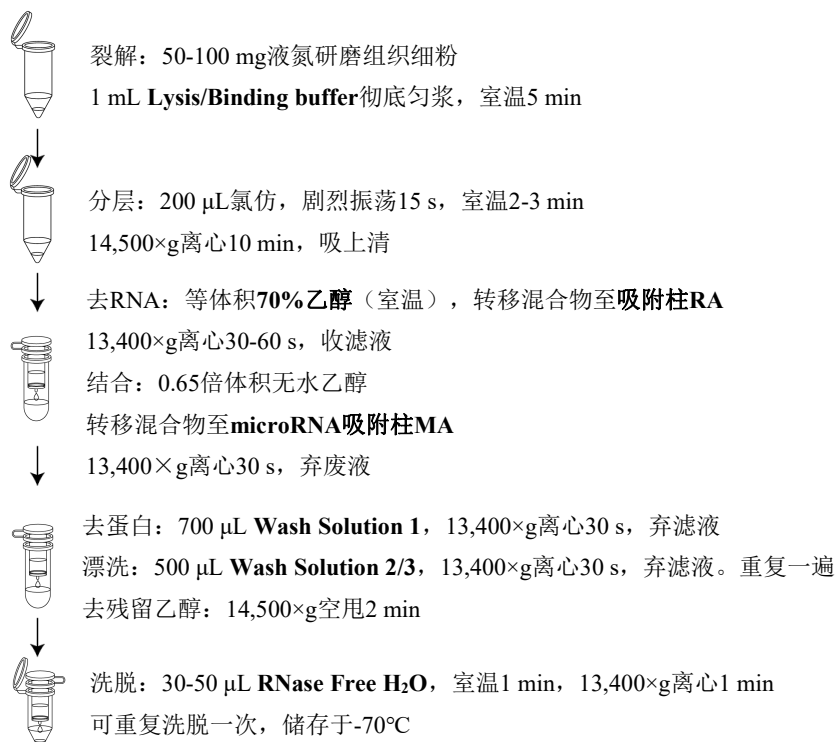
**microRNA 富集方法 (仅提取 microRNA, 不包含>200 nt 其它总 RNA 成份)**

1. 按照前面标准操作步骤 1-4 操作, 直到得到上清。
2. 较精确估计上清体积 (约 600  $\mu\text{L}$ ), 加入等体积 70%乙醇 (请先检查是否已加入无水乙醇! 无水乙醇必须是室温的), 涡旋或者吹打充分混匀, 不要离心。
3. 将混合物加入一个吸附柱 RA 中 (吸附柱放入收集管中), 12,000 rpm (13,400 $\times$ g) 离心 30-60 s, 收集滤过物。将滤过物从收集管转移到一个新的离心管后, 把吸附柱子放回空的收集管内, 再加入剩下的混合物离心, 收集滤过物。合并两次滤过物, 计算体积。

▲此时, 滤过物含有 microRNA, 吸附柱上是除去了 microRNA 的总 RNA (不包含 microRNA), 如果需要, 可以按照前面标准操作步骤 7-11 操作, 回收得到去除了 microRNA 的总 RNA。

4. 较精确估计滤过物体积, 加入 0.65 倍体积无水乙醇 (必须是室温的), 涡旋或者吹打充分混匀, 不要离心。
5. 取一套新的 microRNA 吸附柱 MA, 将上一步骤混合物 (每次小于 700  $\mu\text{L}$ , 可以分两次加入) 加入 microRNA 吸附柱 MA 中 (吸附柱放入收集管中), 12,000 rpm (13,400 $\times$ g) 离心 30 s, 弃掉废液。
6. 按照前面标准操作步骤 7-11 操作, 得到富集的 microRNA。

▲不同的实验可以选择不同的方法, 例如 Northern Blot 或者表达芯片谱分析可以选择提取包括 microRNA 的总 RNA。富集方法提取的 microRNA 因为去除了较大片段的 mRNA 和 rRNA 等, 可能减少某些下游试验的扩增背景, 当背景较高或者非特异扩增较多时, 可以尝试使用富集方法提取的 microRNA。

◇ **microRNA 提取方法**

## 07/相关产品

- AC0202 SPARKeasy 组织/细胞快速提取试剂盒（含基因组 DNA 清除柱）
- AC0205 SPARKeasy 细胞RNA快速提取试剂盒
- AG0501 SPARKScript miRNA 1st strand cDNA synthesis kit(Tailing Reaction)
- AG0502 SPARKScript II miRNA 1st strand cDNA synthesis kit(By stem-loop)
- AH0104 2×SYBR Green qPCR Mix（With ROX）

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: [support@sparkjade.com](mailto:support@sparkjade.com)

