

## R7036 PF Micro RNA Kit

## 简易中文步骤

√实验前请按说明书正确配制 RNA Wash Buffer II

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

货号	加入量
R7036-00	20mL
R7036-01	48mL
R7036-02	200mL (每瓶)

### 提取步骤:

按照下表制备裂解液混合液:

组分	体积
NTL Lysis Buffer	0.5mL
miRNA Binding Enhancer	15 $\mu$ l
$\beta$ -巯基乙醇	10 $\mu$ l

1. 用 0.5mL 的裂解液混合液将细胞或组织（参考上表制备），按照以下其中一个步骤操作:

A. 对于生长中的单层（成纤维细胞，内皮细胞等）培养细胞，直接在培养容器中裂解细胞:

- 1) 吸除培养基;
- 2) 加入 0.5mL 的裂解液混合液到细胞中，确保裂解液混合液将容器表面覆盖以便裂解细胞;
- 3) 将裂解液转移到新的 2mL 微量离心管中;
- 4) 继续步骤 2;

Note: 该方法优于用胰蛋白酶洗涤消化，因为它通过核酸酶消化使 RNA 降解最小化。

B. 对于在悬浮培养中生长的细胞:

- 1) 细胞在不大于 1,500rpm (400xg) 离心 5min;
- 2) 弃除上清液;
- 3) 加入 0.5mL 的裂解液混合液;
- 4) 涡旋或上下颠倒混匀使细胞充分裂解;
- 5) 将裂解液转移到 2mL 干净的微量离心管中
- 6) 继续步骤 2;

C. 对于组织样本，确定样本的大小并使用英文说明书中第 6 页讨论的方法之一将

样品匀浆化。可用液氮，直接在 0.5 mL 裂解液混合物中将样品匀浆并继续步骤 2；  
D. 细菌细胞：通过离心收集生长至对数期的细菌，加入 50 $\mu$ L Lysozyme（用 15mg/mL 的 TE 溶解）并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 10 分钟。加入 450 $\mu$ L 裂解液混合液并涡旋 1min。继续步骤 2；

2. 室温静置 3-5min，加入 250 $\mu$ L XD Binding Buffer，涡旋混匀 15s；
3. 冰浴 10min，在 4 $^{\circ}$ C，13,000xg 离心 15min；
4. 将 HiBind<sup>®</sup> X-Press Column 套入到 2mL 收集管中，转移步骤 3 中的上清液至柱子中，室温下 13,000xg 离心 1min，收集滤液并测量滤液的体积；
5. 将滤液转移到新的 2mL 微量离心管中，加入 1.2 倍体积的乙醇，涡旋混匀 20s；
6. 将 HiBind<sup>®</sup> Micro RNA Column 套入到 2mL 收集管中，转移 700 $\mu$ L 步骤 5 中的混合液到柱子中，13,000xg 离心 1min，弃滤液；
7. 重复步骤 6，直至将步骤 5 中的混合液完全转移过柱；
8. 将 HiBind<sup>®</sup> Micro RNA Column 套回到 2mL 收集管中，加入 500 $\mu$ L 无水乙醇，13,000xg 离心 1min，弃滤液；
9. 将 HiBind<sup>®</sup> Micro RNA Column 套回到 2mL 收集管中，加入 500 $\mu$ L XD Binding Buffer，13,000xg 离心 1min，弃滤液；
10. 将 HiBind<sup>®</sup> Micro RNA Column 套回到 2mL 收集管中，加入 500 $\mu$ L RNA Wash Buffer II，13,000xg 离心 1min，弃滤液；

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

11. 重复步骤 10；
12. 将 HiBind<sup>®</sup> Micro RNA Column 套回到 2mL 收集管中，13,000xg 空柱子离心 2min 干燥；

Note: 洗脱前对柱子的干燥至关重要，否则残留的乙醇可能对下游实验产生影响。

13. 将 HiBind<sup>®</sup> Micro RNA Column 套入到新的 1.5mL 或 2mL 离心管中，加入 15-30  $\mu$ L DEPC Water，室温静置 2min，13,000xg 离心 2min 洗脱 RNA，保存到 -70 $^{\circ}$ C 中。

Note: 确保将 DEPC Water 加入到 HiBind<sup>®</sup> Micro RNA Column 基质中。

以下操作可能帮助提高得到 RNA 的量：

- 洗脱前将 DEPC Water 放置到 70 $^{\circ}$ C 预热；
- 加入洗脱液后放置 5-10min；
- 增加洗脱体积；
- 加入新的 DEPC Water 重复洗脱（此操作能提高产率，但会导致浓度下降）
- 将第一次的洗脱液重新加回到柱子中进行二次洗脱（此操作可以在保持洗脱体积的同时增加产量）

中文翻译仅供辅助阅读，详情请以英文说明书为准