天净沙系列

CAT#:220803

常温运输和保存

天净沙

miRNA 纯化试剂盒（过柱法）

miRNA Purification Kit

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品是用于小 RNA 分离纯化产品，它具有下列特点：

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。
2. 柱式操作，整个过程只需要 10 多分钟。
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. 得到的小 RNA 纯度高，OD260/280 一般都在 1.9 以上。
5. 产率一般为 20-40 μg/100 mg 动物组织。
6. 无基因组 DNA 的污染。
7. 可用于 RT-PCR、miRNA 标记、microarray 等后续实验。

规格及成分

本产品使用大盒包装

成份	编号	规格	包装材料
miRNA 纯化溶液 A	220803a	25 mL	30 mL 棕色玻璃瓶
miRNA 纯化溶液 B	220803b	25 mL	30 mL 本色瓶
miRNA 纯化溶液 C	220803c	50 mL	60 mL 本色瓶
离心吸附柱	220144	50 套×2	塑料袋
miRNA 专用洗柱液	220803d	50 mL	60 mL 本色瓶
RNA 洗脱液	971207	10 mL	10 mL 本色瓶
使用手册	220803sc	1 份	1 份

运输及保存

常温运输和保存，有效期一年。

自备试剂

氯仿。

使用方法

由于离心吸附柱的吸附量限制，本产品每次提取只能处理 100 mg 左右的各种组织。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。

1. 新鲜配制裂解液。将 miRNA 纯化溶液 A 和 miRNA 纯化溶液 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：miRNA 纯化溶液 A 和 miRNA 纯化溶液 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 1-5×10^6 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 非冻型保存液中保存的动物或植物实体组织组织:先用纸吸去保存液后再剪切成小块，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. 14,000×g 室温离心 3-5 分钟。
4. 将上清液（约 0.6-0.8 mL）转移到离心吸附柱中。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 μL 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。
5. 14,000×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 μg 动物 RNA，20 μg 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。
6. 在最后得到的不含大 RNA 的穿透液中加等体积的 miRNA 纯化溶液 C，混匀。此时溶液的总体积约 1.5 mL。
7. 先转移约 0.75 mL 到离心吸附柱中，14,000×g 室温离心半分钟，弃收集管中的穿透液。
8. 将上步上柱剩余的样品转移到离心吸附柱中，14,000×g 室温离心半分钟，弃收集管中的穿透液。
9. 加 0.7 mL miRNA 专用洗柱液到离心吸附柱中，14,000×g 室温离心半分钟，弃穿透液。
10. 加 0.3 mL miRNA 专用洗柱液到离心吸附柱中，14,000×g 室温离心半分钟，弃穿透液。此步一般可以省略。
11. 14,000×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。
12. 将离心吸附柱转移到一自备的 RNase-free 收集管中，加入 50 μL RNA 洗脱液，室温放置 3-5 分钟。
13. 14,000×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。
关联试剂	miRNA 尿素-PAGE 电泳套装

20220803dx