

Superbrilliant[®] 高效组织/细胞 miRNA 提取试剂盒**Superbrilliant[®] High-efficient Tissue/Cell miRNA Extraction Kit****Cat. No.: ZS-M15005**

组分:

货号	名称	ZS-M15005S (25T)	ZS-M15005M (50T)	ZS-M15005L (250T)
102018	miRNA 裂解液 A	7.5 ml	15 ml	75ml
102019	miRNA 吸附液 B	10 ml	20 ml	100 ml
101014	miRNA 吸附柱	25 套	50 套	250 套
102020	Rnase free TE Buffer	2.5ml	2.5ml	12.5ml

储存: 室温可保存 2 年。

简介: 该试剂盒操作步骤简单、重复性好、miRNA 产率高。该试剂盒中的裂解液是经过长时间研发改良的,具有一般裂解液不具有的裂解能力和提取灵敏度,试剂盒中的吸附柱采用特殊的硅基质膜填料,大大增强了其对 RNA 的吸附能力,尤其是 small RNA (<200nt)。使用该试剂盒提取的小 RNA (Small RNA) 中,长度在 15~200nt 范围的 RNA 在 95%以上,基本不含有大 RNA 和 DNA。本产品通过一步上柱即可获得高纯度的 miRNA,可在 45 min 内完成小 RNA 的提取。该试剂盒广泛适用于动物组织、细胞和多糖多酚含量不高的植物组织样本。经本制品提取的 Small RNA 纯度高,可以除去大部分 28S 和 18S 大片段 RNA、蛋白质及基因组 DNA。大幅度提高产物的纯度和产量,操作简便,兼容性强。提取的 RNA 没有 DNA 和蛋白污染,可应用于后续分子杂交,实时定量 PCR 和 miRNA 芯片等分子生物学实验。

使用防护建议: miRNA 裂解液 A 溶液中含有胍盐,其具有强烈的腐蚀性,试验时请务必佩戴防护眼镜、手套、口罩等防护措施,如有皮肤接触请立即用大量清水冲洗,并及时就诊。

样本使用量及小 RNA 产量

样品类型	样品量	小 RNA 产量
动物组织 (肝脏、脾脏、肾脏等)	10~30 mg	0.2~10 μ g
动物组织 (骨骼肌、心肌)	20~40 mg	0.1~5 μ g
动物组织 (脑、皮肤)	20~50 mg	0.1~2 μ g
植物组织 (多糖多酚含量不高的)	20~40 mg	0.1~2 μ g
细胞	0.5 $\times 10^6$ ~10 7 个	0.1~2 μ g

自备试剂: 异丙醇、乙醇、75%异丙醇、植物组织需另备 β -巯基乙醇。

操作方法:

1. 组织样本提取

(1) 向 1.5ml EP 管中加入 300 μ l miRNA 裂解液 A。植物组织则再加入 10 μ l β -巯基乙醇,混合均匀。

(2) 在液氮条件下充分将组织研磨粉碎,将一定的样品量(见样本使用量表)研磨成粉状的组织加入到上述 300 μ l miRNA 裂解液 A 中,立即剧烈震荡至组织粉末彻底溶解于裂解液中。室温静置 5min 以充分裂解细胞。

注意: 将组织加入到 miRNA 裂解液 A 后要迅速将组织震散,否则易引起组织成团状,不容易裂解。如发生成团状,务必用移液器将团状组织吹打松散。

(3) 向上述裂解完毕的裂解液中加入 350 μ l miRNA 吸附液 B,上下颠倒混合均匀。13,000 rpm 离心 5min,吸取 550 μ l 上清液,转移到新的 1.5 ml EP 管中。

(4) 向上述溶液中加入 200 μ l 无水乙醇,用力震荡数次,室温放置 5 min。

(5) 13,000 rpm 离心 10 min,转移 700 μ l 上清液到新的 1.5 ml EP 管中。

(6) 向上述溶液中加入 300 μ l 异丙醇,手腕用力上下颠倒数次。

(7) 分两次将上述溶液倒入到 miRNA 吸附柱中,13,000 rpm 离心 1 min,倒掉过滤液。

(8) 向吸附柱中加入 700 μ l 75%异丙醇洗涤一次,13,000 rpm 离心 1 min,倒掉过滤液。

(9) 向吸附柱中加入 500 μ l 无水乙醇洗涤一次,13,000 rpm 离心 1 min,倒掉过滤液。

- (10) 吸附柱 13,000 rpm 空离心 2 min, 去掉残留的乙醇。
- (11) 将吸附柱放入到新 1.5ml EP 管中, 室温放置 2 min, 使残留乙醇挥发。在吸附柱滤芯上加入 30 μ l Rnase free TE Buffer, 室温静置 2min, 13,000rpm 离心 2min, 洗脱产物即为提取的 miRNA。通常取 1~2 μ l 该产物, 即可使用 Superbrilliant™ miRNA 反转录试剂盒 (TaqMan 法) 进行反转录反应 (货号: ZS-M15004)。

2. 细胞样本提取

- (1) 贴壁细胞: 胰酶消化细胞后, 离心收集细胞沉淀。用 100 μ l 1 \times PBS 重悬细胞后, 加入 300 μ l miRNA 裂解液 A 颠倒混合均匀, 室温放置 5 min。
- (2) 悬浮细胞: 直接离心后, 收集细胞沉淀。用 100 μ l 1 \times PBS 重悬细胞后, 加入 300 μ l miRNA 裂解液 A 颠倒混合均匀, 室温放置 5 min。
- (3) 向上述裂解完毕的裂解液中加入 250 μ l miRNA 吸附液 B, 上下颠倒混合均匀。13,000 rpm 离心 5 min, 吸取 550 μ l 上清液, 转移到新的 1.5 ml EP 管中。
- 注意: 加入细胞体积数与 miRNA 吸附液 B 总体积数为 350 μ l。如加入 50 μ l 细胞, 则 miRNA 吸附液 B 使用 300 μ l。**
- (4) 向上述 550 μ l 上清溶液中加入 200 μ l 无水乙醇, 用力震荡数次, 室温放置 5 min。
- (5) 13,000 rpm 离心 10 min, 转移 700 μ l 上清液到新的 1.5 ml EP 管中。
- (6) 向上述溶液中加入 300 μ l 异丙醇, 用力上下颠倒数次。
- (7) 分两次将上述溶液倒入到 miRNA 吸附柱中, 13,000 rpm 离心 1 min, 倒掉过滤液。
- (8) 向吸附柱中加入 700 μ l 75%异丙醇洗涤一次, 13,000 rpm 离心 1 min, 倒掉过滤液。
- (9) 向吸附柱中加入 500 μ l 无水乙醇洗涤一次, 13,000 rpm 离心 1 min, 倒掉过滤液。
- (10) 吸附柱 13,000 rpm 空离心 2 min, 去掉残留的乙醇。
- (11) 将吸附柱放入到新 1.5 ml EP 管中, 室温放置 2 min, 使残留乙醇挥发。在吸附柱滤芯上加入 30 μ l Rnase free TE Buffer, 室温静置 2 min, 13,000 rpm 离心 2 min, 洗脱产物即为提取的 miRNA。通常取 1~2 μ l 该产物, 即可使用 Superbrilliant™ miRNA 反转录试剂盒 (TaqMan 法) 进行反转录反应 (货号: ZS-M15004)。

常见问题汇总:

- (1) 本方法提取的小 RNA, 95%以上为小 RNA (<200nt), 有时会残留一些>200nt 的 RNA, 通常残留的>200nt RNA 不影响后续试验操作。
- (2) 本试剂盒提取的小 RNA 由于不含 mRNA 等大分子量的 RNA, 因此更适合做后续反转录试验, 从而进行定量试验。
- (3) 使用本试剂盒提取的 miRNA 浓度通常在 50ng/ μ l 左右, 取 5~10 μ l 即可用于电泳检测。取 1~2 μ l 即可用于 Superbrilliant™ miRNA 反转录试剂盒 (TaqMan 法) 进行反转录反应 (货号: ZS-M15004)。

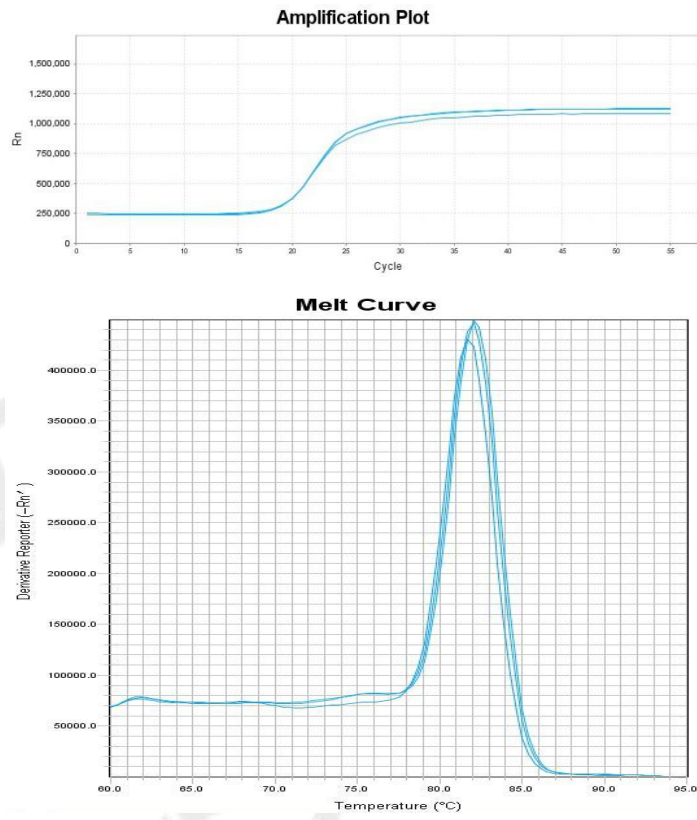


Fig 1. 使用该试剂盒提取的 MDA-MB-231 细胞 RNA，反转录后进行 miR-21 基因的 qPCR