

Version: AC 6.0 (2024.02.22修订)

SPARKeasy Plant microRNA Kit

植物microRNA快速提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: AC1502

01/产品组分

序号	组分	50 次 AC1502
1	裂解液 RLT Plus	50 mL
2	PLANTspark	5 mL
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 ₂ O	10 mL
6	基因组 DNA 清除柱 和收集管	50 套
7	RNase Free 吸附柱 RA 和收集管	50 套
8	RNase-Free 收集管 (1.5 mL)	50 个

02/保存条件

所有组分均室温 (15-25°C) 保存。

03/产品概述

该试剂盒内独特的裂解液能迅速裂解细胞和灭活细胞 RNA 酶, 植物 RNA 助提剂 PLANTspark 帮助结合多糖多酚并通过离心去除, 裂解混合物通过基因组 DNA 清除柱, 基因组 DNA 被清除而 RNA (包括 microRNA) 被选择性滤过。滤过的 RNA 用乙醇调节结合条件后, 在高离序盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜, 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 RNase Free H₂O 将纯净 RNA (包括 microRNA) 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。

通过采用分提取操作步骤, 也可单独纯化富集后的 microRNA 组分和总 RNA (>200 nt) 从而得到分离富集的 microRNA 和 RNA。

04/自备材料

无水乙醇、 β -巯基乙醇

05/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 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。
- ◇ 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。
- ◇ 样品处理量绝对不要超过基因组 DNA 清除柱和 RNA 吸附柱 RA 的处理能力，否则会造成 DNA 残留或产量降低。若不清楚样品 DNA/RNA 含量，可使用较少的样品处理量，再根据样品实验情况增加或减少样品量。
- ◇ 裂解液 RLT Plus 和 Wash Solution 1 中含有刺激性化合物，操作时戴乳胶手套，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℃）下进行。
- ◇ 对于 RNA 酶或多酚特别丰富的植物组织，操作前需在裂解液 RLT Plus 中加入 β -巯基乙醇至终浓度 1%，如 1 mL RLT Plus 中加 10 μ L β -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RLT Plus 4℃可放置一个月。

06/使用方案（提取包含microRNA的总RNA）

1. 样本处理

● 直接研磨法（提取简单植物样品推荐此法，也可以用液氮研磨法）：

- a. 新鲜植物组织称重后取 100 mg-200 mg 迅速剪成小块放入研钵（冰冻保存或液氮保存样品可直接称重后取 100 mg-200 mg 放入研钵），加入 10 体积（1 mL）RLT Plus 和 1 体积（100 μ L）PLANTspark 室温下充分研磨成匀浆，注意应该迅速研磨让组织和裂解液 RLT Plus 立刻充分接触以抑制 RNA 酶活性。
▲ PLANTspark 主要用于提取多糖多酚次级代谢产物及色素含量丰富的困难样品。
- b. 将裂解物转入离心管，剧烈摇晃振荡 15 s，12,500 rpm（14,500 $\times$ g）离心 5-10 min，沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的 PLANTspark。
- c. 取裂解物上清（在不超过基因组 DNA 清除柱能力的情况下取更多的上清，可以提高产量，如残留基因组 DNA 较多，可适当减少取上清量），将裂解物上清加到 DNA 清除柱上（清除柱放在收集管内）。
- d. 立刻接操作步骤 2。

● 液氮研磨法（提取复杂，易降解样品时推荐此法）：

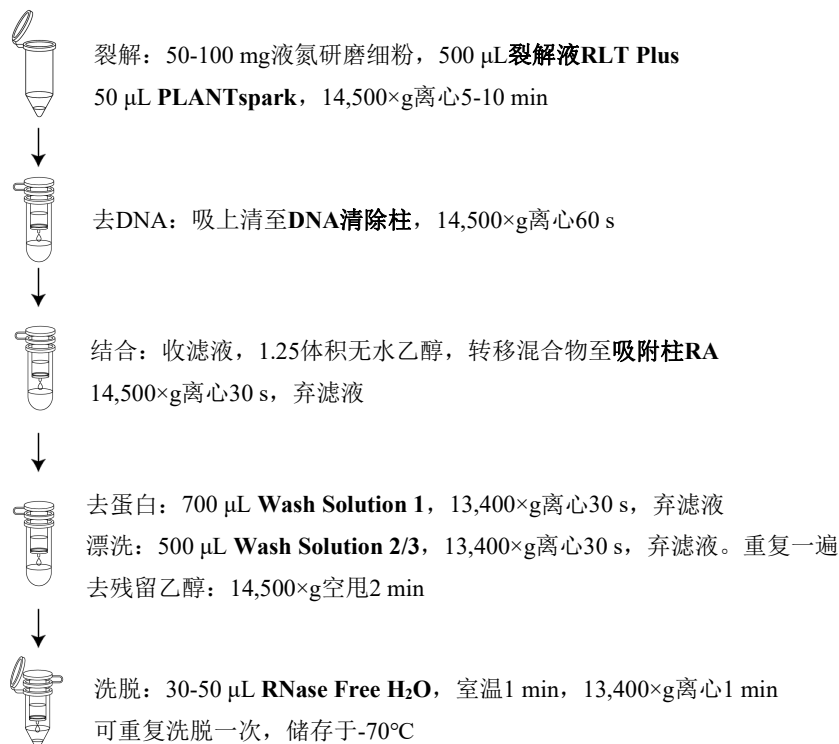
- a. 取 500 μ L 裂解液 RLT Plus，转入 1.5 mL 离心管中，加 50 μ L PLANTspark 混匀备用。

- b. 液氮中研磨适量植物组织成细粉后，取 50 mg-100 mg 细粉转入上述装有 RLT Plus 和 PLANTspark 的离心管，立即用手剧烈振荡 20 s，充分裂解。
- c. 用吸头吹打混匀帮助裂解或剧烈涡旋震荡直到得到满意的匀浆结果（或者电动匀浆 30 s），可以剪切 DNA，降低粘稠度和提高产量。
- d. 将裂解物 12,500 rpm（14,500×g）离心 5-10 min，沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的 PLANTspark。
- e. 取裂解物上清（在不超过基因组 DNA 清除柱能力的情况下，取更多的上清可以提高产量），将裂解物上清加到 DNA 清除柱上（清除柱放在收集管内）。
- f. 立刻接操作步骤 2。

▲用户可以根据需要加倍处理液氮研磨法的样本，提高产量。也就是使用 1 mL 的裂解液 RLT Plus 和 100 μL PLANTspark 和 100 mg-200 mg 的样品。

2. 立即 12,500 rpm（14,500×g）离心 60 s，收集滤液（RNA 在滤液中）。
3. 用微量移液器较精确估计滤过液体积（480 μL 左右，滤过时的损失体积应该减去），加入 1.25 倍体积的无水乙醇，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。
4. 立刻将混合物（每次小于 700 μL，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），12,500 rpm（14,500×g）离心 30 s，弃废液。
▲确保离心后液体全部滤过去，膜上没有残留，如有必要，可以加大离心力和离心时间。
5. 加 700 μL Wash Solution 1（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000 rpm（13,400×g）离心 30 s，弃废液。
6. 加入 500 μL Wash Solution 2/3（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000 rpm（13,400×g）离心 30 s，弃废液。重复此步骤。
7. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，12,500 rpm（14,500×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。
8. 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 μL RNase Free H₂O，室温放置 1 min，12,000 rpm（13,400×g）离心 1 min。
▲将洗脱液加回到吸附柱重复洗脱一遍可以提高产量约 10-15%。
9. 得到的 RNA/microRNA 可以立即用于下游反应或尽快置于低温保存。

◇ RNA 提取方法



附录:

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

- ◇ 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶加入指定量无水乙醇!
- ◇ 对于 RNA 酶或多酚特别丰富的植物组织: 操作前在裂解液 RLT Plus 中加入 β -巯基乙醇至终浓度 1%, 如 1 mL RLT Plus 中加入 10 μL β -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配, 配好的 RLT Plus 4°C可放置一个月。

1. 样本处理

● 直接研磨法 (提取简单植物样品推荐此法, 也可以用液氮研磨法):

- a. 新鲜植物组织称重后取 100 mg-200 mg 迅速剪成小块放入研钵 (冰冻保存或者液氮保存样品可直接称重后取 100 mg-200 mg 放入研钵), 加入 10 体积 (1 mL) RLT Plus 和 1 体积 (100 μL) PLANTspark 室温下充分研磨成匀浆, 注意应该迅速研磨让组织和裂解液 RLT 立刻充分接触以抑制 RNA 酶活性。

▲PLANTspark 主要用于提取多糖多酚次级代谢产物及色素含量丰富的困难样品。

- b. 将裂解物转入离心管, 剧烈摇晃振荡 15 s, 12,500 rpm (14,500 $\times$ g) 离心 5-10 min, 沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的 PLANTspark。
- c. 取裂解物上清 (在不超过基因组 DNA 清除柱能力的情况下, 取更多的上清可以提高产量, 如残留基因组 DNA 较多, 可适

当减少取上清量) 转到一个新离心管。加入上清体积一半的无水乙醇 (0.5 体积), 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即吹打混匀, 不要离心。

d. 立刻接富集方法的步骤 2。

● 液氮研磨法 (提取复杂、易降解样品时推荐此法):

a. 取 500 μ L 裂解液 RLT Plus, 转入 1.5 mL 离心管中, 加 50 μ L PLANTspark 混匀备用。

b. 液氮中研磨适量植物组织成细粉后, 取 50 mg-100 mg 细粉转入上述装有 RLT Plus 和 PLANTspark 的离心管, 立即用手剧烈振荡 20 s, 充分裂解。

c. 用移液器吹打混匀帮助裂解或剧烈涡旋震荡直到得到满意匀浆结果 (或者电动匀浆 30 s), 可以剪切 DNA, 降低粘稠度和提高产量。

d. 将裂解物 12,500 rpm (14,500 $\times$ g) 离心 5-10 min, 沉淀不能裂解的碎片和结合有多糖多酚的 PLANTspark。

e. 取裂解物上清 (在不超过基因组 DNA 清除柱能力的情况下取更多的上清可以提高产量) 转到一个新离心管。加入上清体积一半的无水乙醇 (0.5 体积), 此时可能出现沉淀, 但是不影响提取过程, 立即吹打混匀, 不要离心。

f. 立刻接富集方法的步骤 2。

▲以上液氮研磨法用户可以根据需要加倍处理, 可以提高产量。也就是使用 1 mL 的裂解液 RLT Plus 和 100 μ L PLANTspark 和 100 mg-200 mg 的样品。

2. 将混合物 (每次小于 720 μ L, 多可以分两次加入) 加入一个基因组清除柱中, (清除柱放入收集管中) 12,500 rpm (14,500 $\times$ g) 离心 2 min, 保留滤液 (microRNA 在滤液中)。

▲此时, 滤过液含有 microRNA, 基因组 DNA 清除柱子上面是去除了 microRNA 的总 RNA (不包含 microRNA), 如果需要, 可以按照前面标准操作步骤 5-9 操作漂洗, 洗脱回收得到去除了 microRNA 的总 RNA。

3. 用微量移液器较精确估计滤过液体积, 加入等体积无水乙醇 (必须是室温的), 涡旋或者吹打充分混匀, 不要离心。

4. 立刻将混合物 (每次小于 700 μ 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), 12,500 rpm (14,500 $\times$ g) 离心 2 min, 弃掉废液。

▲确保离心后液体全部滤过去, 膜上没有残留, 如有必要, 可以加大离心力和离心时间。

5. 按照前面标准操作步骤 5-9 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。相对富集方法提取的 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, 可以尝试使用相对富集方法提取的 microRNA。

◇ microRNA 提取方法



07/相关产品

- AC0303 SPARKeasy 改良型植物 RNA 快速提取试剂盒
- AC0305 SPARKeasy 新型植物 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 $\times$ 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

