

UE miRNA 小量制备试剂盒

本试剂盒用于从各种动物组织、植物组织和细胞中提取 miRNA。提取的 miRNA 分子完整、纯度高，适用于 Northern Blot、Real-Time PCR、miRNA 微阵列芯片、原位杂交、RNase 保护测定等各种分子生物学实验。

一、试剂盒组成、贮存、稳定性

Cat.No.	UE-MN-MIRNA-50	UE-MN-MIRNA-250
Kit size	50 preps	250 preps
Spin/vac mini column	50	250
2 ml microfuge tube	50	250
1.5 ml microfuge tube	50	250
Buffer R-I	25 ml	125 ml
Buffer R-II	10 ml	50 ml
Buffer TE (nuclease-free)	6 ml	30 ml
Protocol manual	1	1

Spin/vac mini column: 小量制备管。室温密封贮存。

Buffer R-I: 细胞裂解液。室温密封贮存。

Buffer R-II: 中和液。室温密封贮存。

Buffer TE (nuclease-free): 洗脱液。10 mM Tris-Cl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5。室温密封贮存。

二、注意事项

Buffer R-I 含刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套和眼镜，避免沾染皮肤、眼睛和衣服，谨防吸入口鼻。若沾染皮肤、眼睛时，要立即用大量清水或生理盐水冲洗，必要时寻求医疗咨询。

三、实验准备

- 所有试剂用 DEPC 处理过的溶剂配制。请选用 RNase-free 枪头和离心管，以避免提取过程中 RNA 被 RNase 降解。
- 70%乙醇，-20°C 预冷。

四、操作步骤

不同的样品提取 miRNA 的操作中略有区别，具体步骤分述如下：

【从动物组织中提取 miRNA】

- 取 20-40 mg 组织，转移至预冷的研钵中，加液氮研磨成粉末。

*请按下面说明使用组织的量：

RNA 丰富的组织 (如肝脏)	不超过 30 mg
RNA 含量低的组织 (如肌肉)	不超过 100 mg
当使用的组织量小于 20 mg 时	R-I, R-II 和异丙醇的使用量都减半
当使用的组织量大于 40 mg 时	R-I, R-II 和异丙醇的使用量按比例增加

- 加入 400 μ l Buffer R-I，用装有 21-25 号针头的注射器反复抽吸 8-10 次，转入 1.5 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中。
- 加入 150 μ l Buffer R-II，漩涡振荡 15-30 s, 12,000 \times g 离心 5 min。
*建议在 4°C 下离心。
- 取上清至 1.5 ml 离心管中，加入 180 μ l 无水乙醇，混和均匀。
- 将制备管置于 2 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中，转移步骤 4 中的混合液到制备管中，12,000 \times g 离心 1 min。
*建议在 4°C 下离心。
*miRNA 在滤液中，注意保存滤液。
- 弃制备管，在滤液中加入 500 μ l 异丙醇，混和均匀。
- 12,000 \times g 离心 10 min，弃上清。
- 加入 700 μ l 70%乙醇 (-20°C 预冷)，12,000 \times g 离心 5 min。
- 弃上清，室温干燥 5-10 min。
- 离心管中加入 70 μ l Buffer TE (nuclease-free) 或 RNase-free 水洗脱 miRNA。

【从植物组织中提取 miRNA】

- 取 30-150 mg 组织，转移至预冷的研钵中，加液氮研磨成粉末。

*请按下面说明使用组织的量：

植物叶子	通常用量 10-80 mg
植物纤维组织	通常用量 100-150 mg
当植物叶组织量小于 30 mg 时	R-I, R-II 和异丙醇的使用量都减半
当植物叶组织量大于 80 mg 时	R-I, R-II 和异丙醇的使用量按比例增加
当植物纤维组织量大于 150 mg 时	R-I, R-II 和异丙醇的使用量按比例增加

- 加入 400 μ l Buffer R-I，用装有 21-25 号针头的注射器反复抽吸 8-10 次，转入 1.5 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中。
- 加入 150 μ l Buffer R-II，漩涡振荡 15-30 s, 12,000 \times g 离心 5 min。
*建议在 4°C 下离心。
- 取上清至 1.5 ml 离心管中，加入 180 μ l 无水乙醇，混和均匀。
- 将制备管置于 2 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中，转移步骤 4 中的混合液到制备管中，12,000 \times g 离心 1 min。
*建议在 4°C 下离心。
*miRNA 在滤液中，注意保存滤液。
- 弃制备管，在滤液中加入 500 μ l 异丙醇，混和均匀。
- 12,000 \times g 离心 10 min，弃上清。
- 加入 700 μ l 70%乙醇 (-20°C 预冷)，12,000 \times g 离心 5 min。
- 弃上清，室温干燥 5-10 min。
- 离心管中加入 70 μ l Buffer TE (nuclease-free) 或 RNase-free 水洗脱 miRNA。

【从细胞中提取 miRNA】

步骤 1-3 根据细胞培养的方式不同可以选择 a 或 b 两种实验方法

- 悬浮培养的动物细胞或从培养皿、培养瓶中获得细胞悬液或新鲜分离的动物组织单细胞悬液：
 - 收集 $2 \times 10^6 \times 10^7$ 的细胞，2,000 \times g 离心 5 min，弃上清。
 - 加入 400 μ l Buffer R-I，用装有 21-25 号针头的注射器反复抽吸 8-10 次，转入 1.5 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中。
 - 加入 150 μ l Buffer R-II，漩涡振荡 15-30 s, 12,000 \times g 离心 5 min。
*建议在 4°C 下离心。
- 96-孔，24-孔，12-孔，或 6-孔培养板上贴壁培养的细胞：
 - 从 96-孔，24-孔，12-孔或 6-孔培养板里收集细胞，尽量弃去培养基，每孔加入 400 μ l Buffer R-I，用移液枪上下吹打 8-10 次。
 - 转移上述细胞悬液到 1.5 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中，用装有 21-25 号针头的注射器反复抽吸 8-10 次。
 - 加入 150 μ l Buffer R-II，漩涡振荡 15-30 s, 12,000 \times g 离心 5 min。
*建议在 4°C 下离心。
- 取上清至 1.5 ml 离心管中，加入 180 μ l 无水乙醇，混和均匀。
- 将制备管置于 2 ml 离心管 (试剂盒内提供) 中，转移步骤 4 中的混合液到制备管中，12,000 \times g 离心 1 min。
*建议在 4°C 下离心。
*miRNA 在滤液中，注意保存滤液。
- 弃制备管，在滤液中加入 500 μ l 异丙醇，混和均匀。
- 12,000 \times g 离心 10 min，弃上清。
- 加入 700 μ l 70%乙醇 (-20°C 预冷)，12,000 \times g 离心 5 min。
- 弃上清，室温干燥 5-10 min。
- 离心管中加入 70 μ l Buffer TE (nuclease-free) 或 RNase-free 水洗脱 miRNA。

五、流程图

