

# R6842 miRNA Isolation Kit

## 简易中文步骤

√实验前请按说明书正确稀释 RWB Wash Buffer.

➤ 使用【无水乙醇】对 RWB Wash Buffer 进行稀释，稀释后室温保存

货号	加入量
R6842-00	16mL
R6842-01	48mL (每瓶)
R6842-02	200mL (每瓶)

### 提取步骤:

#### A. 样品中提取 microRNA 实验流程

- 用 1mL RNA-Solv<sup>®</sup> Reagent 裂解细胞或组织，1mL 的 RNA-Solv<sup>®</sup> Reagent 可裂解  $1 \times 10^7$  个培养细胞，30-50mg 动物组织或 50-100mg 植物组织。
  - 对于单层 (成纤维细胞、内皮细胞等)：倒弃培养基，加入 RNA-Solv<sup>®</sup> Reagent 直接加入到到培养容器中，吹打裂解细胞，将裂解液转移到新的 1.5mL 离心管中，进行步骤 2；（该操作方法优于胰蛋白酶消化洗涤，因为该操作最大限度地减少了核酸污染引起的 RNA 降解。）
  - 悬浮细胞：不超过 1,500rpm (400xg) 离心 5min 收集细胞，倒弃培养液，加入 RNA-Solv<sup>®</sup> Reagent，充分涡旋混匀，裂解细胞，将裂解液转移到新的 1.5mL 离心管中，进行步骤 2；
  - 组织样品：确定样品大小，并按照英文说明书中第 4 页的匀浆方法，也可用液氮研磨后直接加入 RNA-Solv<sup>®</sup> Reagent 匀浆，进行步骤 2；
- 放置样本管在室温下 2-3min。
- 按照每 1mL RNA-Solv<sup>®</sup> Reagent 加入 0.2mL 氯仿的量，加入氯仿后，用力震荡混匀 15s，放置到冰上冰浴 10min。
- 使用低温离心机，4°C，12,000xg 离心 15min。离心后溶液分为三层，底层的苯酚-氯仿、中间层和上层水相，其中 RNA 完全保留在上层水相层。
- 小心转移 ≤80% 的水相层到新的 2mL 离心管中，加入 0.5 倍体积的无水乙醇（如果样品是肝或者脾，加入 1/3 倍体积的无水乙醇），涡旋混匀。
- 将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini column 套入 2mL 收集管中，现将步骤 5 的混合液涡旋混匀后，加入 ≤700μl 的混合液到到 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini column 中。10,000xg 离心 30-60s，将滤液转移到新的 2mL 离心管中。
- 重复步骤 6，直到步骤 5 的混合液全部过柱为止，离心得到的滤液转移到步骤 6 用

来收集滤液的 2mL 收集管中。

Note: HiBind® RNA Mini column 可用来分离大量的总 RNA (> 200nt), 提取步骤见方案 B。

### miRNAs 纯化:

8. 测量滤液的体积, 加入 0.9 倍体积的无水乙醇, 充分涡旋混匀。将 MicroElute™ RNA column 套入 2ml 收集管中。
9. 加入步骤 8 的混合液到加到 MicroElute™ RNA column 里, 10,000xg 离心 30-60s, 弃滤液。
10. 重复步骤 9, 直到步骤 8 的混合液全部过柱为止。
11. 将 MicroElute™ RNA column 套入 2mL 收集管中, 加入 500µl RWB Wash Buffer, 10,000xg, 离心 30-60s, 弃滤液, 将 MicroElute™ RNA column 套入 2mL 收集管中。

Note: RWB Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

12. 加入 500µl RWB Wash Buffer, 10,000xg, 离心 30-60s, 弃滤液, 将 MicroElute™ RNA column 套入 2mL 收集管中, 最大速度 ( $\geq 13,000xg$ ) 空甩离心 2min。
13. 将 MicroElute™ RNA column 套入新的 1.5mL 的离心管中, 加入 15-30µl DEPC water, 室温放置 2min, 最大速度离心 1min。如果 RNA 产量需要 > 20µg 可再次洗脱。

另外, 也可以用更多的 DEPC water 进行洗脱, 增加额外的洗脱体积可以增加总 RNA 的产量, 但会使浓度降低, 一次洗脱能得到 80% 的 RNA。为了提高 miRNA 浓度, 可以加入 70°C 预热的 DEPC water 后室温静置 5min, 再离心得到 miRNA 产物。

### B. 样品中提取大片段 RNA 实验流程

1. 按照 A 实验流程操作到第 7 步。
2. 将 HiBind® RNA Mini column 套入新的 2mL 收集管中, 加入 500µl RWC Wash Buffer, 10,000xg 离心 30s, 弃滤液;
3. 将 HiBind® RNA Mini column 套入 2ml 收集管中。

Note: 如需做 DNA 酶消化, 请做完第 2 步直接跳到第 4 步操作

4. DNase I 消化 (选做)
  - a. 加入 300µl RWC Wash Buffer 到 HiBind® RNA Mini column 中, 10,000xg 离心 30s, 弃滤液, 将 HiBind® RNA Mini column 套入 2mL 收集管中。

b. 按下表要求准备消化液。

组分	加入量
OBI DNase I Digestion Buffer	73.5 $\mu$ l
RNase-free DNase I (20 Kunitz unites/ $\mu$ l)	1.5 $\mu$ l
总体积	75 $\mu$ l

c. 将上述 75 $\mu$ l DNase I 消化液直到加到柱子的膜的正中央。不要让消化液转移至柱子的O圈或柱子的内壁。不然会降低的酶切效率。

d. 室温下 (25-30°C) 放置 15min。

e. 将 HiBind® RNA Mini column 套入 2mL 收集管中, 加入 400 $\mu$ l RWC Wash Buffer, 放置室温 5min, 10,000xg 离心 30s, 弃滤液, 将 HiBind® RNA Mini column 套入 2mL 收集管中。

5. 加入 500 $\mu$ l RWB Wash Buffer, 10,000xg 离心 30s, 弃滤液, 将 HiBind® RNA Mini column 套入 2mL 收集管中。

6. 加入 500 $\mu$ l RWB Wash Buffer, 10,000xg 离心 30s, 弃滤液, 将 HiBind® RNA Mini column 套入 2mL 收集管中。最大速度 ( $\geq 13,000$ xg) 空甩离心 2min。

7. 将 HiBind® RNA Mini column 套入新的 1.5mL 的离心管中, 加入 30-50 $\mu$ l DEPC 水, 室温放置 2min, 12,000xg 离心 1min。如果 RNA 产量需要  $> 50\mu$ g 可再次洗脱。

另外, 也可以用更多的 DEPC water 进行洗脱, 增加额外的洗脱体积可以增加总 RNA 的产量, 但会使浓度降低, 一次洗脱能得到 80% 的 RNA。为了提高 RNA 浓度, 可以加入 70°C 预热的 DEPC water 后室温静置 5min, 再离心得到 RNA 产物。

### C. 样品中提取总 RNA 实验流程

1. 用 1mL RNA-Solv® Reagent 裂解细胞或组织, 1mL 的 RNA-Solv® Reagent 足以裂解  $1 \times 10^7$  个培养细胞, 30-50mg 动物组织或 50-100mg 植物组织。

A. 对于单层 (成纤维细胞、内皮细胞等): 倒弃培养基, 加入 RNA-Solv® Reagent 直接加入到到培养容器中, 吹打裂解细胞, 将裂解液转移到新的 1.5mL 离心管中, 进行步骤 2; (该操作方法优于胰蛋白酶消化洗涤, 因为该操作最大限度地减少了核酸污染引起的 RNA 降解。)

B. 悬浮细胞: 不超过 1,500rpm (400xg) 离心 5min 收集细胞, 倒弃培养液, 加入 RNA-Solv® Reagent, 充分涡旋混匀, 裂解细胞, 将裂解液转移到新的 1.5mL 离心管中, 进行步骤 2;

C. 组织样品: 确定样品大小, 并按照英文说明书中第 4 页的匀浆方法, 也可用液氮

- 研磨后直接加入 RNA-Solv<sup>®</sup> Reagent 匀浆, 进行步骤 2;
2. 放置样本管在室温下 2-3min;
  3. 按照每 1mL RNA-Solv<sup>®</sup> Reagent 加入 0.2mL 氯仿的量, 加入氯仿后, 用力震荡混匀 15s, 放置到冰上冰浴 10min;
  4. 使用低温离心机, 4°C, 12,000xg 离心 15min。离心后溶液分为三层, 底层的苯酚-氯仿、中间层和上层水相, 其中 RNA 完全保留在上层水相层;
  5. 小心转移≤80%的水相层到新的 2mL 离心管中, 加入 1.5 倍体积的无水乙醇;
  6. 将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini column 套入 2mL 收集管中, 现将步骤 5 的混合液涡旋混匀后, 加入≤700μl 的混合液到到 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini column 中。10,000xg 离心 30-60s, 将柱子转移到新的 2mL 离心管中。
  7. 加入 500μl RWB Wash Buffer, 10,000xg 离心 30s, 弃滤液, 将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini column 套入 2mL 收集管中。
  8. 加入 500μl RWB Wash Buffer, 10,000xg 离心 30s, 弃滤液, 将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini column 套入 2mL 收集管中。
  9. 使用离心机, 12,000xg 空用离心 2min。
  10. 将 HiBind<sup>®</sup> RNA Mini column 套入新的 1.5mL 的离心管中, 加入 40-50μl DEPC water, 室温放置 2min, 最大速度离心 1min。如果 RNA 产量需要 > 20μg 可再次洗脱。

另外, 也可以用更多的 DEPC water 进行洗脱, 增加额外的洗脱体积可以增加总 RNA 的产量, 但会使浓度降低, 一次洗脱能得到 80% 的 RNA。为了提高 RNA 浓度, 可以加入 70°C 预热的 DEPC water 后室温静置 5min, 再离心得到 RNA 产物。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准